

**Gerichtete Evolution und mechanistische Studien von
carbonylselektiven Alken-Oxygenasen und deren
Anwendung in der asymmetrischen Synthese**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

vorgelegt der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

von

Sebastian Gergel
aus Bietigheim-Bissingen

Bielefeld, Oktober 2021

Erstgutachter: Jun.-Prof. Dr. Stephan Hammer
Organische Chemie und Biokatalyse
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Gröger
Industrielle Organische Chemie und Biotechnologie
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde unter Anleitung von Herrn Jun.-Prof. Dr. Stephan Hammer im Gesamtzeitraum von Januar 2018 bis Oktober 2021 angefertigt. Der erste Teil der Promotion wurde von Januar 2018 bis März 2020 am Institut für Biochemie und Technische Biochemie (Abteilung Technische Biochemie) der Universität Stuttgart durchgeführt – integriert in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Hauer. Die Promotion wurde anschließend am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biokatalyse an der Universität Bielefeld von April 2020 bis Oktober 2021 fortgesetzt.

Die Finanzierung dieser Arbeit erfolgte durch das Emmy Noether-Programm der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektnummer 420112577).

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Gerichtete Evolution und mechanistische Studien von carbonylselektiven Alken-Oxygenasen und deren Anwendung in der asymmetrischen Synthese“ selbstständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Alle wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommenen Aussagen sind als solche gekennzeichnet worden. Außerdem war die eingereichte Dissertation weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens. Das elektronische Exemplar stimmt in allen Punkten mit den gedruckten Exemplaren überein.

Die Dissertation wurde von der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld auf Basis der Promotionsordnung vom 1. Juli 2011 genehmigt.

Sebastian Gergel

Bielefeld, 18. Oktober 2021

Teile dieser Arbeit werden zur Veröffentlichung vorbereitet oder wurden bereits im Rahmen von Konferenzen vorgestellt:

Veröffentlichungen (in Vorbereitung)

S. Gergel*, J. Soler*, A. Klein, K. H. Schülke, B. Hauer, M. Garcia-Borràs, S. C. Hammer,
Directed evolution of a ketone synthase for the efficient and highly selective functionalization of internal alkenes, in Vorbereitung, **2021**.

S. Gergel*, J. Soler*, S. C. Hammer, M. Garcia-Borràs,
Mechanistic insights into anti-Markovnikov alkene oxidations by engineered P450s: Enzymatic control of reactive intermediates, in Vorbereitung, **2021**.

* Die gekennzeichneten Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Posterpräsentationen

S. Gergel, B. Hauer, S. C. Hammer,
Enzymatic, asymmetric anti-Markovnikov functionalization of internal alkenes,
06/2019, Groningen, NL, 15th BIOTRANS Symposium

S. Gergel, B. Hauer, S. C. Hammer,
Enzymatic, asymmetric anti-Markovnikov functionalization of internal alkenes,
03/2019, Bremen, DE, 21st Frühjahrssymposium & 2nd European Young Chemists' Meeting

Weitere Veröffentlichungen außerhalb des Promotionsprojekts:

B. Aberle, D. Kowalczyk, S. Massini, A.-N. Egler-Kemmerer, S. Gergel, S. C. Hammer, B. Hauer, *Selective methyl transfer to alkenes with engineered methyltransferases provides access to terpenoid derivatives*, in Vorbereitung, **2021**.

N. Borlinghaus, S. Gergel, B. M. Nestl, F. Thol, H. Penders, *Preparation of imine reductases at 15 L scale and their application in asymmetric piperazine synthesis*, als Buchkapitel in *Applied Biocatalysis: The Chemist's Enzyme Toolbox*, Wiley-VCH, **2020**, ISBN: 978-1-119-48703-6.

R. M. Demming, S. C. Hammer, B. M. Nestl, S. Gergel, S. Fademrecht, J. Pleiss, B. Hauer, *Asymmetric enzymatic hydration of unactivated, aliphatic alkenes*, *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 173–177.

N. Borlinghaus, S. Gergel, B. M. Nestl, *Biocatalytic access to piperazines from diamines and dicarbonyls*, *ACS Catalysis* **2018**, *8*, 3727–3732.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Jun.-Prof. Dr. Stephan Hammer, der meine Forschung an diesem hochspannenden Projekt ermöglicht hat und mir bei Bedarf stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Herzlichen Dank für die vielen aufschlussreichen Diskussionen sowie motivierenden Ermutigungen, das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit und die Freiheiten bei der Ausgestaltung verschiedener Projekte. Weiterhin möchte ich mich für die hervorragenden, neu geschaffenen Arbeitsbedingungen hier in Bielefeld bedanken und den unermüdlichen Fleiß würdigen, der diese fantastische Arbeitsgruppe geformt hat. Vielen Dank, Stephan!

Für die anfängliche Finanzierung meines Promotionsprojekts und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in der Abteilung für Technische Biochemie (IBTB, Universität Stuttgart) möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer meinen großen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Harald Gröger danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Unseren Kollaborationspartnern Dr. Marc Garcia-Borràs und Jordi Soler i Parpal an der Universitat de Girona in Spanien möchte ich für die produktive Zusammenarbeit danken. Der rege fachliche Austausch hat mir nicht nur geholfen, Methoden der computergestützten chemischen Biologie besser zu verstehen, sondern hat auch außerordentlich wertvolle Erkenntnisse für dieses Forschungsprojekt geliefert, die sich in dieser Doktorarbeit und unseren gemeinsam verfassten Manuskripten widerspiegeln.

Bedanken möchte ich mich bei allen Studenten, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben und einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieses Projekts beigetragen haben. Den drei Forschungspraktikantinnen Mélissa Lallier, Arnela Erden und Kathrin Hörnschemeyer danke ich für die Hilfe beim Screening verschiedener Modellsubstrate und die Unterstützung bei gerichteten Evolutionsexperimenten. Besonders danken möchte ich Kai Schülke für seinen erstklassigen Einsatz im Rahmen seiner Masterarbeit, der zu vielen wesentlichen Erkenntnissen geführt hat. Für seine Begeisterung an diesem Forschungsprojekt, dem selbst ein Umzug nach Bielefeld kein Einhalt gebieten konnte, möchte ich ihm meine besondere Anerkennung aussprechen.

Für die wertvolle Hilfe bei der Synthese unterschiedlicher Produktstandards und das sehr gute Labormanagement möchte ich Alina Klein meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Auch möchte ich mich bei Melanie Allgaier in Stuttgart und dem Team des Chemikalienlagers der Universität Bielefeld bedanken, die einen wichtigen Beitrag für einen reibungslosen Laboralltag geleistet haben.

Dr. James Finnigan von der Firma Prozomix Ltd. (Haltwhistle, UK) möchte ich für die kollaborative Bereitstellung von lyophilisierten P450-Enzymen und den entsprechenden Plasmid-DNA Konstrukten danken. Prof. Dr. Sabine Flitsch und Dr. Nico Kreß (University of Manchester, UK)

sowie Prof. Dr. Nicholas Turner und James Marshall (University of Manchester, UK) danke ich jeweils für Bereitstellung von Plasmid-DNA Konstrukten und Protokollen zur Handhabung einiger im Rahmen dieser Arbeit verwendeten P450-Enzyme oder Iminreduktasen. Bei Prof. Dr. Harald Gröger und Michael Stricker möchte ich mich für die Bereitstellung des GDH-codierenden Plasmid-DNA Konstrukts bedanken. Ich möchte auch Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard und Simon Koopmeiners sowie Benjamin Aberle (IBTB, Universität Stuttgart) für die Bereitstellung verschiedener Expressionsstämme danken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Gideon Grogan und Marie Ménétré (University of York, UK) für die unternommenen Versuche zur Aufklärung der Kristallstruktur von P450_{LA1} und aMO_x.

An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. Birgit Claasen für ihre Bemühungen bei der Aufnahme von NMR-Spektren und deren Interpretation danken. Bei den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen der Chemischen Fakultäten in Stuttgart und Bielefeld möchte ich mich für die Messung von MS- und NMR-Proben ebenfalls bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Bettina Nestl, der ich es zu einem gewissen Teil zu verdanken habe, dass ich an diesem hochspannenden Projekt arbeiten durfte. Auch für die netten Unterhaltungen und fachlichen Diskussionen möchte ich meinen Dank aussprechen. Ebenso ausdrücklich möchte ich Dr. Bernd Nebel für das vermittelte praktische Wissen im Bereich der instrumentellen Analytik und die vielen cleveren Ratschläge danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung für Technische Biochemie (IBTB, Universität Stuttgart) für das freundschaftliche Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft im Laboralltag und zahlreiche gesellige Momente bedanken. Danke für diese unvergessliche Zeit an Andreas H., Andreas S., Benjamin, Jan, Jens, Julia, Julian L., Julian W., Kristina, Lea, Ludwig, Maike, Max, Nico, Niels, Pascal, Peter, Rebecca, Sabrina, Sven, Svenja, Theresa und Wendy.

Allen aktuellen Kollegen hier in Bielefeld möchte ich ebenfalls für die exzellente Arbeitsatmosphäre danken. Ein besonderer Dank geht an die Mitglieder der Jöllenbecker-Gang (inkl. Außenstelle) Cindy, Felipe, Kai und Matúš. Gemeinsam haben wir es geschafft, unter schwierigen Bedingungen in dieser für uns neuen Stadt Fuß zu fassen. Dankbar bin ich auch dafür, dass wir als Gruppe schnell Anschluss an gleichgesinnte Kollegen aus den Gruppen OC1 oder OC3 gefunden haben und gemeinsam unterhaltsame Boßel-Wanderungen oder Thirsty Thursdays erlebt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die während der Entstehung dieser Arbeit und darüber hinaus immer unterstützend hinter mir standen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XII
Abstract	XVII
Zusammenfassung	XVIII
1. Einleitung	1
1.1. Direkte, katalytische Oxidation von Alkenen zu Carbonylen	3
1.1.1. Carbonylselektive Oxidation terminaler Alkene – wie kann die Regioselektivität kontrolliert werden?	3
1.1.2. Regioselektive Oxidation interner Alkene zu Ketonen	4
1.2. Cytochrom P450 Monooxygenasen – Oxidationschemie genetisch codiert.....	7
1.3. Entwicklung nicht-natürlicher Enzymfunktionen	10
1.4. Evolution neuer Biokatalysatoren zur carbonylselektiven Oxyfunktionalisierung.....	14
1.5. Entwicklung neuer Synthesewege mit nicht-natürlichen Enzymfunktionen	16
1.6. Katalytische Strategien für regio- und enantioselektive Hydratisierungen und Hydroaminierungen interner Alkene	18
2. Motivation und Aufgabenstellung	22
3. Ergebnisse und Diskussion	24
3.1. Mechanistische Studien zur Metall-Oxo-vermittelten carbonylselektiven Alkenoxidation	25
3.1.1. Untersuchungen zur Hydridmigration.....	26
3.1.1.1. Massenspektrometrische Analysen zur Hydridmigration.....	27
3.1.1.2. NMR-gestützte Analysen zur asymmetrischen Hydridmigration.....	30
3.1.2. Computergestützte mechanistische Analysen	35
3.1.3. Untersuchung weiterer P450-Enzyme hinsichtlich ihrer Promiskuität.....	41
3.1.3.1. Anti-Markovnikov Oxidations-Potenzial in der CYP116B-Familie	41
3.1.3.2. Untersuchung der Hydridmigration mit weiteren P450-Enzymen	45
3.2. Gerichtete Evolution einer Ketonsynthase	48
3.2.1. Identifizieren eines Startpunkts und Etablierung eines Screening-Systems	48
3.2.2. Gerichtete Evolution	55
3.2.2.1. Mutagenesestrategie und Erstellen von Variantenbibliotheken	55
3.2.2.2. Datenanalyse und Verifikation.....	56
3.2.2.3. Resultat der gerichteten Evolution und Diskussion.....	59
3.2.2.4. Nicht-additive Effekte und ihre Ausnutzung in der Mutagenese.....	66
3.2.2.5. Allylische Oxidation als Konkurrenzreaktion	70
3.2.3. Computergestützte Analyse der evolvierten Ketonsynthase.....	72

3.2.4. Mechanistische Besonderheiten der evolvierten Ketonsynthase	79
3.3. Anwendungsbreite der evolvierten Ketonsynthase und Limitierungen in der Synthese ...	82
3.3.1. Optimierung diverser Parameter zur Steigerung der Produktivität.....	82
3.3.1.1. Optimierung der Proteinexpression	82
3.3.1.2. Optimierung von Reaktionsparametern	84
3.3.2. Ergründung der Substratbreite	86
3.3.3. Anwendung in Kaskaden und im präparativen Maßstab	91
4. Ausblick	96
5. Material und Methoden	99
5.1. Verwendete Materialien	99
5.1.1. Chemikalien	99
5.1.2. Kits.....	99
5.1.3. Plasmide.....	99
5.1.4. <i>E. coli</i> Stämme.....	100
5.1.5. Enzyme	100
5.1.6. Mutagenese-Primer Design.....	101
5.1.7. Kulturmedien und Pufferlösungen	101
5.2. Molekularbiologische Methoden.....	103
5.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	103
5.2.2. Agarose-Gelelektrophorese	104
5.2.3. Herstellung elektrokompenter Zellen	105
5.2.4. Elektrotransformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	105
5.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Sequenzierung	106
5.2.6. Ortsgerichtete Mutagenese	106
5.2.7. Klonierungsmethoden.....	108
5.3. Bioinformatische Methoden.....	109
5.3.1. Erstellung und Visualisierung von Homologiemodellen	109
5.3.2. Sequenzähnlichkeitsnetzwerk.....	109
5.3.3. Weitere verwendete Onlinetools.....	110
5.4. Proteinbiochemische Methoden.....	110
5.4.1. Proteinexpression.....	110
5.4.1.1 Expression von P450 Monooxygenasen in Schüttelkolben.....	110
5.4.1.2 Expression von P450 Monooxygenasen in Deep-Well-Platten.....	111
5.4.1.3 Expression weiterer Enzyme in Schüttelkolben	112

5.4.2. Zellaufschluss.....	112
5.4.3. Proteinreinigung.....	112
5.4.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels CO-Differenzspektroskopie.....	113
5.4.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	114
5.5. Biotransformationen und Probenaufbereitung.....	114
5.5.1. High-Throughput-Screening im 96-Deep-Well-Format.....	114
5.5.2. <i>In vitro</i> Biotransformationen mit P450 Monooxygenasen.....	115
5.5.3. Probenaufbereitung für GC/MS-Analysen.....	116
5.5.4. <i>In vitro</i> Biotransformationen in Kombination mit Ketoreduktasen.....	116
5.5.5. <i>In vitro</i> Biotransformationen in Kombination mit Iminreduktasen.....	117
5.5.6. Probenaufbereitung für die chirale HPLC-Analyse.....	118
5.5.7. Kalibriergeraden zur Quantifizierung von Produktbildungen und Umsätzen.....	118
5.6. Analytische Methoden.....	118
5.6.1. Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS).....	118
5.6.2. Chirale Gaschromatographie.....	120
5.6.3. Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC).....	121
5.6.4. Chirale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	122
5.6.5. Polarimetrie.....	122
5.6.6. Hochauflösende Massenspektrometrie.....	122
5.6.7. NMR-Spektroskopie.....	122
5.7. Chemische Synthesen.....	123
5.7.1. Synthese von Deuterium-markierten Styrenen.....	123
5.7.2. Synthese von (<i>rac</i>)-2-Phenylethan-2- <i>d</i> -ol.....	124
5.7.3. Synthese von Mosher-Ester-Derivaten.....	124
5.7.4. Synthese von substituierten <i>trans</i> - β -Methylstyren-Derivaten.....	126
5.7.5. Synthese von substituierten 2-Methyl-3-phenyloxiran-Derivaten.....	132
5.7.6. Synthese von Phenylaceton-Derivaten.....	135
5.7.7. Synthese von <i>trans</i> -Zimtalkohol-Derivaten.....	136
5.7.8. Synthese von <i>N</i> -(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin.....	139
5.7.9. Synthese von 3-Phenylbutan-2-ol.....	140
5.8. Enzymatische Synthesen.....	141
5.8.1. Enzymatische Synthese von 2-Phenylethan-2- <i>d</i> -1-ol.....	141
5.8.2. Enzymatische Synthese von Phenylaceton.....	142
5.8.3. Enzymatische Synthese von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-1-Phenylpropan-2-ol.....	143
5.8.4. Enzymatische Synthese von (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin.....	144

6. Literaturverzeichnis	146
7. Anhang	165
7.1. Varianten des Panels zur Startpunktbestimmung.....	165
7.2. P450-katalysierte Nebenreaktion ausgehend von Epoxiden.....	165
7.3. Chromatogramme ausgewählter Biotransformationen.....	166
7.4. NMR-Spektren Deuterium-markierter Verbindungen.....	169
7.5. DNA- und Aminosäuresequenzen.....	173
7.6. Plasmidkarten.....	180
7.7. SDS-PAGE Analyse eingesetzter Lysate.....	182

Abkürzungsverzeichnis

% (m/v)	Massenanteil in Flüssigkeiten
% (v/v), Vol%	Volumenprozent
2-MeTHF	2-Methyltetrahydrofuran
a.u.	engl. <i>absorbance units</i>
Ac	Acetylgruppe
AcK	Acetatkinase
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
aMOx	anti-Markovnikov Oxygenase
ArM	engl. <i>artificial metalloenzyme</i>
AS	Aminosäure
Bcat	Catecholboran
BLAST	engl. <i>basic local alignment search tool</i>
Bn	Benzylidengruppe
bp	Basenpaar
Bz	Benzoyl-Gruppe
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
Cpd 0, I, II	engl. <i>Compound 0, I, II</i>
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
c_v	Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom P450
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	doppelt demineralisiertes Wasser
DEMS	Diethoxymethylsilan
DERA	Deoxyribose-5-Phosphat-Aldolase
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DG	engl. <i>directing group</i> , dirigierende Gruppe
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMMS	Dimethoxymethylsilan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTBM	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methoxyphenyl-Gruppe
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.r.	engl. <i>enantiomeric ratio</i> , Enantiomerenverhältnis
EDC	1,2-Dichlorethan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

e.e.	engl. <i>enantiomeric excess</i> , Enantiomerenüberschuss
EFI-EST	engl. <i>enzyme function initiative-enzyme similarity tool</i>
EI	Elektronenstoßionisation
eq.	engl. <i>equivalent</i> , Äquivalent
Et ₂ O	Diethylether
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FeS	Eisen-Schwefel-Ferredoxin
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
Fwd	engl. <i>forward</i> , vorwärts
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
GOase	Galactose Oxidase
Hal ⁻	Halogenid-Ion
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMT	Halogenid-Methyltransferase
HRMS	engl. <i>high-resolution mass spectrometry</i> , hochauflösende Massenspektrometrie
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IMAC	engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i> , Affinitätschromatographie
Int	Intermediat
<i>i</i> PrOH	Isopropanol
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRED	Iminreduktase
ISM	iterative Sättigungsmutagenese
Kat.	Katalysator
KRED	Ketoreduktase
KS	Ketonsynthase
LB-Medium	engl. <i>lysogeny broth</i> Medium
<i>LBv</i> -ADH	Ketoreduktase (Alkoholdehydrogenase) aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LV	Leervektor
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
M ⁺	ionisiertes Probenmolekül bzw. Molekülionenpeak
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MD	Molekulardynamik
Me	Methyl
MISO	engl. <i>multichange isothermal mutagenesis</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MTPA-Cl	α-Methoxy-α-(trifluoromethyl)phenylacetylchlorid, Mosher-Säurechlorid
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i>
n.b.	nicht bestimmt
NAC	engl. <i>near attack conformation</i> , nahe Angriffskonformation
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEDO	niedrige Elektroendosmose

NIST	engl. <i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NTA	Nitrilotriessigsäure
Nu	Nukleophil
OAH	Oleathydratase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
PanK	Pantothenatkinase
PAR	Phenylacetaldehyd-Reduktase
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	engl. <i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
PES	engl. <i>potential energy hypersurface</i> , Potentialhyperfläche
PFOR	engl. <i>phthalate family oxygenase reductase</i>
Pht	Phthalat
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
PPM	Phosphopentomutase
ppm	engl. <i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
Py ^{Me}	2-Amino-6-methylpyridin
QM/MM	engl. <i>quantum mechanics/molecular mechanics</i>
QQC	<i>quick quality control</i>
r.r.	engl. <i>regioisomeric ratio</i> , Regioisomerenverhältnis
<i>rac</i>	racemisch
rel. Akt.	relative Aktivität
Rev	engl. <i>reverse</i> , rückwärts
RF-Cloning	engl. <i>restriction-free cloning</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEGPPOS	(2 <i>H</i> ,2' <i>H</i> -[4,4'-Bi-1,3-benzodioxole]-5,5'-diyl)bis(diphenylphosphane)
SET	engl. <i>single electron transfer</i> , Einelektronenübertragung
SHC	Squalen-Hopen-Zyklase
SIM	engl. <i>selected ion monitoring</i>
SP	Sucrose-Phosphorylase
SPM	engl. <i>shortest path maps</i>
SSN	engl. <i>sequence similarity network</i> , Sequenzähnlichkeitsnetzwerk
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TB-Medium	engl. <i>terrific broth</i> Medium
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylether-Schutzgruppe
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TTN	engl. <i>total turnover number</i> , katalytische Produktivität
UHPLC	engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
ÜZ	Übergangszustand
δ	chemische Verschiebung

Dreibuchstabencode und Einbuchstabencode zur Abkürzung von Aminosäuren:

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

Abstract

The aerobic oxidation of unactivated internal alkenes to generate ketones with high regioselectivity is a very difficult catalytic transformation. Overcoming this hurdle is particularly useful because inexpensive and readily available alkenes can be used as starting materials, and ketones are often found as substructures in valuable products and as important intermediates in synthesis. Despite the high attractiveness of this reaction, with potential to streamline new synthetic routes, there is currently no efficient and general catalytic solution. This PhD thesis describes the directed evolution, mechanistic studies and application of a ketone synthase evolved from a cytochrome P450 enzyme that can regioselectively oxidize internal alkenes to ketones. This new enzyme function provides a solution to the current limitations in this research field.

The employed enzyme makes use of a high-valent metal-oxo complex as catalytic oxidant in the aerobic oxidation reactions performed. Such reactive metal-oxo complexes typically epoxidize alkenes, yet, the evolved enzyme achieves chemoselective carbonyl formation by controlling the reaction pathway of the oxo-transfer step. The final ketone synthase was evolved over twelve rounds of directed evolution, during which 18 mutations were introduced compared to the wildtype enzyme. Mechanistic studies revealed that the carbonyl formation is the result of a direct oxo-transfer without an epoxide intermediate. The carbonyl-selective pathway involves an 1,2-hydride shift which is highly *cis*- and enantioselective in the evolved enzyme. Further experimental work combined with computational studies performed by our collaboration partners show that the engineered enzyme promotes carbonyl formation and prevents epoxidation by controlling the conformations of radical and carbocation intermediates. Additional results demonstrate that this degree of catalyst-control is achieved by pronounced confinement, better preorganization and stronger rigidity of the active site in the evolved enzyme scaffold. Interestingly, 15 out of the 18 mutations introduced in the ketone synthase evolution are crucial to control chemoselectivity, although many of them are located far away from the active site. Additional computational studies suggest that these remote mutations contribute to the features of the substrate binding pocket by spanning a dynamic network all around the active site.

In order to understand the scope and limitation of this new enzyme function in synthesis, various studies have been performed. Besides *trans*- β -methylstyrene, which was used as substrate for directed evolution, numerous β -alkylstyrene derivatives were oxidized to ketones with high chemo- and regioselectivity with activities of up to 4750 total turnovers. In addition, the conversion of an α,β -disubstituted styrene provided access to a chiral ketone, enabled by an enantioselective 1,2-hydride migration. Although low in activity, this is the first reported example of an enantioselective, aerobic alkene to ketone oxidation. Several reactions with the ketone synthase as stand-alone catalyst or in combination with other established biocatalysts were performed on preparative scale (1.0 mmol). By employing the evolved enzyme in short one-pot cascades, the new enzyme function was used for formal, regio- and enantioselective hydrations and hydroaminations of internal alkenes. Particularly interesting was the combination with ketoreductases or imine reductases, which allowed the synthesis of chiral alcohols and amines from internal alkenes. In the preparative scale reactions carried out, the products were obtained with good isolated yields (up to 69%) and excellent enantioselectivities (up to >99% e.e.). Such conversions of internal alkenes to chiral alcohols and amines are generally very difficult to achieve in catalysis. This work highlights how engineered new enzyme functions can be used to shorten synthetic routes to relevant compounds directly from simple starting materials, offering a proposal to overcome long-standing limitations in catalysis.

Zusammenfassung

Die aerobe Oxidation von unaktivierten internen Alkenen zur Erzeugung von Ketonen mit hoher Regioselektivität ist eine sehr schwierige katalytische Transformation. Die Überwindung dieser Hürde ist besonders nützlich, da kostengünstige und leicht verfügbare Alkene als Ausgangsmaterial verwendet werden können und Ketone häufig als Substrukturen in wertvollen Produkten sowie als wichtige Zwischenprodukte in der Synthese zu finden sind. Trotz der hohen Attraktivität dieser Reaktion, die das Potenzial hat, neue Syntheserouten zu rationalisieren, gibt es derzeit keine effiziente, universell einsetzbare katalytische Lösung. Diese Dissertation beschreibt die gerichtete Evolution, mechanistische Studien und Anwendung einer Ketonsynthase, die ausgehend von einem Cytochrom P450-Enzym entwickelt wurde und die Fähigkeit besitzt, interne Alkene regioselektiv zu Ketonen zu oxidieren. Diese neue Enzymfunktion bietet einen möglichen Lösungsansatz für die derzeitigen Limitierungen in diesem Forschungsbereich.

Das eingesetzte Enzym verwendet einen hochvalenten Metall-Oxo-Komplex als katalytisches Oxidationsmittel für die Durchführung aerober Oxidationsreaktionen. Solche reaktiven Metall-Oxo-Komplexe werden in der Regel zur Epoxidierung von Alkenen eingesetzt. Im Gegensatz dazu ermöglicht das entwickelte Enzym eine chemoselektive Carbonylbildung, indem es den Reaktionsweg des Oxo-Transferschritts kontrolliert. Die finale Ketonsynthase wurde in zwölf Runden gerichteter Evolution entwickelt, indem 18 Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eingeführt wurden. Mechanistische Untersuchungen ergaben, dass die katalysierte Carbonylbildung das Ergebnis eines direkten Oxo-Transfers ohne Epoxid-Zwischenstufe ist. Der carbonylselektive Weg umfasst dabei eine 1,2-Hydridmigration, die hochgradig *cis*- und enantioselektiv ist. Weitere experimentelle Arbeiten in Verbindung mit computergestützten Studien unserer Kollaborationspartner zeigten, dass das evolvierte Enzym die Carbonylbildung begünstigt und die Epoxidierung durch die Kontrolle der Konformationen von Radikal- und Carbokation-Intermediaten hemmt. Weitere Ergebnisse zeigen, dass diese ausgeprägte Katalysatorkontrolle durch eine bessere Vororganisation und stärkere Rigidität des aktiven Zentrums innerhalb des entwickelten Enzymgerüst erreicht wird. Interessanterweise sind 15 der 18 Aminosäuresubstitutionen, die im Laufe der Evolution der Ketonsynthase vorgenommen wurden, entscheidend für die Kontrolle der Chemoselektivität, obwohl viele von ihnen weit vom aktiven Zentrum entfernt liegen. Weitere computergestützte Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese entfernten Mutationen zu den Eigenschaften der neu geschaffenen Substratbindungstasche beitragen, indem diese ein dynamisches Netzwerk rund um das aktive Zentrum aufspannen.

Um die Anwendungsbreite und die Limitierungen dieser neuen Enzymfunktion in der Synthese zu verstehen, wurden verschiedene Studien durchgeführt. Neben *trans*- β -Methylstyren, das als

Modellsubstrat für die gerichtete Evolution verwendet wurde, wurden zahlreiche β -Alkylstyren-Derivate mit hoher Chemo- und Regioselektivität zu Ketonen oxidiert. Dabei konnten Aktivitäten von bis zu 4750 TTN erreicht werden. Darüber hinaus ermöglichte die Umwandlung eines α,β -disubstituierten Styrens den Zugang zu einem chiralen Keton, indem die enantioselektive 1,2-Hydridmigration ausgenutzt wurde. Obwohl die ermittelte Aktivität gering ist, ist dies das erste berichtete Beispiel für eine enantioselektive, aerobe Oxidation von Alkenen zu Ketonen. Es wurden mehrere Reaktionen mit der Ketonsynthese allein oder in Kombination mit anderen etablierten Biokatalysatoren im präparativen Maßstab (1.0 mmol) durchgeführt. Durch den Einsatz des evolvierten Enzyms in kurzen Ein-Topf-Kaskaden wurde die neue Enzymfunktion für formale, regio- und enantioselektive Hydratisierungen und Hydroaminierungen von internen Alkenen genutzt. Besonders interessant war die Kombination mit Ketoreduktasen oder Iminreduktasen, was die Synthese chiraler Alkohole oder Amine aus internen Alkenen ermöglichte. Bei den im präparativen Maßstab durchgeführten Reaktionen wurden die Produkte mit guten isolierten Ausbeuten (bis zu 69%) und ausgezeichneten Enantioselektivitäten (bis zu >99% e.e.) erhalten. Derartige Umwandlungen von internen Alkenen zu chiralen Alkoholen und Aminen sind in der Regel katalytisch sehr schwierig zu erreichen. Diese Arbeit zeigt, wie neue Enzymfunktionen eingesetzt werden können, um Synthesewege zu relevanten Verbindungen direkt aus einfachen Ausgangsstoffen zu verkürzen und bietet einen Vorschlag zur Überwindung seit langem bestehender Einschränkungen in der Katalyse.

1. Einleitung

Zur Herstellung höherwertiger chemischer Verbindungen werden in der chemischen Industrie insbesondere Alkene als Ausgangsmaterial herangezogen. Ausschlaggebend ist die große Verfügbarkeit von Alkenen durch Raffination fossiler Rohstoffe sowie die aktuell niedrigen Marktpreise petrochemischer Produkte. Alkene können zudem aus erneuerbaren Ressourcen sowie aus etablierten Reaktionen wie der Olefinmetathese¹ und der Carbonylolefinierung² leicht zugänglich gemacht werden. Attraktiv sind diese ungesättigten Verbindungen aufgrund ihrer erhöhten Reaktivität, sodass sie auf vielseitige Weise weiter funktionalisiert werden können. Durch elektrophile Addition von Wasser, Ammoniak oder Halogenwasserstoffen an die olefinische C=C-Doppelbindung können so beispielsweise Alkohole, Amine oder Halogenkohlenwasserstoffe gebildet werden.³ Im Allgemeinen bestimmen sterische und elektronische Effekte die Addition einer Verbindung „H-Nu“ an Olefine gemäß der Markovnikov-Regel.⁴ Diese besagt, dass Protonen einer solchen Verbindung an das H-reichere C-Atom einer unsymmetrisch substituierten C=C-Doppelbindung addieren, während Nukleophile auf das H-ärmere C-Atom übertragen werden. Ausschlaggebend für diese Regioselektivität ist die höhere Stabilität des carbokationischen Intermediats, welches zur Bildung des Markovnikov Produkts führt (**Abbildung 1, A**).^{4,5}

Oxyfunktionalisierungen von Alkenen zur Synthese von Ketonen, Aldehyden, Diolen, Alkoholen und Epoxiden sind ebenfalls sehr relevante Transformationen in der Chemie (**Abbildung 1, B**).^{6,7} Zur Kontrolle der Chemo-, Regio- und Stereoselektivität und zur Verbesserung der Ökobilanz dieser Reaktionen werden in der chemischen Industrie vermehrt katalytische Ansätze genutzt. Auf effiziente Weise ermöglichen Katalysatoren Zugang zu chiralen Pharmazeutika oder anderen hochwertigen Produkten des täglichen Lebens. Viele katalytische Umsetzungen von Alkenen haben sich in der Synthesechemie bereits etabliert, wie beispielsweise asymmetrische Dihydroxylierungen oder Epoxidierungen.⁸⁻¹⁰ Ein weiteres nennenswertes Verfahren zur direkten Synthese von Carbonylen aus Alkenen ist die Palladium-katalysierte Wacker-Tsuji-Oxidation, die auch im industriellen Maßstab angewendet wird (Wacker-Hoechst-Verfahren).¹¹⁻¹³ Terminale Alkene können mit dieser Methode regioselektiv zu Methylketonen umgesetzt werden. Die komplementäre anti-Markovnikov Selektivität zur Bildung von Aldehyden aus denselben Edukten ist mit dem Wacker-Tsuji-Protokoll trotz Anpassungen nur schwer zu erreichen.¹⁴ Umso anspruchsvoller ist die Kontrolle der Regioselektivität bei der direkten Oxidation unsymmetrisch substituierter interner Alkene zu Ketonen.¹⁵ Beide genannten Transformationen haben großes Potential in der organischen Synthese, da sie verkürzte oder gar neue Syntheserouten ermöglichen können. Aus diesem Grund werden seit längerer Zeit effiziente und atomökonomische Katalysatorsysteme erforscht, die Limitierungen der regioselektiven Alken-zu-Carbonyl-Oxidation überwinden können.

Der besondere Fokus dieser Arbeit liegt auf der katalytischen, carbonylselektiven Oxidation von terminalen sowie internen Alkenen mit Regiokontrolle. In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in diesem Forschungsfeld erzielt werden. Der heutige Stand der Forschung auf diesen Gebieten wird in den nachfolgenden Kapiteln genauer beleuchtet. Zudem wird geprüft, ob Enzyme für diese nicht-natürliche Transformation entwickelt (*engineered*) werden können. Ziel dieser Arbeit ist es Vorschläge zu unterbreiten, wie bestehende Limitierungen der katalytischen Oxidation mithilfe von Enzymen adressiert werden können und daraufhin eine geeignete Lösung zu erforschen.

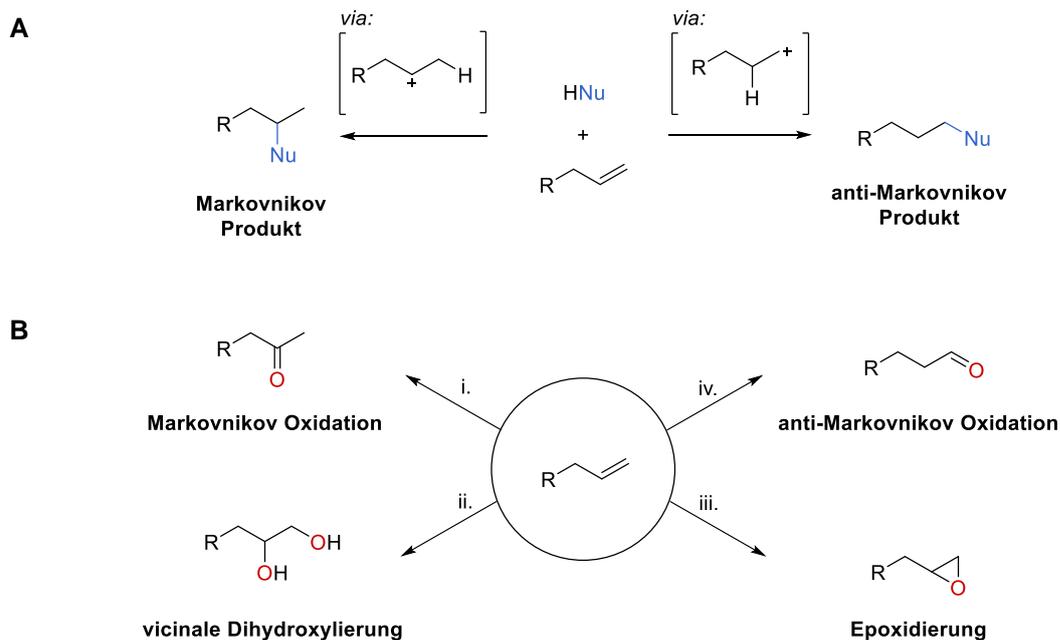


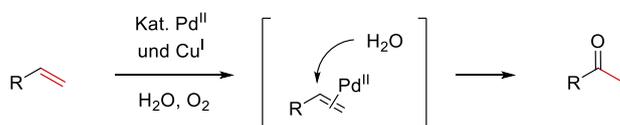
Abbildung 1 – (A) Additionsreaktion an terminale Alkene nach der Regel von Markovnikov. Die Regioselektivität wird durch die Stabilität intermediärer Carbokation-Intermediate determiniert. (B) Übersicht mit Beispielreaktionen zur katalytischen Oxyfunktionalisierung von Alkenen. (i.) Palladium-katalysierte Wacker-Oxidation mit Markovnikov-Regioselektivität.^{11,12} (ii.) Sharpless-Dihydroxylierung mit Osmium(VIII)-oxid.^{9,9} (iii.) Jacobsen-Katsuki-Oxidation mit Mangan(III)-Salen-Katalysatoren.¹⁰ (iv.) Für die anti-Markovnikov Oxidation stehen nur wenig effiziente katalytische Methoden zur Verfügung.

1.1. Direkte, katalytische Oxidation von Alkenen zu Carbonylen

1.1.1. Carbonylselektive Oxidation terminaler Alkene – wie kann die Regioselektivität kontrolliert werden?

Die wohl wichtigste Methode zur carbonylselektiven Oxidation terminaler Alkene ist die Palladium-katalysierte Wacker-Oxidation (**Abbildung 2, A**). Mit hoher Effizienz und großer Toleranz gegenüber anderen funktionellen Gruppen können hiermit diverse Methylketone im Labor, aber auch im technischen Maßstab hergestellt werden.^{11,12,16} Die Regioselektivität folgt dabei der Markovnikov-Regel und ist strikt substratkontrolliert.³

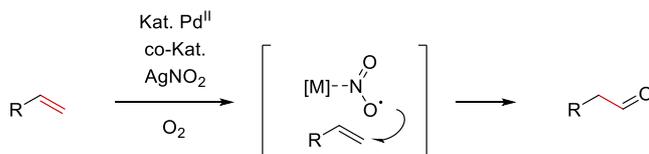
A – Wacker-Oxidation



Substrate: Alle Arten von terminalen Alkenen

Oxidant: O₂

B – Modifizierte Wacker-Oxidationen

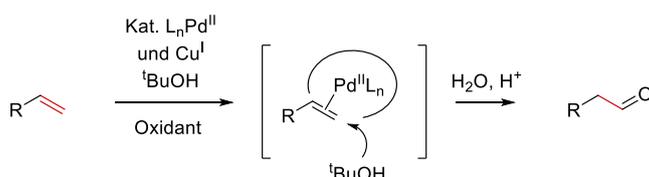


Substrate: Styrene, aliphatische Alkene, allylische Ester

Radikalischer Angriff:

Oxidant: O₂

<20 TTN

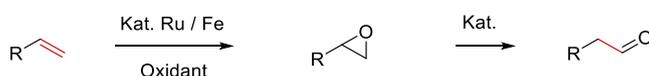


Angriff sterisch anspruchsvoller Alkohole:

Oxidant: Benzochinon, O₂

<40 TTN

C – Epoxidierung-Isomerisierung Kaskade



Substrate: Styrene, aliphatische Alkene

Oxidant: Iodosylbenzen, O₂

<200 TTN

Abbildung 2 – Methoden zur carbonylselektiven Funktionalisierung von terminalen Alkenen mit Markovnikov oder anti-Markovnikov-Regioselektivität. **(A)** Wacker-Oxidation zur Darstellung von Methylketonen mit Markovnikov-Selektivität. **(B)** Die Regioselektivität der Wacker-Oxidation kann durch Additive wie Nitrite (radikalischer Angriff) oder durch den Angriff sterisch anspruchsvoller Alkohole am terminalen Kohlenstoffatom umgekehrt werden. **(C)** Tandem Epoxidierung-Isomerisierung Kaskade zur Generierung von anti-Markovnikov-Aldehyden. Genau genommen handelt es sich hierbei um keine direkte Oxidationsmethode, sondern um eine sequenzielle Methode *via* einem Epoxid-Intermediat. Einsetzbare terminale Alkene, die benötigten Oxidationsmittel sowie die berechneten katalytischen Produktivitäten der vorgestellten Methoden sind aus der Literatur zusammengefasst angegeben.

Um die entgegengesetzte Selektivität zu erreichen sind Katalysator-kontrollierte Ansätze nötig, die einen polaren Angriff des Sauerstoff-Nukleophils am höher substituierten Kohlenstoffatom verhindern. Abwandlungen des Wacker-Protokolls nutzen beispielsweise Silbernitrit als Co-Katalysator und ermöglichen einen radikalischen Angriff des aktivierten Sauerstoffs an die C=C-Doppelbindung mit anti-Markovnikov-Selektivität (**Abbildung 2, B**).¹⁷⁻²⁰ Der Angriff am terminalen Kohlenstoffatom erfolgt begünstigt, da im Folgenden das stabilere sekundäre Radikal-Intermediat entsteht. Auch der Einsatz sterisch anspruchsvoller Sauerstoff-Nukleophile wie *tert*-Amylalkohol oder *tert*-Butylalkohol können den Angriff des Sauerstoffs zum terminalen Kohlenstoff umlenken und für die umgekehrte Selektivität sorgen.^{14,21} Durch säurekatalysierte Hydrolyse des Vinylethers entsteht letztlich das entsprechende anti-Markovnikov Produkt. Außerdem können dirigierende Gruppen des Substrats Einfluss auf die Regioselektivität entfalten, indem sie unter anderem mit dem Zentralatom des Katalysators interagieren.²²⁻²⁵ Neben modifizierten Wacker-Oxidations-Protokollen wird auch die Epoxidierung-Isomerisierung zur Synthese von Aldehyden ausgehend von terminalen Alkenen genutzt (**Abbildung 2, C**).²⁶⁻²⁹ Hierbei handelt es sich jedoch um keine direkte Oxidation, sondern um eine Reaktionsabfolge, die über ein Epoxid-Intermediat führt.

Alle genannten katalytischen Ansätze für die anti-Markovnikov Oxidation terminaler Alkene benötigen Edelmetalle in hohen Konzentrationen oder zusätzlich teure und toxische Reagenzien in stöchiometrischen Mengen. Darüber hinaus sind all diese aufgeführten Methoden durch geringe katalytische Aktivitäten gekennzeichnet. Ein universeller, katalysatorgesteuerter Ansatz für die aldehydselektive Oxidation mit geringen Katalysatorbeladung unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel bleibt daher weiterhin ein schwer entwickelbares, aber ersehntes Werkzeug in der organischen Synthese.

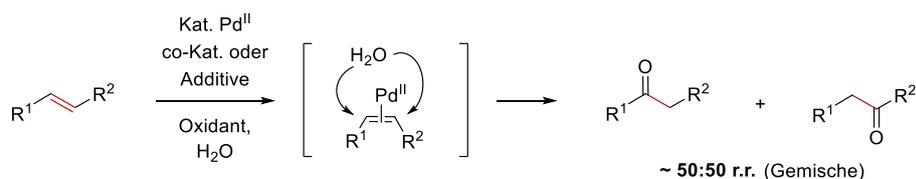
1.1.2. Regioselektive Oxidation interner Alkene zu Ketonen

Ketone sind wesentliche Struktur motive in Arzneimitteln, Agrochemikalien und Naturstoffen. Sie werden auch als vielseitige Zwischenprodukte in zahlreichen organischen Reaktionen eingesetzt, einschließlich der Synthese chiraler Alkohole und Amine.^{30,31} Daher wird seit langem nach effizienten katalytischen Methoden für die Herstellung von Ketonen gesucht. Die selektive Ketonsynthese durch eine direkte aerobe Oxidation interner Alkene wäre eine leistungsstarke Ergänzung der bestehenden Methoden, die häufig geringe Regioselektivitäten aufweisen. Umsetzungen unaktivierter, unsymmetrisch substituierter interner Alkene führen mit bekannten Wacker-Tsuji Protokollen in der Regel zu Keton-Mischungen (**Abbildung 3, A**).^{15,32-34} Aufgrund des Mangels an effizienten und selektiven Katalysatoren ist die Hydroborierungs-Oxidations-

Methode mit giftigen und teuren Boranen daher immer noch weit verbreitet.^{35,36} Neben solchen Methoden, die Reagenzien in stöchiometrischen Mengen verwenden, wurden neuerdings jedoch verschiedene katalytische Strategien für den selektiven Zugang zu Ketonen aus internen Alkenen entwickelt. Insbesondere wurde versucht, die gut untersuchte Wacker-Tsuji-Oxidation von terminalen Alkenen durch selektivitätssteigernde Anpassungen auf interne Alkene zu erweitern. Hohe Regioselektivitäten bei modifizierten Wacker-Tsuji-Oxidation hängen dabei von spezifischen internen Alkenen ab, die entweder C_2 -Symmetrie aufweisen oder dirigierende Gruppen tragen, die die Bildung eines Ketons gegenüber dem anderen begünstigen (**Abbildung 3, B**). Solche substratkontrollierten Selektivitäten beruhen zum einen auf der Koordination der dirigierenden Gruppe (z.B. -OBn, -OBz oder -NPht) mit dem Metallzentrum, was letztlich über den Angriff des Sauerstoff-Nukleophils bestimmt. Alternativ können induktive Effekte von CF_3 -Gruppen genutzt werden, um die Regioselektivität der Nukleopalladierung zu kontrollieren. Bei Palladium-katalysierten Oxidationen nach Wacker sind interne Alkene jedoch weniger reaktiv, was zu einer hohen Katalysatorbelastung und folglich zu niedrigen Gesamtumsatzzahlen (<20 TTN) führt. Darüber hinaus sind viele dieser Protokolle keine aeroben Oxidationen, da sie von stöchiometrischen Oxidationsmitteln wie Peroxiden oder Benzochinonen abhängen. Eine nennenswerte aerobe Methode zur regioselektiven Oxidation interner β -Alkylstyrene ist die Eisen-katalysierte Oxidation vom Wacker-Typ (**Abbildung 3, C**).^{31,37} Ein radikalischer Mechanismus ist hierbei der Schlüssel zur Bildung nur eines der beiden möglichen Keton-Regioisomere. Die entgegengesetzte Regioselektivität ist mit einem kürzlich veröffentlichten dual-photokatalytischen Ansatz erreichbar, der Wasser als terminales Oxidationsmittel nutzt (**Abbildung 3, D**).³⁸

Während Wacker-artige Oxidationen terminaler Alkene zur regioselektiven Bildung von Methylketonen in der organischen Synthese bereits seit längerem etabliert sind, existieren für die anti-Markovnikov Oxidation terminaler Alkene sowie die regioselektive Keton-Oxidation interner Alkene nach wie vor keine Katalysatorsysteme auf demselben Effizienz-Level. Aus diesem Grund sind weiterhin viele Verbesserungen notwendig, um Carbonyle mit spezieller Selektivität gezielt aus Alkenen zu generieren und diese Methoden für verkürzte Syntheserouten zu relevanten Molekülen nutzbar zu machen. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Entwicklung eines engineereten Enzyms, das diese anspruchsvolle Oxidationschemie ermöglicht. Dabei wird das Potential von Enzymen genutzt, energiereiche Reaktionsintermediate in einer makromolekularen Umgebung zu stabilisieren, was die gezielte Steuerung von Chemo- und Regioselektivitäten erlaubt. Für den selektiven Übertrag von Sauerstoff kommen dabei insbesondere Enzyme in Frage, die O_2 über Metall-Oxo-Komplexe auf Alkene übertragen können, wie es beispielsweise für Cytochrom P450 Monooxygenasen^{39,40} oder Peroxygenasen⁴¹ der Fall ist.

A – Wacker-Tsuji Oxidation

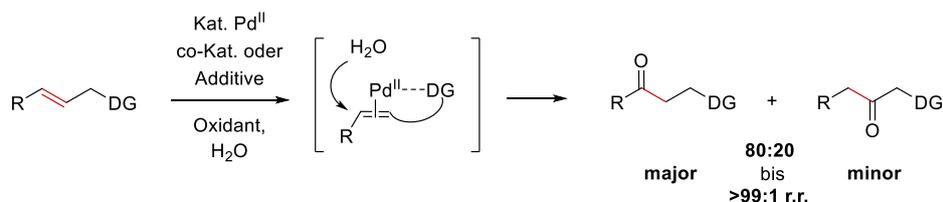


Substrate:
aliphatische interne
Alkene, β -Alkylstyrene,
ungesättigte Fettsäuren

Oxidant: TBHP, O₂
oder Benzochinon

<20 TTN

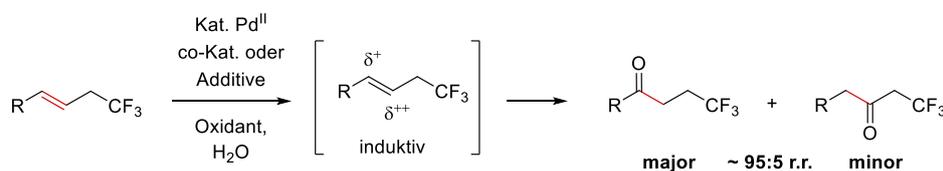
B – Regioselektive Wacker Oxidation durch Substratkontrolle



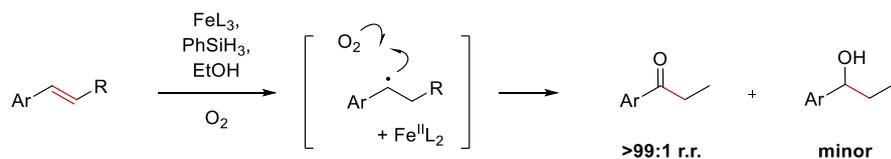
Substrate:
Allyl-/Homoallylester,
Ether und
Phthalimide

Oxidant: TBHP, O₂
oder Benzochinon

<20 TTN



C – Eisen-katalysierte Oxidation vom Wacker-Typ

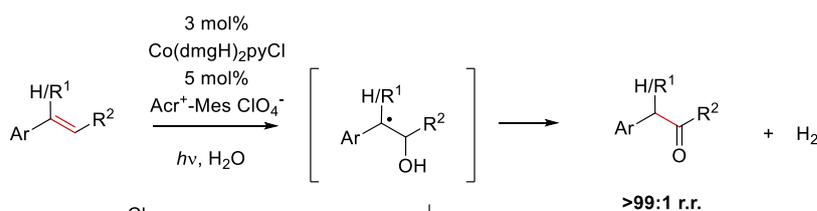


Substrate:
aliphatische interne
Alkene, β -Alkylstyrene

Oxidant: O₂

<30 TTN

D – Photokatalytische, dehydrierende Oxygenierung



Substrate:
(α) β -Alkylstyrene,
konjugierte interne
Alkene

Oxidant: H₂O

<30 TTN

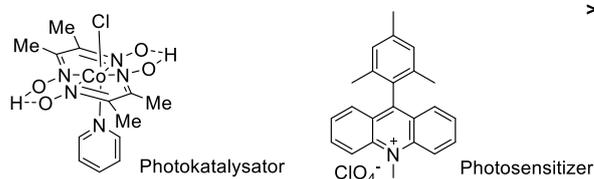


Abbildung 3 – Methoden zur ketonselektiven Funktionalisierung von unsymmetrisch substituierten internen Alkenen mit Regioselektivität. **(A)** Die Palladium-katalysierte Wacker-Tsuji Oxidation führt zu Keton-Gemischen mit geringen Regioselektivitäten. **(B)** Anpassungen des Wacker-Tsuji-Protokolls zur Steigerung der Regioselektivität durch Substratkontrolle. Dirigierende Gruppen (DG) oder Substituenten mit stark induktiver Wirkung führen zu einer Modulation der Selektivität. **(C)** Eisen-katalysierte Oxidation vom Wacker-Typ mit Phenylsilan als Additiv. Die Insertion des Olefins in einen Eisen(III)-Hydrid Komplex führt zur Bildung einer im Gleichgewicht vorliegenden radikalischen Spezies, gefolgt von einem radikalischen Angriff von Luftsauerstoff. **(D)** Photokatalytischer Ansatz mit zwei Katalysatoren zur ketonselektiven Oxidation mit absoluter Regiokontrolle. Die berichteten Substrate aller Methoden, die Art des verwendeten Oxidationsmittels sowie die berechnete katalytische Produktivität (in TTN, bezogen auf die Katalysatorbeladung) sind angegeben.

1.2. Cytochrom P450 Monooxygenasen – Oxidationschemie genetisch codiert

Cytochrom P450 Monooxygenasen (P450s) gehören zur Familie der NAD(P)H-abhängigen, Hämhaltigen Oxidoreduktasen und katalysieren eine Vielzahl komplexer Oxidationsreaktionen.⁴⁰ Dabei nutzen sie atmosphärischen Sauerstoff und katalysieren den Übertrag eines Sauerstoffatoms auf das Substratmolekül. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Dieser einzigartige Katalysezyklus ermöglicht beispielsweise chemo-, regio- und enantioselektive Hydroxylierungen nicht-aktivierter C-H-Bindungen oder Epoxidierungen von C=C-Doppelbindungen.^{42,43} Dieses Potenzial wird in biologischen Systemen zur Synthese lebensnotwendiger Verbindungen (Lipide, Steroide, Vitamine) oder zum Abbau xenobiotischer Substanzen genutzt.⁴⁴⁻⁴⁷ Ihren Namen verdankt diese Enzymklasse einer besonderen spektroskopischen Eigenschaft. Durch Koordination von Kohlenmonoxid an reduziertes Häm-Eisen erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums (Soret-Bande) von 420 nm (Fe^{II} , ohne Substrat) zu 450 nm ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$).^{48,49}

Die Aktivität von P450s wird durch das reaktive Intermediat *Compound I* bestimmt. Dieses hoch-valente Oxo-Eisen(IV) Porphyrin- π -Radikalkation wird schrittweise durch zweifachen Elektronenübertrag durch den Cofaktor NAD(P)H und durch Aktivierung von Luftsauerstoff gebildet (**Abbildung 4, A**).^{40,50-53} Der Schlüsselschritt, der zur Hydroxylierung von nicht-aktivierten C-H-Bindungen führt, ist nach heutigem Kenntnisstand ein radikalischer *Rebound*-Mechanismus, welcher durch Abstraktion eines Wasserstoffradikals vom Substrat durch *Compound I* eingeleitet wird. Anschließend führt eine homolytische Abspaltung eines Hydroxyl-Radikals (aus *Compound II*) zur Rekombination mit dem zuvor gebildeten Substratradikal und führt schließlich zum hydroxylierten Produkt. Der aktivierte Sauerstoff in Form von *Compound 0* oder *Compound I* kann jedoch auch in Entkopplungsreaktionen (*uncoupling*) in einer unspezifischen Bildung von Wasserstoffperoxid oder Wasser resultiert. Die letztgenannte Nebenreaktion senkt die Produktivität von P450s aufgrund des Verbrauchs weiterer Reduktionsäquivalente des Cofaktors NAD(P)H.

Das Substrat- und Reaktionsspektrum von P450s ist sehr breit und ist nicht nur auf die Hydroxylierung aliphatischer und aromatischer Verbindungen limitiert. So sind eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme dieser Familie bekannt, die Epoxidierungen, Dealkylierungen, Desaturierungen sowie Sulfoxidierungen katalysieren können (**Abbildung 4, B**). Auch ungewöhnliche Transformationen wie C-C-Bindungsknüpfungen oder Terpen-Zyklisierungen mit P450s wurden beobachtet. Dies zeigt, wie effizient ein in der Natur vorhandener katalytischer Mechanismus angepasst werden kann, sodass er universell für diverse Oxyfunktionalisierungen einsetzbar ist.⁵⁴⁻⁵⁷

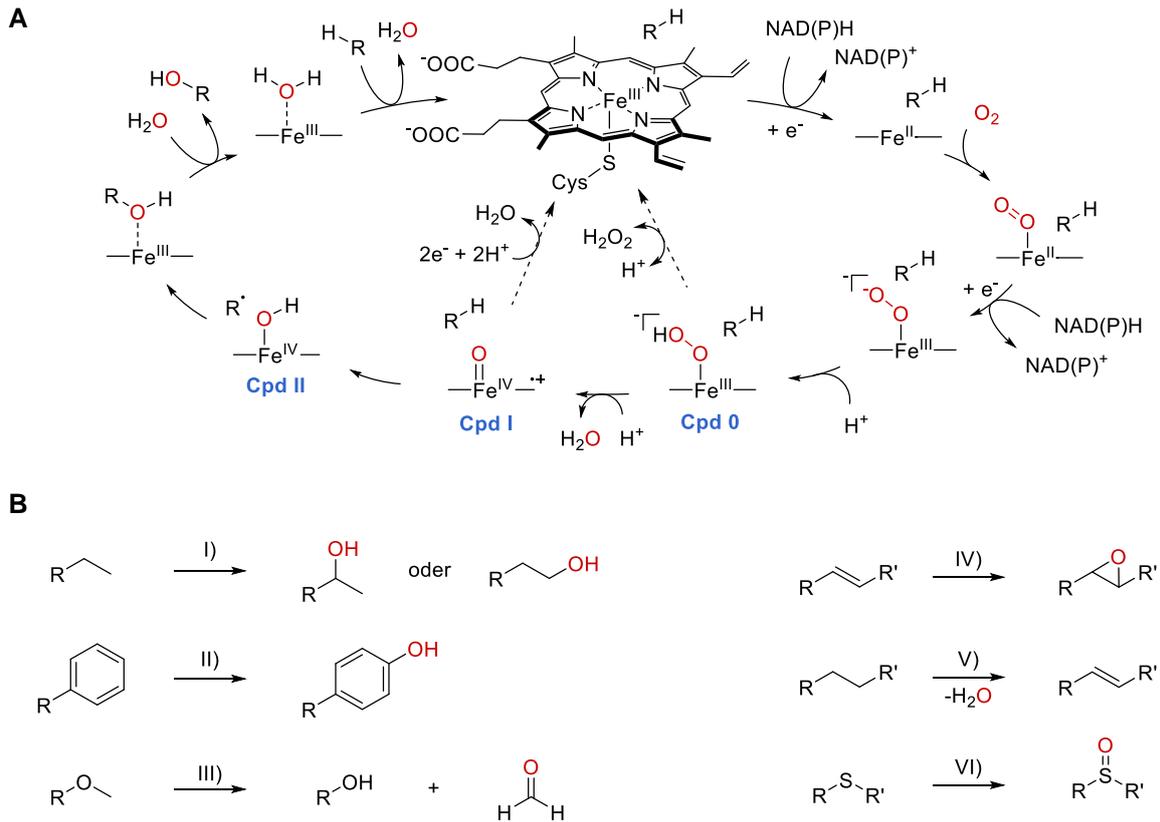


Abbildung 4 - (A) Schematische Übersicht des Katalysezyklus von P450s am Beispiel der C-H-Hydroxylierung. Der Häm-Cofaktor wird durch Eintritt des Substrats in das aktive Zentrum und nachfolgendem Elektronenübertrag von NAD(P)H über den fusionierten Redox-Partner in einen reduzierten Zustand überführt. Nach der Bindung eines Sauerstoffmoleküls, einem weiteren Reduktionsschritt sowie einer Protonierung entsteht eine intermediäre Eisen-Hydroperoxo-Spezies (*Compound 0*). Eine weitere Protonierung führt zur O-O-Bindungsspaltung und resultiert in der reaktiven Spezies *Compound I*. Dieses Intermediat kann nun über einen *Rebound*-Mechanismus zum hydroxylierten Produkt führen oder über den Oxidase-Shunt, durch Verbrauch weiterer Reduktionsäquivalente, zu einer entkoppelten Reaktion führen (gestrichelter Pfeil ausgehend von *Cpd I*). Anschließend kann der Katalysezyklus von Neuem beginnen. (B) Übersicht über einige Reaktionen, die von P450s katalysiert werden können. I)/II) Regioselektive C-H-Hydroxylierungen von aliphatischen oder aromatischen Verbindungen, III) Dealkylierung als Folgereaktion einer vorangegangenen Hydroxylierung, IV) Epoxidierung von C=C-Doppelbindungen, V) Desaturierung als Nebenreaktion von Hydroxylierungen (Abstraktion eines zweiten Wasserstoffradikals) und VI) Sulfoxidierung von Thiolen.

Im Laufe der natürlichen Evolution haben sich neben vielfältigen Reaktivitäten auch verschiedene P450-Klassen innerhalb der Superfamilie entwickelt, um dezidierte metabolische Funktionen in lebenden Systemen auszuführen. Allen P450s gemein ist die Bildung des reaktiven *Compound I* Intermediats in der Häm-Domäne, welche das zentrale Tertiärstrukturelement dieser Enzymfamilie darstellt. Dieser Teil des Enzyms ist vor allem in der Umgebung des Häm-Cofaktors hoch konserviert. Neben essentiellen α -helikalen Strukturen (*four-helix bundle*) und zwei β -Faltblättern wird der Häm-Cofaktor durch einen Häm-bindenden Loop im aktiven Zentrum verankert.^{58,59} Dabei wird das Häm-Eisen durch einen proximalen Cystein-Liganden koordiniert, der auf einem Loop-Bindemotiv liegt, welcher für alle P450s identisch ist (FxxGxxxCxG).⁶⁰ Dennoch ist genug struktureller Spielraum gegeben, um je nach Enzym-Klasse die

unterschiedlichsten Substrate in der aktiven Tasche zu akkommodieren. Vor allem die α F-Helix und der F/G-Loop sind für die substratspezifische Steuerung der Aktivität und Selektivität besonders relevant (**Abbildung 33, A**).⁶¹

Um den Katalysezyklus in P450s zu ermöglichen, ist ein Übertrag von Elektronen auf die Häm-Domäne vonnöten. Dies erfolgt durch Interaktion mit Redox-Partnern wie Flavoenzymen oder Eisen-Schwefel-Proteinen, die ihrerseits von Nicotinamid-Cofaktoren wie NAD(P)H reduziert werden. Bezüglich dieser Interaktion von Häm-Domäne und Redox-Partnern haben sich in der Natur verschiedenen Lösungen und Konstellationen entwickelt und ermöglichen eine Unterteilung der P450-Superfamilie in insgesamt zehn Klassen (**Abbildung 5, A**).⁶²⁻⁶⁴ Außerdem wird die ausgesprochen große Vielfalt der Cytochrom P450 Monooxygenasen auf Grundlage ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Für die Namensgebung wird eine systematische Nomenklatur angewendet, die aus dem Präfix CYP (Abkürzung für Cytochrom P450) und einer spezifischen Nummer zusammengestellt wird. Für jede P450-Familie mit mindestens 40% Sequenzidentität wird eine Nummer vergeben, gefolgt von einem Buchstaben für die jeweilige Unterfamilie (>55% Sequenzidentität). Jede individuelle Sequenz wird außerdem mit einer eigenen Ziffer versehen.⁶⁵

Für die Biokatalyse sind Enzyme der Klassen VII und VIII am bedeutendsten (**Abbildung 5, A**).^{62,66} Hierbei handelt es sich um komplett fusionierte P450s, die Häm-Domäne und Redox-Partner auf einem gemeinsamen Polypeptidstrang vereinen. Für eine katalytische Anwendung in der Synthese sind solche autarken Monooxygenasen (*self-sufficient* P450s) besonders attraktiv, da nicht alle Komponenten separat exprimiert werden müssen. In dieser Arbeit wird vor allem die Unterfamilie der CYP116B-Enzyme aus Klasse VII studiert, da diese Vertreter ein sehr breites Substrat- und Reaktionsspektrum umfassen und ein ausgeprägtes promiskuitives Verhalten aufzeigen.^{67,68} Zudem wurde für CYP116B46 zum ersten Mal die Kristallstruktur des gesamten Konstrukts in voller Länge ermittelt (**Abbildung 5, B**).⁶⁹ Diese Strukturdaten können als Templat zum Erstellen von Homologiemodellen herangezogen werden und damit das *enzyme engineering* von Enzymvertretern dieser Klasse deutlich erleichtern. CYP116 Enzyme konnten in der Vergangenheit bereits gentechnisch modifiziert werden, um neue Reaktivitäten sowie bessere Aktivitäten und Selektivitäten zu ermöglichen.⁷⁰⁻⁷²

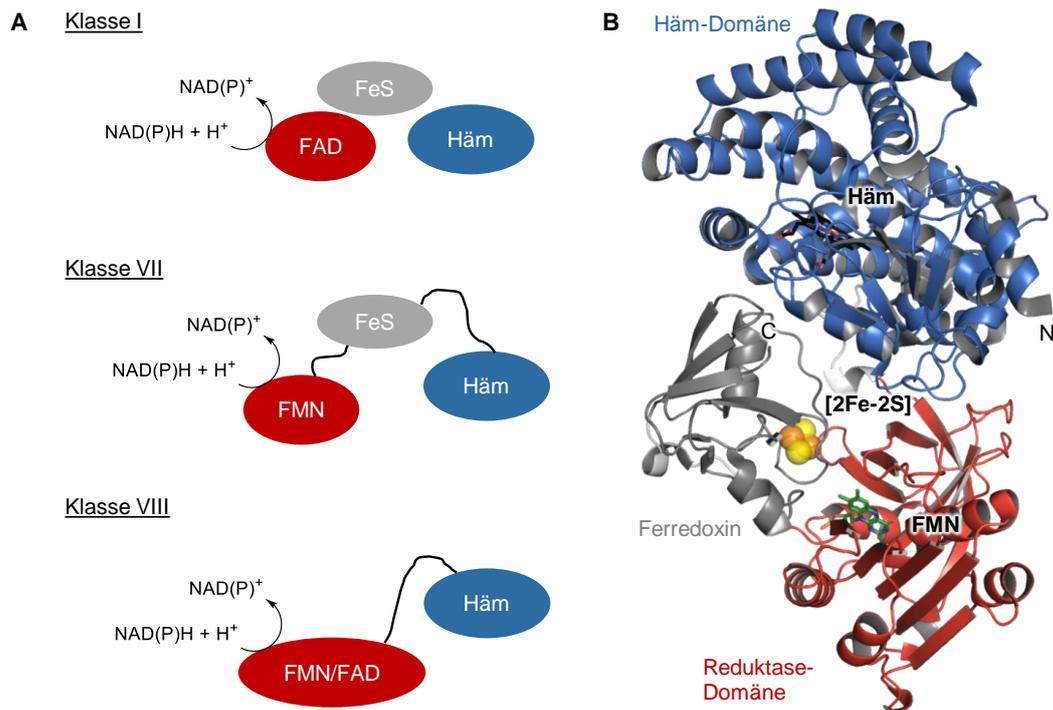


Abbildung 5 – (A) Schematische Darstellung der Architektur von P450-Enzymen aus den drei wichtigsten von insgesamt zehn Klassen.^{62,64} Klasse I beinhaltet die meisten P450-Vertreter von überwiegend prokaryotischem und mitochondrialem Ursprung. Es handelt sich um ein Dreikomponentensystem aus Häm-Domäne, FAD-enthaltender Reduktase (FAD) und einem Eisen-Schwefel-Ferredoxin (FeS), welche nicht miteinander fusioniert sind. Bei Vertreter der Klassen VII und VIII sind im Gegensatz dazu alle Komponenten miteinander verbunden und liegen in Form eines einzigen Proteins vor. Repräsentanten der Klasse VII bestehen aus einer Häm-Domäne, die C-terminal mit einer Phthalat-Reduktase-Domäne einer Dioxygenase (PFOR) fusioniert ist. Ein Beispiel für ein Enzym der Klasse VIII ist P450_{BM3} aus *Bacillus megaterium* (CYP102A1) – eins der meiststudierten P450s. Hierbei ist eine bifunktionelle Reduktase (CPR) mit der Häm-Domäne verknüpft. (B) Gezeigt ist die Struktur des ersten in voller Länge kristallisierten autarken P450-Enzyms (CYP116B46, PDB: 6LAA).⁶⁹ Die Häm-Domäne (blau), die PFOR-Domäne (rot) sowie das Ferredoxin (grau) sind zur besseren Unterscheidung farblich gekennzeichnet. Der Häm-Cofaktor (schwarz), der Eisen-Schwefel-Cluster (gelb, orange) und der Flavinmononukleotid-Cofaktor (FMN, grün) sind ebenfalls hervorgehoben.

1.3. Entwicklung nicht-natürlicher Enzymfunktionen

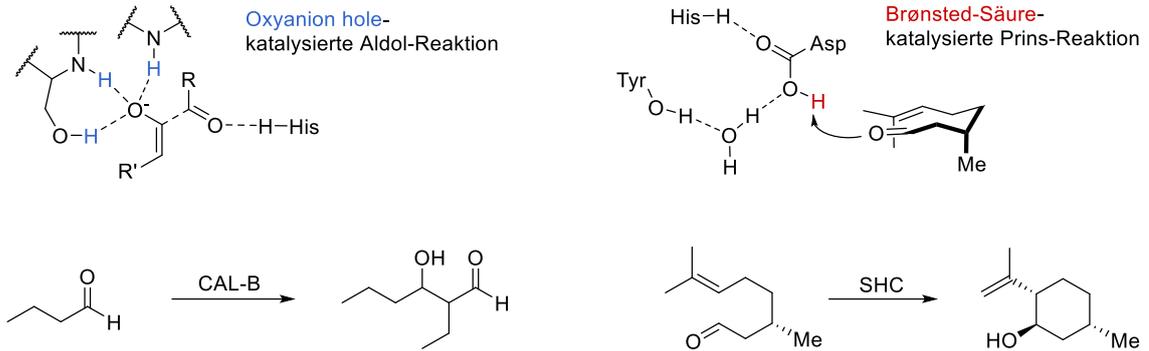
Die Biokatalyse spielt in der chemischen und pharmazeutischen Industrie eine zunehmend wichtiger werdende Rolle. Sie bietet Zugang zu einer Vielzahl neuer Syntheserouten und offeriert darüber hinaus einige Vorteile gegenüber der chemischen Katalyse.^{73,74} Hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität unter milden Bedingungen sind besonders herausragende Eigenschaften, die Biokatalysatoren zu bieten haben.⁷⁵ Die Anwendung von Enzymen in der organischen Synthesechemie und in industriellen Prozessen wird aktuell dadurch limitiert, dass nicht für jede zu katalysierende Transformation auch ein passender Biokatalysator verfügbar ist.^{75,76} Daher ist die Identifizierung und Verbesserung nicht-natürlicher Enzymfunktionen ein besonders

relevantes und aktuelles Forschungsgebiet in der Biokatalyseforschung, um neue Synthesewege mit hoher Effizienz zu erschließen.^{77,78}

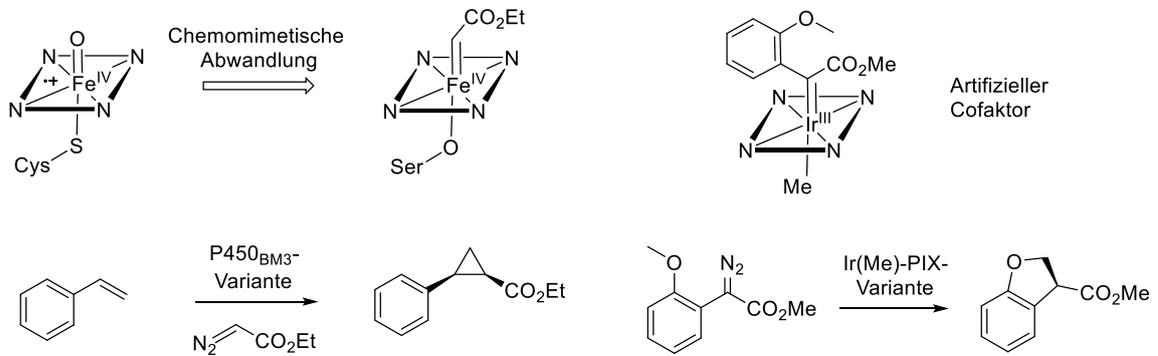
Neben der natürlichen Funktion, sind einige Enzyme auch in der Lage weitere Reaktionen zu katalysieren, die einem ähnlichen oder gänzlich verschiedenen Reaktionsmechanismus folgen.^{79,80} Außerdem können sie neben dem nativen Substrat auch andere Substrate akzeptieren und deren Umwandlung vielseitig katalysieren. Diese Polyreaktivität von Enzymen wird auch als Promiskuität bezeichnet und ist in der Natur die Triebkraft zur Evolution neuer spezialisierter Katalysatoren als Antwort auf sich stets ändernde Umwelteinflüsse.⁸¹ Ein prominentes Beispiel hierfür sind Hydrolasen, die neben der im natürlichen Umfeld katalysierten Ester- und Amidhydrolyse auch zur Hydrolyse und sogar zur Knüpfung anderer Bindungen fähig sind (**Abbildung 6, A**).^{82,83} Trotz unterschiedlicher Mechanismen werden diese neuen Fähigkeiten dadurch ermöglicht, dass ähnliche Übergangszustände und Intermediate im aktiven Zentrums des Enzyms stabilisiert und präzise kontrolliert werden.⁷⁷ Unter optimalen Bedingungen können diese nicht-natürlichen Funktionen sogar zur Synthese chiraler Verbindungen im Tonnenmaßstab genutzt werden.⁸⁴ Ein weiteres nennenswertes Beispiel für Promiskuität liefern Terpen-Zyklasen, die mit ihrer universellen Protonierungs-Maschinerie neben Polyzyklisierungen auch zur asymmetrischen Synthese diverser Produkte eingesetzt werden können.⁸⁵

Viele promiskuitive Enzymfunktionen lassen sich durch *enzyme engineering* im Labor verbessern. Eine besonders erfolgreiche Methodik hierfür ist die gerichtete Evolution, welche die natürliche Evolution imitiert (**Abbildung 6, C**).^{86,87} Dabei werden gezielt Mutationen auf Genebene des Proteins eingeführt, welche zufällige oder ortsgerichtete Aminosäureaustausche bedingen. Die generierte Variantenvielfalt wird anschließend auf die gewünschte Aktivität untersucht (*screening*) und verbesserte Enzymvarianten werden identifiziert. Mit der besten identifizierten Variante wird das gesamte Vorgehen so oft zyklisch wiederholt, bis die gewünschte Aktivität oder Selektivität erreicht wird. Ein bemerkenswertes Beispiel für eine nicht-natürliche Enzymfunktion, die durch gerichtete Evolution verbessert wurde, ist die von Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysierte Carben-Transfer-Reaktion.⁸⁸ Diese Enzymklasse nutzt unter Normalbedingungen einen prosthetischen Eisen-Häm-Cofaktor, um den Übertrag von aktiviertem Sauerstoff auf Substrate zu katalysieren (z.B. Epoxidierung von Alkenen). In einem chemomimetischen Ansatz konnte demonstriert werden, dass neben dem natürlichen Oxen auch nicht-natürliche, hochreaktive Intermediate wie Carbene durch den Häm-Cofaktor in einer Proteinumgebung übertragen werden können. So konnte unter Einsatz von Diazoessigsäureester zur Bildung des Carbenvorläufer eine Cyclopropanierung von Styren mit zunächst geringer Startaktivität nachgewiesen werden (**Abbildung 6, B**).⁸⁸ Mithilfe von gerichteter Evolution wurde ein Biokatalysator entwickelt, der diese nicht-natürliche Reaktion mit einer Effizienz katalysiert, die mit bekannt Übergangsmetallkatalysatoren konkurrenzfähig ist.⁸⁹ Durch gezielten Austausch des proximalen Cystein-Liganden der prosthetischen Häm-Gruppe durch andere Aminosäuren

A Promiskuitive Enzymfunktionen



B Chemomimetische Carben-Transfer-Chemie mit engineeringten Häm-Proteinen



C Gerichtete Evolution neuer Enzymfunktionen

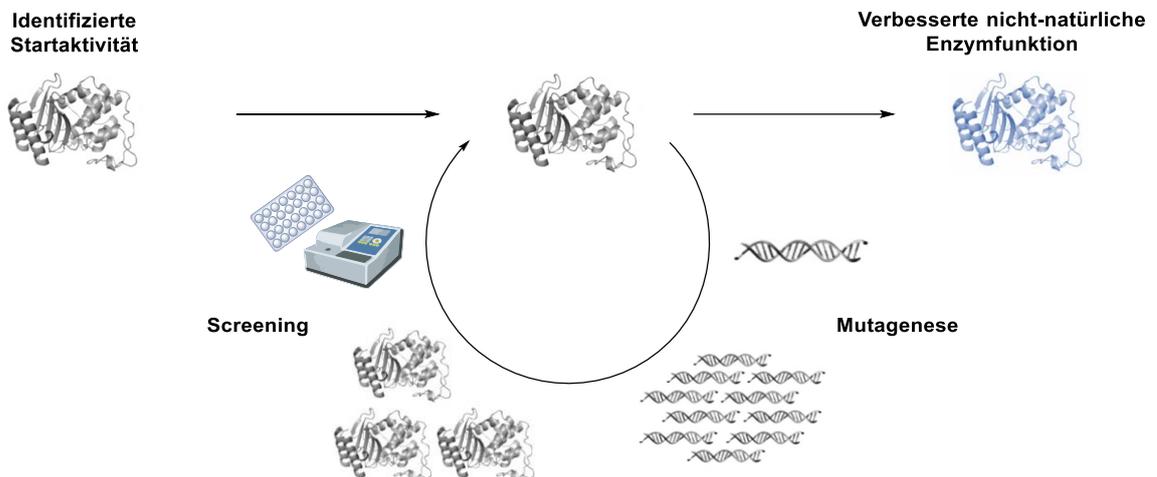


Abbildung 6 – (A) Beispielhafte Illustration von Katalyseprinzipien in Enzymen, die neben der Katalyse von natürlichen Reaktionen auch promiskuitive Transformationen mit einem analogen Mechanismus ermöglichen. (B) Chemomimetische Anpassung von Cofaktoren von Häm-Proteinen für die Katalyse von Cyclopropanierungen durch Carben-Transfer (links). Komplexere Carben-Transfer-Reaktionen können durch artifizielle Metall-Cofaktoren katalysiert werden, die in die makromolekulare Umgebung von Proteinen eingebracht wurden (rechts). (C) Schematische Darstellung eines gerichteten Evolutions-experiments zur Verbesserung nicht-natürlicher Enzymfunktionen. Die anfänglich identifizierte Startaktivität eines Enzyms wird durch Mutagenese und anschließendem Screening nach verbesserter Aktivität oder Selektivität in sich wiederholenden Runden gesteigert, bis ein Biokatalysator mit gewünschten Eigenschaften vorliegt.

wie Serin oder Histidin, konnte das Redoxpotenzial des katalytisch aktiven Eisens erhöht werden, um weitere anspruchsvolle Transformationen zu ermöglichen.^{89,90} Mit solchen Anpassungen, in Kombination mit gerichteter Evolution, wurden in den Gruppen von Frances Arnold und Rudi Fasan nicht-natürliche Enzymfunktionen geschaffen, die neben Cyclopropanierungen⁹¹⁻⁹³ auch intermolekulare Carben-Insertionen in C-H-, N-H, und sogar Si-H-Bindungen katalysieren.⁹⁴⁻⁹⁶ Auch Nitren-Transfer-Reaktionen sind mit diesen Enzymsystemen möglich.⁹⁷⁻⁹⁹ Viele dieser Enzyme katalysieren nicht-natürliche Reaktionen mit einer Produktivität von weitaus über Tausend Katalysezyklen und exzellenten Enantioselektivitäten.⁷⁷ Diese Biokatalysatoren können mit herkömmlichen Katalysatorsystemen konkurrieren und sind daher auch synthetisch wertvoll.^{100,101}

Auch das Einbringen artifizieller Cofaktoren oder nicht-natürlicher Aminosäuren in Proteine kann neue Enzymfunktionen hervorbringen.^{81,102-105} Beispielsweise können synthetische Iridium-Porphyrine anstelle von Eisen-Häm-Cofaktoren in Enzyme eingebracht werden, um die Katalyse von Carben- und Nitren-Transferreaktionen zu ermöglichen (**Abbildung 6, B**).¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Ebenso können auch Palladiumkatalysatoren zur Katalyse von Suzuki-Kupplungen¹⁰⁹ oder Ruthenium-basierte Metathesekatalysatoren¹¹⁰ in einer Proteinumgebung nutzbar gemacht werden. Der Katalysator kann hierbei sowohl kovalent als auch nicht-kovalent im aktiven Zentrum eines sogenannten artifiziellen Metalloenzym (ArMs) verankert werden.¹⁰² Die abgeschirmte und chirale Umgebung im aktiven Zentrum eines Proteins wird dabei zur Kontrolle reaktiver Intermediate aber auch zur Induktion von Stereoselektivität genutzt. Obwohl auf diesem Forschungsgebiet schon herausragende Pionierarbeit geleistet wurde, sind weitere Fortschritte nötig, um die Vorteile der Übergangsmetallkatalyse und der Biokatalyse additiv nutzbar zu machen.

In letzter Zeit werden neue Enzymfunktionen auch durch computergestütztes Design *de novo* generiert.^{105,111-114} Bei dieser Herangehensweise werden optimal stabilisierte Übergangszustände für eine Zielreaktion *in silico* berechnet und nur katalytisch relevante Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung einbezogen. Diese sogenannten Theozyme (Übergangszustand + relevante Aminosäuren) werden in einem zweiten Schritt *in silico* in ein passendes Protein-Grundgerüst (*backbone*) eingebaut. Hierbei wird berücksichtigt, dass das gesamte Theozym und besonders die zur Stabilisierung des Übergangszustandes notwendigen Aminosäuren optimal ins Protein integriert werden (*matching*). Im dritten Schritt wird das aktive Zentrum entworfen. Dabei werden die Aminosäuren des aktiven Zentrums sowie der zweiten und dritten Schale *in silico* angeordnet (*shuffling*), um eine optimale Packung zu erreichen. Die generierten Varianten können abschließend exprimiert und auf ihre Aktivität getestet werden. Mit diesem Workflow wurden bereits neue enzymkatalysierte Transformationen wie zum Beispiel Diels-Alder- oder Retro-Aldol-Reaktionen für synthetisch wertvolle Anwendungen nutzbar gemacht.¹¹⁵⁻¹¹⁷

1.4. Evolution neuer Biokatalysatoren zur carbonylselektiven Oxyfunktionalisierung

Effiziente und umweltfreundliche Ansätze zur regioselektiven Oxyfunktionalisierung terminaler Alkene, die nur Luftsauerstoff zur Oxidation nutzen, sind hauptsächlich für die Synthese von Methylketonen mit Markovnikov-Selektivität bekannt (Wacker-Tsuji-Reaktion).^{3,11} Aerobe Oxidationen mit der komplementären anti-Markovnikov-Regioselektivität zur Bildung von Aldehyden sind nach wie vor eine Herausforderung auf dem Gebiet der Katalyse.^{118,119} Zur Umkehr der Selektivität ist ein radikalischer Mechanismus vorteilhaft. Indem Sauerstoff gezielt am terminalen Kohlenstoffatom der C=C-Doppelbindung angreift, wird die Regioselektivität durch Bildung eines stabileren sekundären Radikal-Intermediats bestimmt. Zur Begünstigung des radikalischen Angriffs gegenüber einem polaren Angriff am höher substituierten Kohlenstoffatom (Markovnikov-Selektivität) ist daher ein hohes Maß an Katalysatorkontrolle notwendig. Diese Charakteristik trifft besonders gut auf Biokatalysatoren zu. Ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung und passgenauen Ausrichtung von Substraten in einer makromolekularen Umgebung sowie das Potenzial hoch-energetische Intermediate wie Radikale zu kontrollieren, machen Enzyme zu idealen Katalysatoren für derart komplexe Reaktionen.

Die Familie der Cytochrom P450 Monooxygenasen ist in der Lage C=C-Bindungen selektiv zu oxidieren und nutzt hierzu elementaren Sauerstoff aus der Umgebung.^{42,53} Hauptprodukte dieser Reaktion von *Compound I* mit terminalen Olefinen sind Epoxide. Bei genauer Analyse von Reaktionsgemischen konnte in der Vergangenheit jedoch auch die Bildung von Aldehyden als Nebenprodukt in geringen Mengen nachgewiesen werden.^{68,120-124} Es handelt sich vermutlich um eine promiskuitive Nebenreaktion von P450s, welche mit der konzertierten Epoxidierung konkurriert. Nach aktuellem Kenntnisstand können hoch-valente Oxo-Eisen(IV) Porphyrin- π -Radikalkationen, wie sie unter anderem auch in P450s vorliegen, je nach elektronischem Zustand sowohl konzertierte Epoxidierungen als auch schrittweise Reaktionen über hoch-energetische Intermediate katalysieren.¹²⁵⁻¹²⁹ Wenngleich Epoxidierung dem stark bevorzugte Reaktionspfad entspricht, führt der schrittweise Reaktionsweg über ein sehr kurzlebige radikalische Intermediat und resultiert letztendlich in der Bildung geringer Mengen eines terminalen Carbonyls mit anti-Markovnikov-Selektivität. Während synthetisch Metalloporphyrinen bisher noch nicht für die selektive Alken-zu-Carbonyl-Oxidation unter Ausschluss von Epoxidierung entwickelt werden konnten, wurde kürzlich gezeigt, dass die Reaktivität des radikalischen Intermediats in Häm-Enzymen kontrolliert werden kann.⁷² Durch *enzyme engineering* einer promiskuitiven Cytochrom P450 Monooxygenase aus *Labrenzia aggregata* (P450_{LA1}) gelang es Hammer *et al.* den Sauerstofftransfer von *Compound I* auf das terminale Alken selektiv umzulenken, sodass ausschließlich das Carbonyl-Produkt gebildet wird.⁷² Während die natürlich stattfindende Epoxidierung des Testsubstrats Styren unterdrückt wurde, erlaubte die neue Enzymfunktion die Oxidation des Substrats mit anti-Markovnikov-Selektivität (**Abbildung 7, A**).

Erreicht wurde dieses Ergebnis mit einer Variante, die aus zehn Runden gerichteter Evolution hervorging und aufgrund der katalysierten Reaktion als anti-Markovnikov-Oxygenase (aMOx) bezeichnet wird (**Abbildung 7, B**). Durch mechanistische Studien konnte darüber hinaus der Beweis erbracht werden, dass die Bildung des anti-Markovnikov-Oxidationsprodukts nicht durch Epoxidierung-Isomerisierung erfolgt (**Abbildung 7, C**). Es wurde zudem postuliert, dass energiereiche radikalische sowie carbokationische Intermediate durch die angepasste Struktur des aktiven Zentrums im Verlauf des Katalysezyklus stabilisiert werden, sodass eine 1,2-Hydridmigration stattfinden kann (Schritt iv in **Abbildung 7, D**). Dieser mechanistische Schlüsselschritt des aMOx-Zyklus konnte durch Biotransformationen mit deuteriertem Styren und anschließende NMR-Analysen nachgewiesen werden (**Abbildung 7, E**).

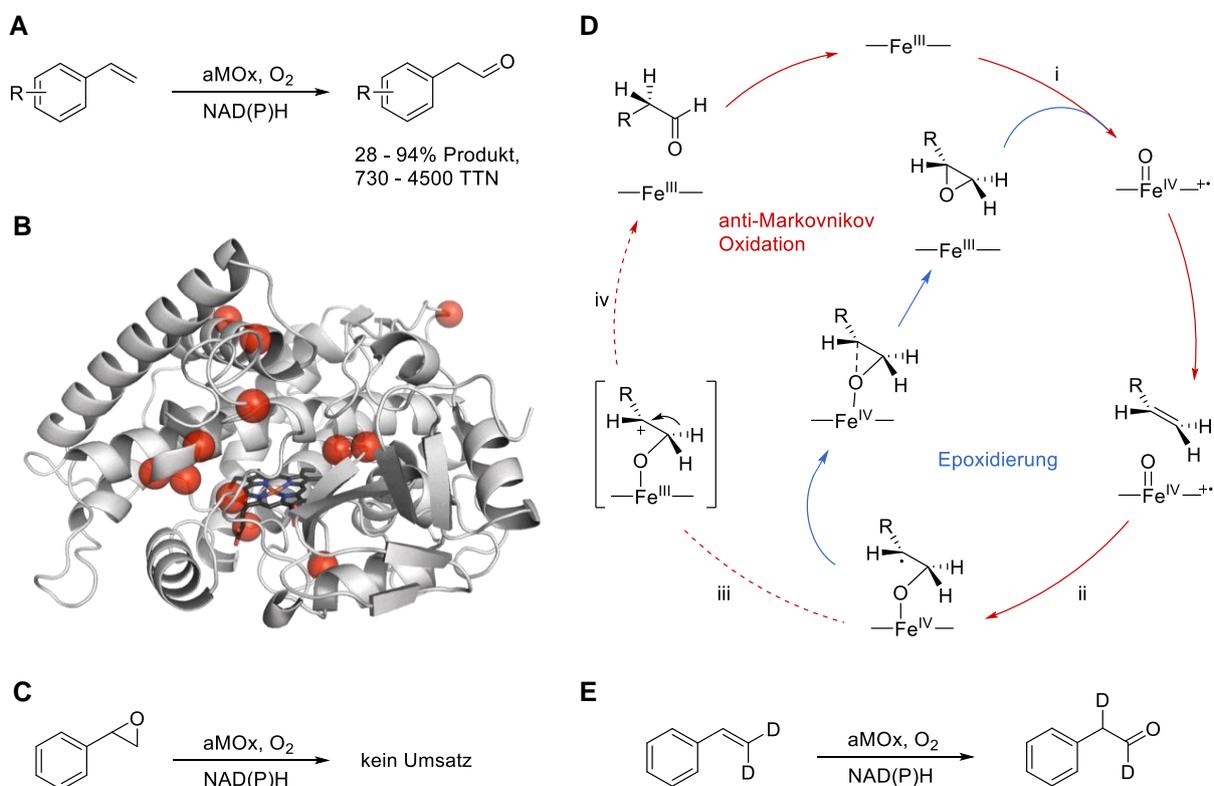


Abbildung 7 – (A) Selektive anti-Markovnikov-Oxidation von Styren-Derivaten durch ein evolviertes Cytochrom P450 Enzym (aMOx). (B) Homologiemodell des Wildtyp-Enzyms P450_{LA1}. Die Positionen der zehn Aminosäurevariationen, die mittels gerichteter Evolution eingeführt wurden, sind rot gekennzeichnet. (C) Eine Kontrollreaktion mit Styrenoxid zeigt, dass keine Epoxidierung-Isomerisierung mit aMOx erfolgt. (D) Konkurrierende Katalysezyklen der P450-katalysierten anti-Markovnikov-Oxidation (rot) und Epoxidierung (blau). Nach der Bildung des Eisen-Oxo-Komplexes (*Compound I*, i) erfolgt der radikalische Angriff an das Olefin (ii) mit anti-Markovnikov-Selektivität. Es wird postuliert, dass das entstandene intermediäre Radikal durch Elektronentransfer (iii) auf das Häm-Eisen in ein Carbokation übergeht. Aus der nachfolgenden 1,2-Hydridverschiebung geht die entsprechende Carbonylverbindung als Produkt hervor (iv). (E) Biotransformationen mit deuteriertem Styren und anschließende NMR-Analysen bestätigen eine 1,2-Hydridmigration als Schlüsselschritt des aMOx-Zyklus.

Hohe aMOx-Selektivitäten (Aldehyd vs. Epoxid) bis zu 94% und gute katalytische Produktivitäten bis 4500 TTN (*total turnover number*) konnten mit aMOx für Aryl-substituierte Styren-Derivate erzielt werden. Beim Einsatz von 1,1-disubstituiertem α -Methylstyren oder für interne Alkene wie β -Methylstyren wurde im Gegenzug nur eine sehr geringe Carbonyl-Selektivität erreicht.⁷² Diese Vorarbeiten werfen eine Vielzahl neuer Fragestellungen auf, für die im Rahmen dieses weiterführenden Forschungsprojekts fundierte Antworten gesucht wurden. So ist nach wie vor unklar wie die Metall-Oxo-vermittelte Alken-zu-Carbonyl-Oxidation im Detail mechanistisch funktioniert und wie das neu geschaffene aktive Zentrum darauf Einfluss nimmt. Außerdem liefern die beobachteten Startaktivitäten für interne Alkene vielversprechende Ansatzpunkte für die Entwicklung eines Enzyms, das die regioselektive Keton-Bildung effizient katalysieren kann. Im Allgemeinen ist es zudem interessant zu ergründen, inwieweit engineerete carbonylselective Oxygenasen in der Synthese anwendbar sind. Idealtypisch können damit seit langen bestehenden Limitierungen in der Katalysatorforschung überwunden werden und Syntheserouten zu Carbonylen ausgehend von einfachen Startmaterialien wie Alkenen rationalisiert und verkürzt werden.

1.5. Entwicklung neuer Synthesewege mit nicht-natürlichen Enzymfunktionen

Mit evolvierten nicht-natürlichen Enzymfunktionen können potenziell ganz neue Synthesewege erschlossen werden, die deutlich effizienter sind als klassische Routen. Implementiert in chemoenzymatischen Kaskaden, aber auch in reinen Enzymkaskaden, können neue Enzymfunktionen zu einer verkürzten Totalsynthese wertvoller Verbindungen beitragen.¹³⁰ Vor allem für die Synthese von Pharmazeutika oder Agrochemikalien birgt eine verschlankte und optimierte Reaktionsführung erhebliche ökonomische Vorteile, da Kosten und Abfälle eingespart werden können.^{105,131,132} Außerdem müssen Intermediate nicht zwangsläufig isoliert werden, was wiederum Zeit und Zusatzschritte spart. Enzymkaskaden können simultan in einem Reaktionsgefäß (Reaktor), kompartmentalisiert oder schrittweise konzipiert werden.¹³² Je nach Setup können Enzyminhibierungen umgangen werden oder enzymespezifische Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Lösemittel) individuell angepasst werden. Aber auch Enzyme selbst können durch *enzyme engineering* an Prozesse adaptiert werden (z.B. Thermostabilisierung) oder durch Immobilisierung effizienter genutzt werden.¹⁰⁵ Mit den großen Fortschritten im Feld der angewandten Biokatalyse wurden Kaskadenreaktionen mit engineereten Enzymen immer bedeutender. Eines der größten Highlights auf diesem Gebiet ist die vor Kurzem entwickelte *in vitro* Enzymkaskade zur Synthese des Anti-HIV-Medikaments Islatravir (**Abbildung 8, A**).¹³³ Im Vergleich zu bisherigen Syntheserouten (12 bis 18 Schritte) sind mit dieser Kaskade nur noch weniger als die Hälfte der Syntheseschritte notwendig. Insgesamt fünf Enzyme wurden in mehreren Runden gerichteter Evolution zur Umsetzung der nicht-natürlichen

Substrate optimiert, um entweder die gewünschte Selektivität, Aktivität oder Stabilität für den Einsatz in der Kaskade zu erreichen. Vier weitere auxiliäre Enzyme wurden parallel eingesetzt, sodass toxische Nebenprodukte *in situ* abgebaut werden oder das thermodynamische Gleichgewicht zu Gunsten der Produktbildung verschoben wird. Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel ist eine *hydrogen-borrowing* Kaskade zur Herstellung des experimentellen Wirkstoffs GSK2879552 (**Abbildung 8, B**).¹³⁴ Die eingesetzte Iminreduktase wurde in drei Runden gerichteter Evolution entwickelt und weist gegenüber dem Wildtyp-Enzym eine um mehr als das 38.000-fache gesteigerte Aktivität auf. Gemeinsam mit einer Kettoreduktase ermöglicht dies die redoxneutrale Synthese des enantiomerenreinen Wirkstoffs im Kilogrammmaßstab. Neben herkömmlichen Mutagenesepraktiken können nicht-natürliche Enzymfunktionen auch durch *in silico* Design entfesselt werden, um für den Einsatz in Kaskaden genutzt zu werden. Mithilfe des computergestützten Tools *FuncLib* konnte auf diese Weise eine Methyltransferase entwickelt werden, die kombiniert mit einer Halogenid-Methyltransferase zur Synthese von regioselektiv alkylierten Pyrazolen eingesetzt werden kann (**Abbildung 8, C**).^{135,136}

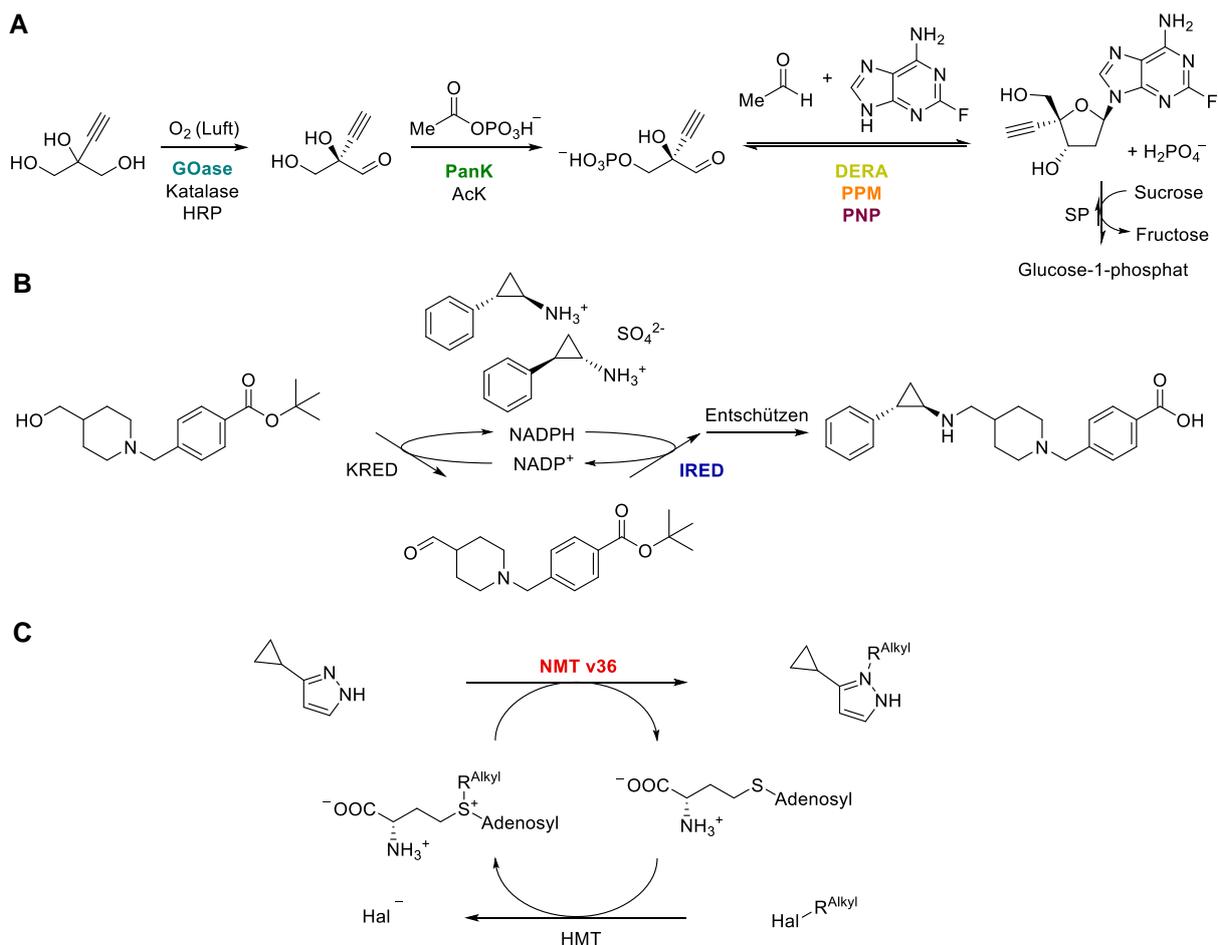


Abbildung 8 – (A) Von MSD entwickelte Enzymkaskade zur verkürzten Synthese von Islatravir. Die mittels *enzyme engineering* optimierten fünf Enzyme sind farbig gekennzeichnet. (B) Redoxneutrale *hydrogen-borrowing* Kaskade zur asymmetrischen Herstellung des LSD1 Inhibitors GSK2879552 unter Anwendung einer evolvierten Iminreduktase (IRED, blau). (C) Kaskade einer Halogenid-Methyltransferase (HMT) in Kombination mit einer *in silico*-entworfenen Methyltransferase (NMT, rot) zur regioselektiven Alkylierung von Pyrazolen.

Alleine die Entwicklungen der vergangenen Jahre zeigen, dass immer mehr Enzyme für die Anwendung in der chemischen Synthese evolviert oder *in silico* entwickelt werden. Viele Hürden in der Katalyse können durch maßgeschneiderte Biokatalysatoren überwunden werden. Zahlreiche schwierige Transformationen wie zum Beispiel regioselektive N-/O-spezifische Alkylierungen^{135,137}, anti-Markovnikov-Oxidationen terminaler Alkene⁷² sowie enantioselektive C-H-Aminierungen^{95,138} konnten bereits durch *enzyme engineering* ermöglicht werden. Weitere herausfordernde Reaktionen wie die regio- und enantioselektive Hydratisierung oder Hydroaminierung unaktivierter interner Alkene können zukünftig durch die Entwicklung spezifischer Enzym-Varianten (auch in Kaskaden) ermöglicht werden. Insbesondere Enzyme, die interne Alkene regioselektiv zu Ketonen oxidieren, eröffnen viele neue Synthesewege, indem die zuvor gebildeten prochiralen Carbonyle mit weiteren etablierten Biokatalysatoren zu hochwertigen chiralen Produkten umgesetzt werden können.

1.6. Katalytische Strategien für regio- und enantioselektive Hydratisierungen und Hydroaminierungen interner Alkene

Die Umwandlung unaktivierter interner Alkene in chirale Alkohole oder Amine ist eine besondere Herausforderung in der Katalyse, für die es nur begrenzte Lösungsansätze gibt.¹³⁹ Vor allem die simultane Kontrolle von Regio- und Enantioselektivität ist besonders anspruchsvoll. Zwar gibt es natürliche Enzyme, die direkte Hydroaminierungen interner Alkene katalysieren, doch sind sie aufgrund ihres Mechanismus auf aktivierte interne Alkene wie α,β -ungesättigte Carbonsäuren limitiert.^{140,141} Neuerdings wurden in den Gruppen um Hartwig und Buchwald Übergangsmetallkatalysatoren entwickelt, die direkte N-H-Additionen an unaktivierten internen Alkenen katalysieren können. Trotz hoher kinetischer Barrieren und einer schwach ausgeprägten thermodynamischen Triebkraft für diese Transformation, liefern diese Katalysatorsysteme ausgesprochen gute Ergebnisse.^{142,143} So wurden zum Beispiel CuH-Katalysatoren zur asymmetrischen Hydroaminierung von substituierten Styren-Derivaten in α -Position entwickelt (**Abbildung 9, A**), die aber auch für aliphatische interne Alkene einsetzbar sind (**Abbildung 9, B**).^{139,144} In diesen Fällen wird die Regioselektivität jedoch nur zu einem Großteil durch den Katalysator kontrolliert. Durch das Vorhandensein dirigierender Gruppen, die an das Metallzentrum koordinieren, konnte in weiterführenden Ansätzen gezeigt werden, dass die Regioselektivität substratgesteuert beliebig moduliert werden kann (**Abbildung 9, C**).¹⁴⁵ Mit kationischen Iridium-Katalysatoren konnte die Alken-Insertion sogar weiter begünstigt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass mit diesem weiterentwickelten Katalysatorsystem auch sehr komplexe Substrate mit hohen Regio- und Enantioselektivitäten funktionalisiert werden können

(Abbildung 9, D).¹⁴³ In allen vorgestellten Abwandlungen können jedoch ausschließlich geschützte Amine als Nucleophile eingesetzt werden, sodass für die gewünschte Amin-Substitution mindestens zwei weitere Syntheseschritte nötig werden (z.B. Entschützung gefolgt von einer nucleophilen Substitution mit einem Alkylhalogenid). Außerdem sind die katalytischen Produktivitäten dieser Katalysatorsysteme sehr begrenzt und liegen unter 50 TTN.

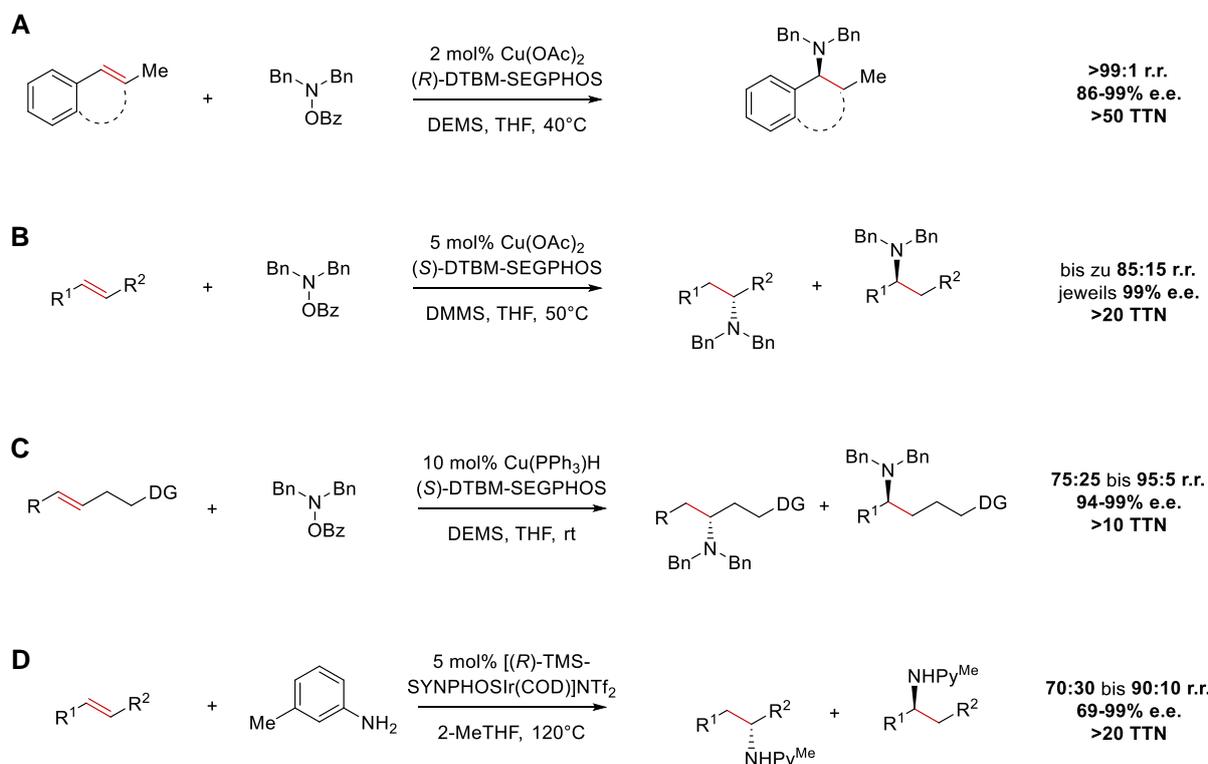


Abbildung 9 – Überblick über mögliche Synthesewege, die eine direkte regio- und enantioselective Hydroaminierung interner Alkene ermöglichen. Obwohl die Bandbreite an einsetzbaren Amin-Nucleophilen sehr begrenzt ist, ermöglichen diese Methoden Zugang zu chiralen Aminen mit hohen Enantiomerenüberschüssen (e.e.). Allen Methoden ist jedoch gemeinsam, dass sie nur geringe katalytische Produktivitäten (TTN) erreichen und die Regioselectivitäten (r.r.) nicht bei allen Beispielen strikt kontrolliert werden.

Auch für die direkte regio- und enantioselective Hydratisierung von disubstituierten C=C-Doppelbindungen existieren aktuell nur sehr wenige katalytische Methoden. Ein Grund hierfür ist die geringe Nucleophilie des Wassers in Kombination mit unaktivierten Substraten und die Schwierigkeit den nucleophilen Angriff katalysatorgesteuert zu kontrollieren.¹⁴⁶ Die asymmetrische Hydroborierung von β -Alkylstyrenen ist ein potenzieller Umweg und ermöglicht den indirekten Zugang zu chiralen Phenylpropanolen mit Regiopräferenz (**Abbildung 10, A**).¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Dieser Ansatz beruht auf stöchiometrischen Mengen von Boranen zur Bildung der chiralen Boronatesters im ersten Schritt. Eine anschließende oxidative Aufarbeitung liefert die entsprechenden Alkohole. Die bevorzugte Hydratisierung der β -Position kann mit dieser Methode jedoch nicht erreicht werden.

Mit der Enzymfamilie der Hydratasen bietet uns die Natur hochspezialisierte Katalysatoren, die interne Alkene asymmetrisch und regioselektiv hydratisieren können.¹⁵¹ Leider ist ihr Anwendungsbereich auf ungesättigte Fettsäuren und verwandte Verbindungen beschränkt (**Abbildung 10, B**). Durch *enzyme engineering* einer Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* konnten jedoch jüngst vielversprechende Ergebnisse präsentiert werden, die eine Erweiterung des Substratspektrums auf interne Alkene als möglich in Aussicht stellt.¹⁵²

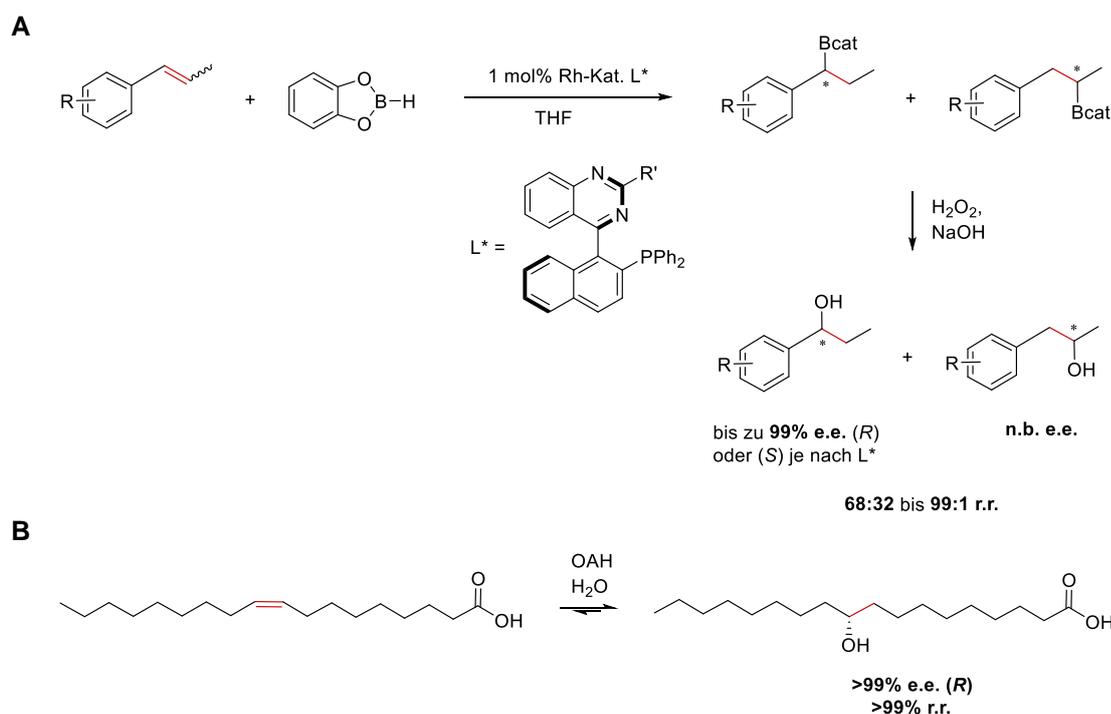


Abbildung 10 – Synthesewege für regio- und enantioselektive Hydratisierungen von internen Alkenen. (**A**) Die asymmetrische Hydroborierung von β -Alkylstyrenen. (**B**) Biokatalytische Hydratisierung mit Fettsäurehydratasen.

Chirale Amine oder Alkohole sind wichtige Struktur motive in Pharmazeutika oder Pflanzenschutzmitteln. Aktuell werden zur asymmetrischen Synthese solcher Verbindungen prochirale, reaktive Ausgangsmaterialien benötigt, die ihrerseits ausgehend von günstigen petrochemischen Vorläufern wie Alkenen oder Alkanen hergestellt werden. Eine Abkürzung der klassischen Syntheserouten ist daher aus ökonomischer und ökologischer Sicht höchst erstrebenswert. Insbesondere die Synthese von pharmakologisch relevanten Struktur motiven wie 1-Arylpropan-2-ol oder 1-Arylpropan-2-amin Derivaten können von einer verkürzten Herstellung aus internen Alkenen profitieren (**Abbildung 11**). Viele dieser biologisch aktiven Struktur motive werden aktuell aus den entsprechenden prochiralen Carbonylen durch asymmetrische Hydrierung^{153,154} oder reduktive Aminierung^{155,156} generiert. Auch einige enzymatische Routen für die Synthese solcher chiralen Alkohole mit Alkoholdehydrogenasen^{157–159} oder der entsprechenden Amine mit Transaminasen^{160–162}, Amin-Dehydrogenasen^{163–166} oder

Iminreduktasen^{167,168} existieren und zeichnen sich durch exzellente Enantioselektivitäten aus, wie sie für Pharmazeutika benötigt werden. Ausgehend von racemischen Alkoholen können chirale Amine auch in redoxneutralen *hydrogen-borrowing* Kaskaden *via* prochiralen Carbonyl-Intermediaten hergestellt werden.¹⁶⁹⁻¹⁷² In Anbetracht der vielfältigen Möglichkeiten, chirale Amine und Alkohole aus Ketonen zu gewinnen, ist ein naheliegender Ansatz, diese Vorstufen effizient und regioselektiv aus den entsprechenden Alkenen zu gewinnen. Ein solches Konzept wurde kürzlich in Form einer chemo-enzymatischen Kaskade vorgestellt. In diesen Arbeiten wurde das intermediäre Keton zunächst durch Palladium-katalysierte Wacker-Tsuji-Oxidation eines terminalen Alkens generiert und anschließend biokatalytisch umgesetzt.^{173,174}

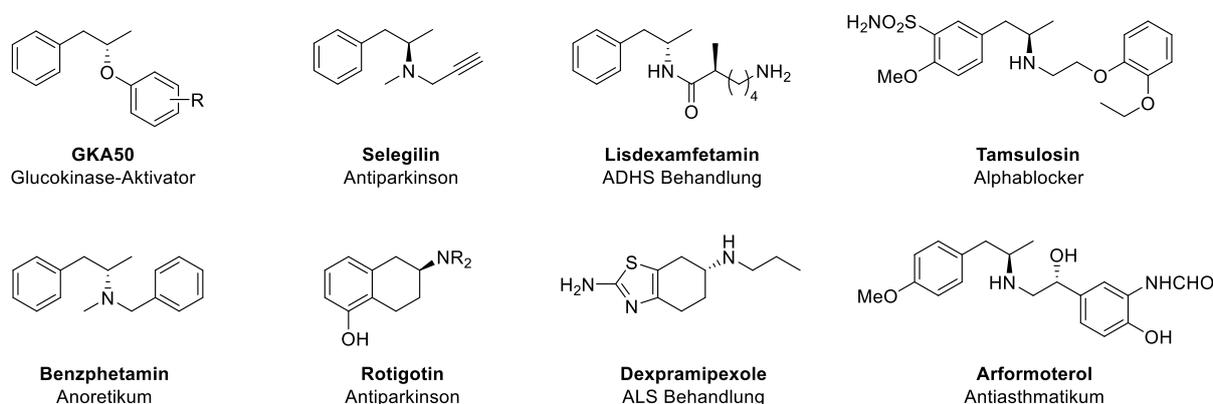


Abbildung 11 – Überblick über pharmakologisch wirksame Verbindungen, deren Synthese durch regio- und enantioselektive Synthesewege ausgehend von β -Alkylarenen abgekürzt werden könnte.

In zweistufigen Enzymkaskaden könnten auf ähnliche Weise eine formale regio- und enantioselektive Hydratisierung oder Hydroaminierung unaktivierter interner Alkene vorgenommen werden. Gerichtete Evolution eines Biokatalysators mit nicht-natürlicher Enzymfunktion, der interne Alkene mit hoher Regioselektivität zu Ketonen oxidiert, ist für diesen vorgeschlagenen Ansatz daher besonders attraktiv. Die Funktion des ketonselektiven Enzyms könnte zudem auch zum Aufbau kurzer synthetischer Stoffwechselwege *in vivo* genutzt werden. Auf diese Weise können alle Vorteile der Biokatalyse ausgenutzt werden, um die selektive Hydrofunktionalisierung von internen Alkenen zu ermöglichen.

2. Motivation und Aufgabenstellung

Biokatalysatoren erlauben eine präzise Kontrolle über chemische Reaktionen. Durch Anpassungen von Enzymen durch *enzyme engineering* können eventuell ganz neue katalytische Reaktionen ermöglicht werden. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist die evolvierte anti-Markovnikov Oxygenase (aMOx), die eine Metall-Oxo-Spezies für die selektive Oxidation terminaler Alkene zu Aldehyden nutzt. Eine spannende, noch nicht hinreichend geklärte Frage hierzu ist, wie der carbonylselektive Reaktionspfad durch aMOx kontrolliert wird und inwieweit dieser Mechanismus auch für komplexere Alken-Substrate zugänglich gemacht werden kann. Besonders interessant wäre es, wenn Metall-Oxo-Spezies in Enzymen auch für die regioselektive Alken-zu-Keton-Oxidation genutzt werden könnten. Bisher ist Regioselektivität für aerobe Oxidationen interner Alkene katalytisch nur sehr schwer kontrollierbar. Vor dem Hintergrund, dass Alkene leicht zugängliche Ausgangsverbindungen sind und daraus resultierende Ketone sehr wichtige Produkte oder Intermediate in der organischen Synthese sind, wäre die Entwicklung eines geeigneten Katalysators für diese Transformation besonders wertvoll. Das erste Ziel dieser Promotionsarbeit war daher die gerichtete Evolution einer neuen Enzymfunktion für die ketonselektive Oxidation von inaktivierten internen Alkenen, ausgehend von einem Enzym mit promiskuitiver Startaktivität für diese Reaktion. Um die Anwendbarkeit der entwickelten Ketonsynthase für die Synthese diverser Ketone zu untersuchen, wurde neben der Ergründung des Substratspektrums auch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Keton-Synthese im präparativen Maßstab intendiert. Da prochirale Ketone ausgezeichnete Substrate für zahlreiche Biokatalysatoren sind (z.B. Kettoreduktasen, Transaminasen oder Iminreduktasen), können zudem komplexere Reaktionen zur Bildung chiraler Moleküle in Enzymkaskaden realisiert werden. In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden auf diese Weise formale, asymmetrische Hydratisierungen und Hydroaminierungen von internen Alkenen adressiert (**Abbildung 12**). Dabei handelt es sich um Transformationen, die aufgrund stark begrenzter katalytischer Lösungen besonders gefragt sind, da sie das Potenzial besitzen, bestehende Syntheserouten zu wertvollen chiralen Alkoholen oder Aminen ausgehend von internen Alkenen zu verkürzen.

Der exakte Mechanismus der enzymkatalysierten Metall-Oxo-vermittelten Alken-zu-Carbonyl-Oxidation ist im Detail nicht bekannt. Somit wurden als drittes Ziel mechanistische Studien anvisiert, damit die zugrundeliegende Enzymologie sowie der Mechanismus von aMOx und der erzeugten ketonselektiven Enzymvarianten aufgeklärt werden. Um die Bedeutung eingeführter Aminosäurevariationen für die Kontrolle hoch-energetischer sowie kurzlebiger Intermediate in den neu geschaffenen aktiven Zentren genauer zu verstehen, wurde eine Kollaboration mit theoretischen Biochemikern an der Universität Girona eingegangen, die über Expertise in computergestützten Analysen und strukturellen Charakterisierungen von Häm-Proteinen verfügen.

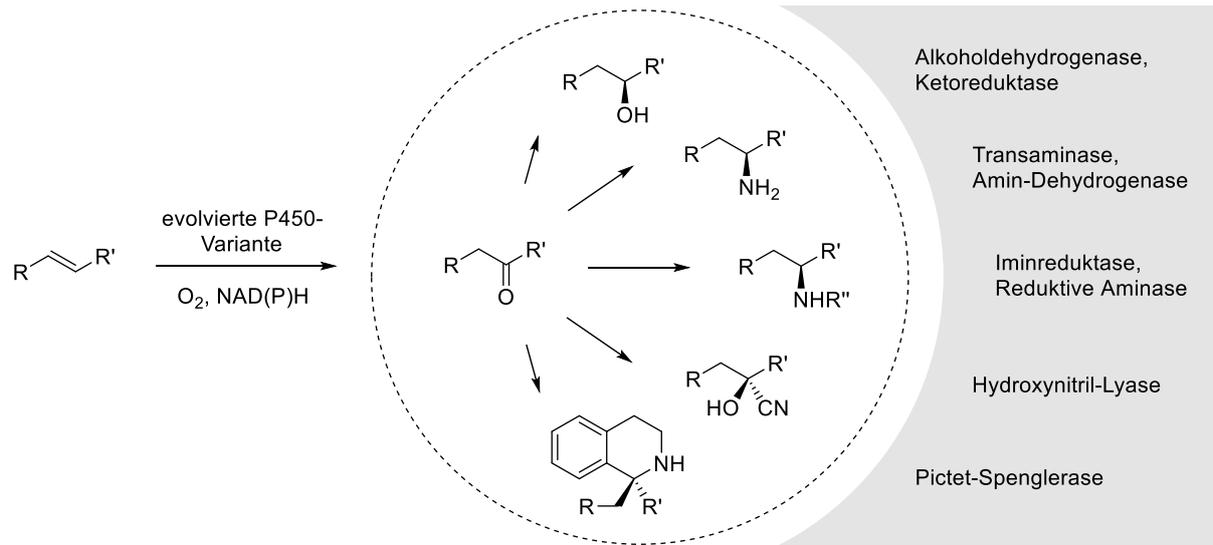


Abbildung 12 – Zweistufige Enzymkaskaden zur formalen, asymmetrischen Funktionalisierung von unaktivierten internen Alkenen. Nach regioselektiver Oxidation des Substrats durch ein evolviertes P450-Enzym wird das entstandene prochirale Keton im Folgeschritt durch ein zweites Enzym zu den entsprechenden chiralen Aminen oder Alkoholen umgesetzt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Das hier beschriebene Projekt ist in drei Hauptkapitel gegliedert (**Abbildung 13**). Der erste Teil umfasst mechanistische Studien, die zu einem verbesserten Verständnis der enzymkatalysierten, Metall-Oxo-vermittelten Alkenoxidation zu Carbonylen beitragen. Hierzu wurde die bereits in Vorarbeiten evolvierte anti-Markovnikov Oxygenase (aMOx) im Detail untersucht. Im zweiten Kapitel wird die gerichtete Evolution einer neuen Enzymfunktion beschrieben, die eine direkte regioselektive Oxidation unaktivierter interner Alkene zu Ketonen ermöglicht. Experimentelle als auch computergestützte Untersuchungen zur Funktionsweise der neuartigen Ketonsynthase werden in diesem Abschnitt ebenfalls genauer beleuchtet. Das dritte Kapitel widmet sich dem Anwendungspotential der evolvierten Ketonsynthase in der organischen Synthese und zeigt Möglichkeiten und Limitierungen dieses Enzymsystems auf.

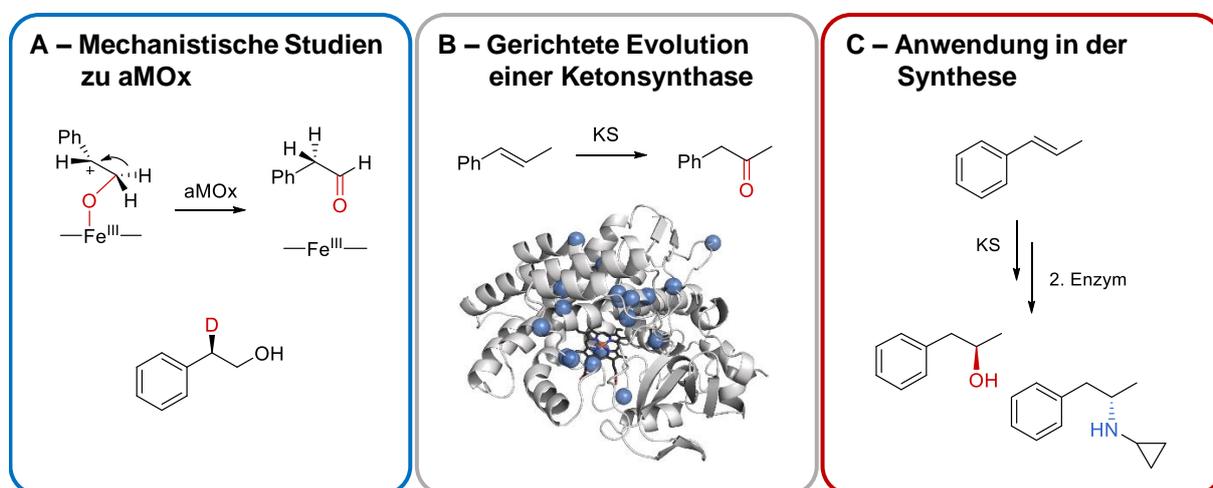


Abbildung 13 – Schematische Darstellung der dreiteiligen Gliederung dieser Arbeit mit Symbolbildern.

3.1. Mechanistische Studien zur Metall-Oxo-vermittelten carbonylselektiven Alkenoxidation

Am Beispiel synthetischer Metalloporphyrine wurde in der Literatur bereits sehr gut beschrieben, wie Metall-Oxo-Spezies mit Alkenen reagieren.¹²⁶ Typischerweise werden in hoch-konzentrierten Reaktionen Epoxide als Hauptprodukte gebildet. Für Carbonyl-Produkte, die man in Metall-Oxo-vermittelten Alkenoxidationen häufig als Nebenprodukte identifiziert, wird stattdessen ein schrittweiser Mechanismus postuliert. Aufgrund computergestützter Berechnungen ist man sich heute sehr sicher, dass kurzlebige Radikal-Intermediate diesen Reaktionspfad eröffnen.¹²³ Mit der evolvierten anti-Markovnikov Oxygenase existiert nun erstmals ein Katalysator, der solche Radikal-Intermediate selektiv zugänglich macht und vermutlich im Stande ist, diese über längere Zeit zu stabilisieren.⁷² Besonders interessant ist es daher zu verstehen, wie aMOx den Oxo-Transfer kontrolliert. Dieses Katalysatorsystem bietet eine gute Möglichkeit, um den postulierten Mechanismus genauer zu studieren.

Bisher ist bekannt, dass aMOx keine Epoxidierung-Isomerisierung katalysiert (**Abbildung 14, A**). Kontrollexperimente mit Styrenoxid als Substrat zeigten keine Umsetzung zum entsprechenden Aldehyd. Ein schrittweiser Katalysezyklus über hoch-energetische Radikal-Intermediate ist demzufolge deutlich naheliegender, wobei zwei verschiedene radikalische Mechanismen diskutiert werden können. Der unwahrscheinlichere Pfad entspricht in etwa dem klassischen C-H-Hydroxylierungs-Katalysezyklus von P450-Enzymen (**Abbildung 14, B**). Durch Wasserstoff-Abstraktion wird ein terminales Radikal gebildet, welches infolge eines Rebound-Mechanismus zur Entstehung eines Enol-Intermediats führt und im Gleichgewicht mit Phenylacetaldehyd steht. Die starke Instabilität des postulierten Radikal-Intermediats ist wohl die primäre Ursache, warum dieser Mechanismus ausgeschlossen werden kann und dieser auch in der Literatur nicht weiter diskutiert wird. Stattdessen wird von der initialen Bildung eines Eisen-gebundenen, sekundären Radikal-Intermediats ausgegangen, das von aMOx stabilisiert werden kann (**Abbildung 14, C**).¹⁷⁵ Durch Einelektronenübertragung (*single electron transfer*, SET) vom Alkylradikal auf das Eisenzentrum kann im Folgenden ein carbokationisches Intermediat entstehen. Dieser Prozess ist verwandt mit der Bildung von Carbokationen bei der Metall-Oxo-vermittelten C-H-Hydroxylierung, die zum Beispiel für den finalen Schritt der Pentalenolacton-Biosynthese vorgeschlagen wurde.¹⁷⁶ Nach 1,2-Hydridmigration geht aus dem Carbokation-Intermediat anschließend das entsprechende Carbonyl-Produkt hervor. Dieser Mechanismus konnte in Vorarbeiten bereits experimentell bestätigt werden, indem Biotransformationen von doppelt isotopenmarkiertem Styrol- β,β - d_2 mit aMOx durchgeführt wurden (**Abbildung 7, D**).⁷² NMR-Analysen des Produkts bestätigten die Bildung von 2-Phenylethanol-1,2- d_2 und somit die Migration des Deuterids an die benzyliche Position des anti-Markovnikov Produkts. Eine weitere spannende Frage ist daher, ob aMOx zwischen beiden migrationsfähigen H-Atomen unterscheiden

kann und ob eine enantiofaciale Diskriminierung durch das Enzym erfolgt. Diese tiefgreifenden mechanistischen Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

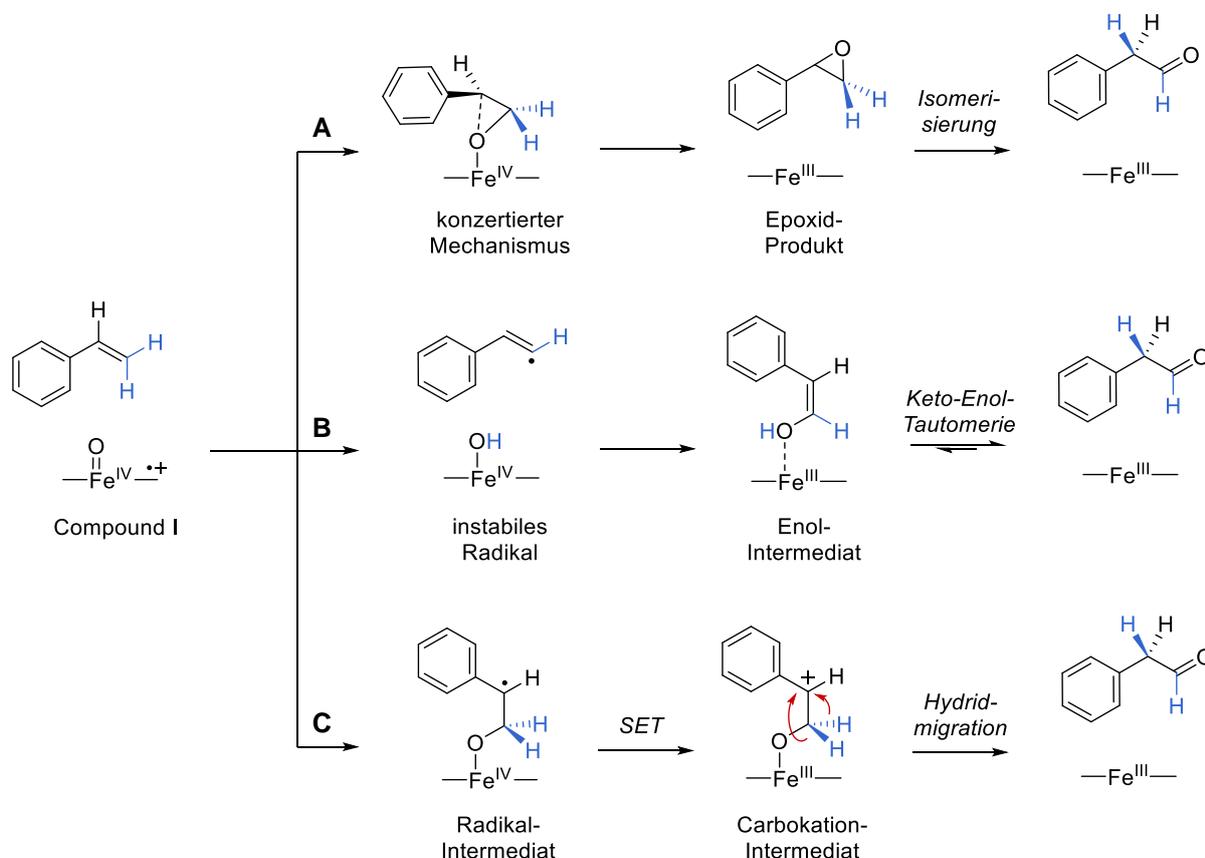


Abbildung 14 – Drei Mechanismus-Vorschläge zur enzymkatalysierten Metall-Oxo-vermittelten Oxidation von Styren zu Phenylacetaldehyd mit aMOx. (A) Konzertierte Epoxidierung von Styren zu Styrenoxid, gefolgt von einer enzymkatalysierten Isomerisierung zum entsprechenden Carbonyl-Produkt. Dieser Reaktionspfad konnte durch Kontrolleexperimente ausgeschlossen werden. (B) Wasserstoff-Abstraktion durch *Compound I* und Radikal-Rebound-Mechanismus führen zur Entstehung eines Enols, welches einer Keto-Enol-Tautomerie unterliegt. Die starke Instabilität des initial gebildeten Radikal-Intermediats führt zur Einschätzung, dass dieser Reaktionspfad sehr unwahrscheinlich ist. (C) Weitestgehend belegter Mechanismus von aMOx, der über ein Eisen-gebundenes, sekundäres Radikal- und Carbokation-Intermediat führt. Zentraler Schritt ist der gekoppelte Elektronen-/Hydridtransferprozess, der zur Erzeugung des anti-Markovnikov Aldehyds durchlaufen wird. Nach wie vor ist jedoch ungeklärt, welches der beiden Hydride den Migrationsprozess einght und ob eine enantiofaciale Diskriminierung durch das Enzym vorliegt.

3.1.1. Untersuchungen zur Hydridmigration

Zur weiterführenden Untersuchung der Hydridmigration wurden weitere Deuterium-markierte Alkene in Biotransformationen mit aMOx eingesetzt. Isotopenmarkierte Moleküle werden in der Katalysforschung häufig zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen verwendet, da eine Lokalisierung des inkorporierten Isotops durch etablierte Methoden der Analytik erfolgen kann. Daher wurden zunächst die beiden isotopenmarkierten Substrate *cis*-Styren- β -*d* (**2**) und *trans*-Styren- β -*d* (**4**) durch Hydrozirconierung mit Schwartz-Reagenz synthetisiert. Für die Darstellung

des *cis*-deutierten Styrens wurde Phenylacetylen- d_1 (**1**) verwendet und die Alkenylzirconium-Verbindung mit H_2O hydrolysiert, während für die Synthese des *trans*-markierten Styrens Phenylacetylen (**3**) und D_2O zur Hydrolyse eingesetzt wurde (**Abbildung 15**). Für beide komplementären Selektivitäten wurde die *cis*-Insertion des Alkins und die Bildung des entsprechenden *trans*-Alkenylzirconiums ausgenutzt.¹⁷⁷ Eine hohe Reinheit von >95% konnte für beide Alkene durch NMR-Analysen festgestellt werden (Anhang 7.4.). Beide Verbindungen wurden anschließend als Substrate in aMOx-katalysierten Reaktionen eingesetzt, um das Migrationsverhalten des *cis*- oder *trans*-Deuterids zu untersuchen. Die Evaluierung erfolgte durch massenspektrometrische sowie NMR-gestützte Analysemethoden.

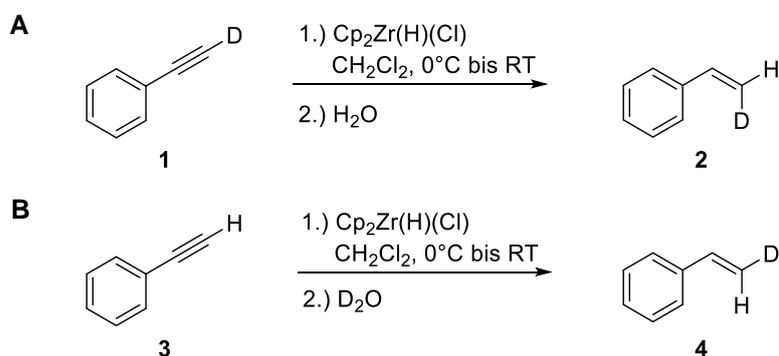


Abbildung 15 – Synthese von selektiv Deuterium-markierten Styrenen durch Hydrozirconierung mit Schwartz-Reagenz.

3.1.1.1. Massenspektrometrische Analysen zur Hydridmigration

Um aufzuklären, ob *cis*- oder *trans*-Hydride in aMOx-katalysierten Reaktionen bevorzugt migrieren, wurden die beiden zuvor synthetisierten isotopenmarkierten Substrate *cis*-Styren- β - d (**2**) und *trans*-Styren- β - d (**4**) jeweils in Biotransformationen umgesetzt und die Produkte massenspektrometrisch analysiert. Die Reaktionen wurden unter Standardbedingungen mit Zusatz einer Phenylacetaldehyd-Reduktase (PAR) durchgeführt. Durch direkte Reduktion des anti-Markovnikov Carbonyls mit PAR wurde einer Tautomerie und damit dem Verlust der generierten mechanistischen Information vorgebeugt. Beide isotopisch markierten Isomere des Styrens wurden zu Deuterium-markiertem 2-Phenylethanol umgesetzt (Molekülionenpeak $m/z = 123$). Die Massenspektren unterschieden sich jedoch deutlich hinsichtlich des erhaltenen Fragmentierungsmusters. Nicht-markiertes 2-Phenylethanol (**6**) fragmentiert nach Elektronenstoßionisierung in zwei prominente Fragmente (**Abbildung 16, A, D**). Das höchste Signal ($m/z = 91$) ist das Resultat einer Benzylspaltung.¹⁷⁸ Als Produkt einer McLafferty-Umlagerung wird das Ion $C_7H_8^+$ ($m/z = 92$) mit ebenfalls hoher Intensität beobachtet.¹⁷⁹ Eine Massenzunahme ($m/z = +1$) dieser beiden Fragmente gab Aufschluss darüber, ob Deuterid an die benzyliche

3. Ergebnisse und Diskussion

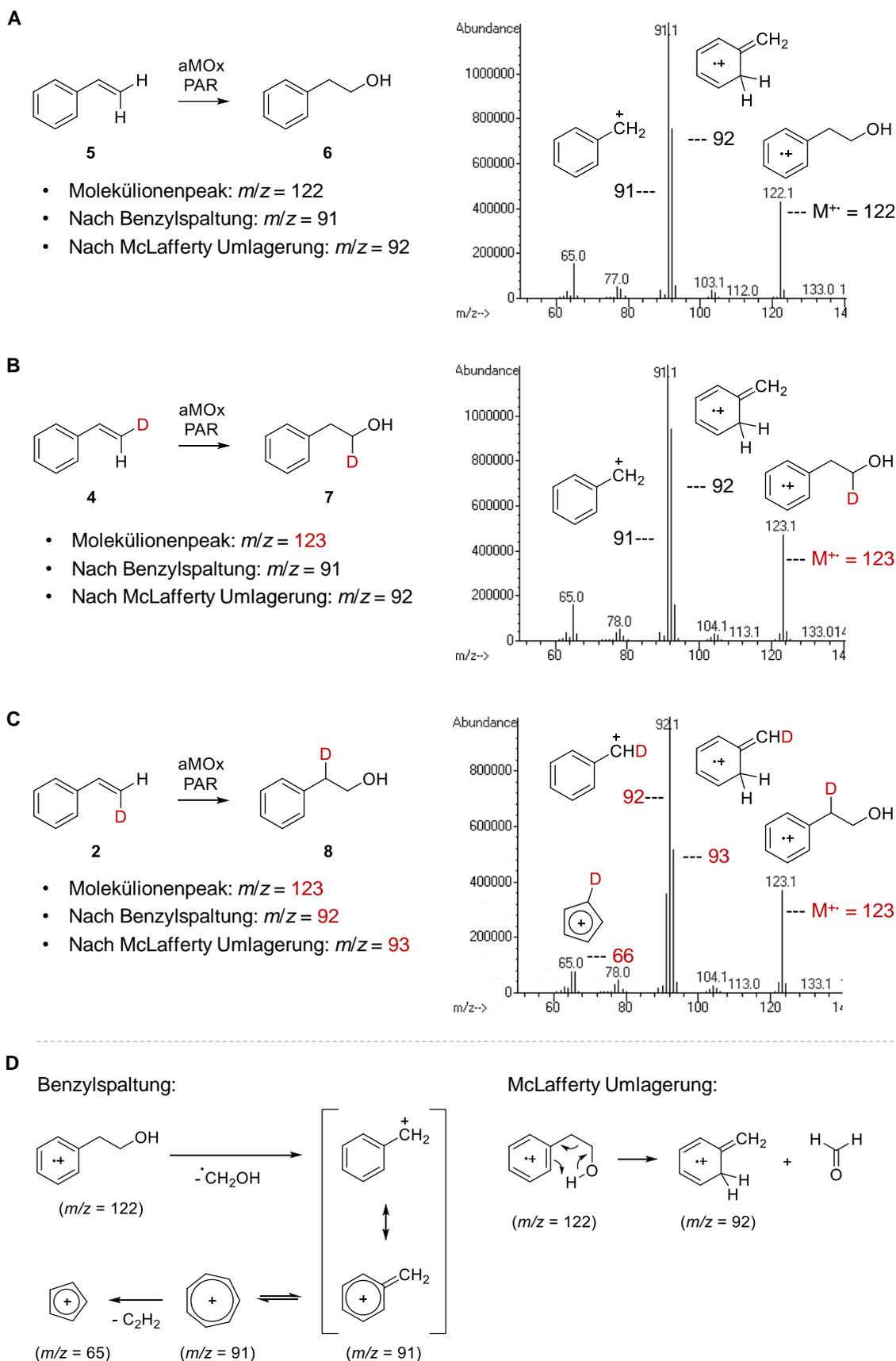


Abbildung 16 – Massenspektrometrische Analysen der entstandenen anti-Markovnikov-Produkte aus Biotransformationen mit (A) nicht-markiertem Styren (5), (B) *trans*-Styren- β -d (4) und (C) *cis*-Styren- β -d (2) katalysiert durch aMOx und PAR. Massenspektren (GC/MS mit EI) des Produktsignals und die entstandenen Fragmentierungsprodukte sind gezeigt. (D) Erläuterung des Mechanismus zur Entstehung der Fragmentierungsprodukte von 2-Phenylethanol (6) nach Elektronenstoßionisation.

Position des Moleküls migrierte. Im Falle von *trans*-Styren- β -*d* (**4**) als Substrat war das erhaltene Fragmentierungsmuster des Produkts **7** ähnlich zu dem des unmarkierten 2-Phenylethanol (**6**) (**Abbildung 16, B**). Dies deutete auf die Migration des *cis*-Hydrids anstelle des *trans*-Deuterids hin. Wurde nun *cis*-Styren- β -*d* (**2**) als Substrat verwendet, so erhöhte sich die Ionenzahl des Benzyl-Ions ($m/z = 92$) als auch des McLafferty-Umlagerungsprodukts ($m/z = 93$) für Produkt **8** um jeweils einen Zähler (**Abbildung 16, C**). In diesem Szenario fand folglich eine 1,2-Migration des Deuterids von der terminalen β -Position zur benzylicischen Position statt. Ein verbliebenes Signal mit geringer Intensität für $m/z = 91$ könnte darauf hindeuten, dass auch kleine Mengen des *trans*-Hydrids migriert sein könnten. Andernfalls könnten auch geringe Restmengen des nicht markierten Substrats Ursache dieses Befunds sein. Abschließend kann aus diesen experimentellen Daten eindeutig abgeleitet werden, dass aMOx eine bevorzugte Migration des *cis*-Deuterids bzw. *cis*-Hydrids kontrolliert.

Bisher ist noch nicht klar, ob die *cis*-selektive Hydridmigration ausschließlich von aMOx katalysiert werden kann oder ob diese Eigenschaft als Begleiteigenschaft co-evolviert wurde. Daher wurden Biotransformationen mit beiden isotope-markierten Substraten analog für das Wildtyp-Enzym P450_{LA1} und ein Intermediat der Evolution (Variante P7) durchgeführt und wiederum das Fragmentierungsmuster analysiert (**Abbildung 17**). Ein Blick auf die aus der Benzyl-Spaltung und McLafferty-Umlagerung resultierenden Massenfragmente verriet, dass die *cis*-Selektivität von Beginn an und unverändert Eigenschaft des Enzym-Grundgerüsts ist. Kontrolle über die Hydridmigration ist eine intrinsische Eigenschaft von P450_{LA1} und daraus resultierenden Varianten. Aus chemischer Sicht war zu erwarten, dass beide Hydride/Deuteride gleichermaßen wandern können. Die hier durchgeführten Experimente bestätigen die selektive Migration des Hydrids/Deuterids in *cis*-Position, katalysiert durch das Wildtyp-Enzym P450_{LA1} sowie den evolvierten Biokatalysator aMOx. Beide Enzyme sind in der Lage zwischen den terminalen Wasserstoffatomen zu diskriminieren und zeigen somit eine ungewöhnliche Katalysatorkontrolle. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen blieb jedoch ungeklärt, ob eine enantiofaciale Migration ebenfalls kontrolliert werden kann und welche Stereoselektivität für diese Transformation letztendlich zu erwarten ist. Eine NMR-gestützte Untersuchung zu diesem Sachverhalt wird im nachfolgenden Kapitel präsentiert.

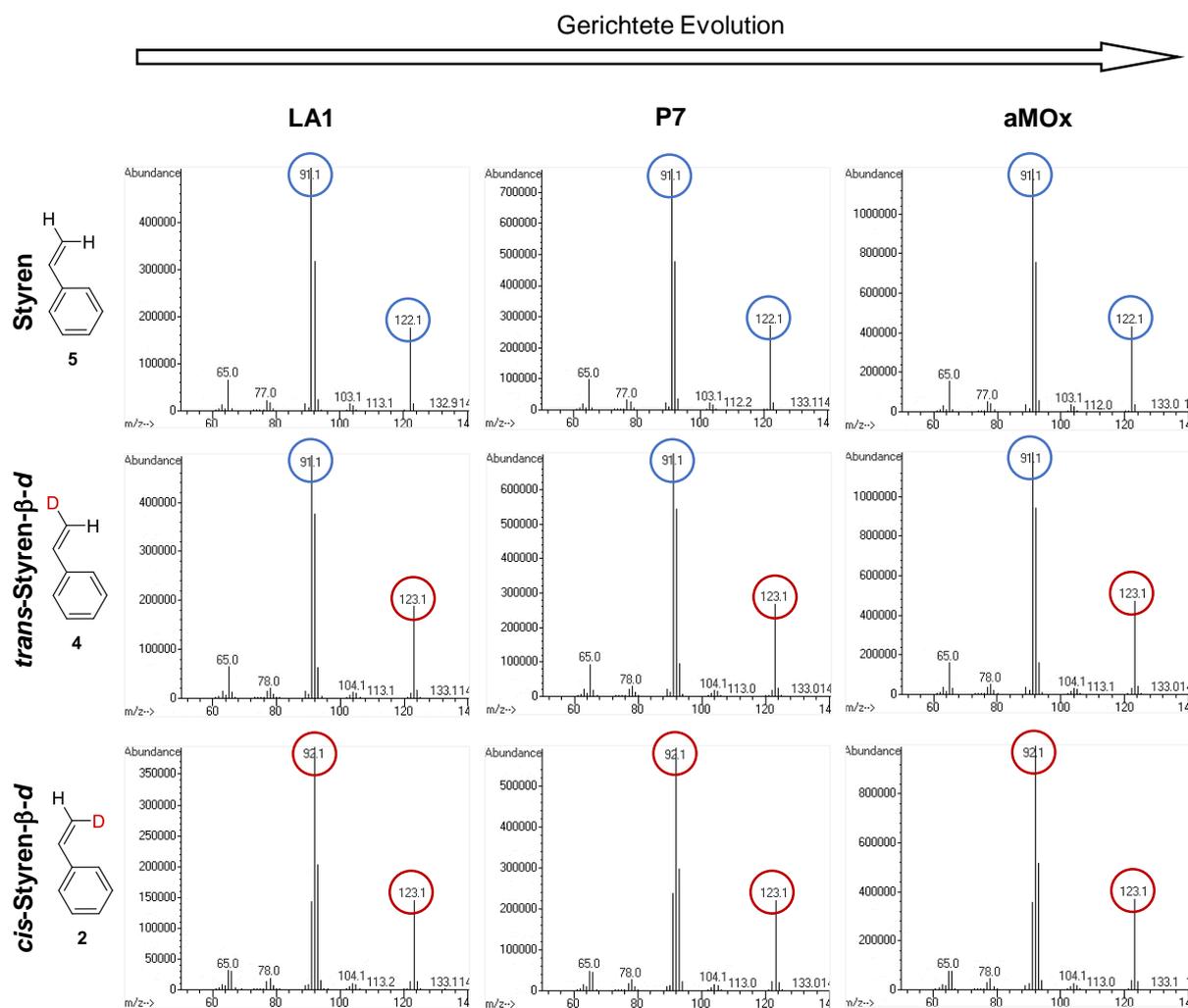


Abbildung 17 – Massenspektrometrische Analyse als Funktion der gerichteten Evolution. Massenspektren (GC/MS, EI) des anti-Markovnikov Produkts 2-Phenylethanol (**6/7/8**) nach Biotransformationen von Styren (**5**), *trans*-Styren- β -*d* (**4**) und *cis*-Styren- β -*d* (**2**) mit dem Wildtyp-Enzym P450_{LA1}, dem Evolutionsintermediat P7 und der finalen Variante aMOx. Fragmentmassen (Benzyl-Ion) mit *d*-Inkorporation sind rot hervorgehoben (blau: ohne Deuterium).

3.1.1.2. NMR-gestützte Analysen zur asymmetrischen Hydridmigration

Nachdem bekannt wurde, dass aMOx zur Kontrolle einer *cis*-selektiven Migration β -ständiger Substituenten befähigt ist, wurden weitere Untersuchungen angestellt, um die Enantioselektivität der Migration zu studieren. Dazu wurden NMR-spektroskopische Analysen an wiederum Deuterium-markierten Verbindungen durchgeführt. Um über ausreichende Mengen des benzylich deuterierten Produkts für Analysen zu verfügen, wurde *cis*-Styren- β -*d* (**2**) zunächst im präparativen Maßstab (0.40 mmol) mit aMOx und PAR umgesetzt (**Abbildung 18, A**). Das isolierte 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (41% Ausbeute) wurde anschließend mit (*S*)-(+)-MTPA-Cl zum entsprechenden Mosher-Ester umgesetzt (**Abbildung 18, C**). Dies ermöglichte eine Mosher-Ester-Analyse zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des gebildeten *d*-markierten

Stereozentrums. Zum Vergleich wurden auch die Mosher-Ester von (*rac*)-2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**) und 2-Phenylethanol (**6**) synthetisiert. Der racemische Alkohol **8** wurde zuvor durch Palladium-katalysierte reduktive Deuterierung mit isotopenmarkiertem Hypophosphit in D₂O synthetisiert (**Abbildung 18, B**).¹⁸⁰

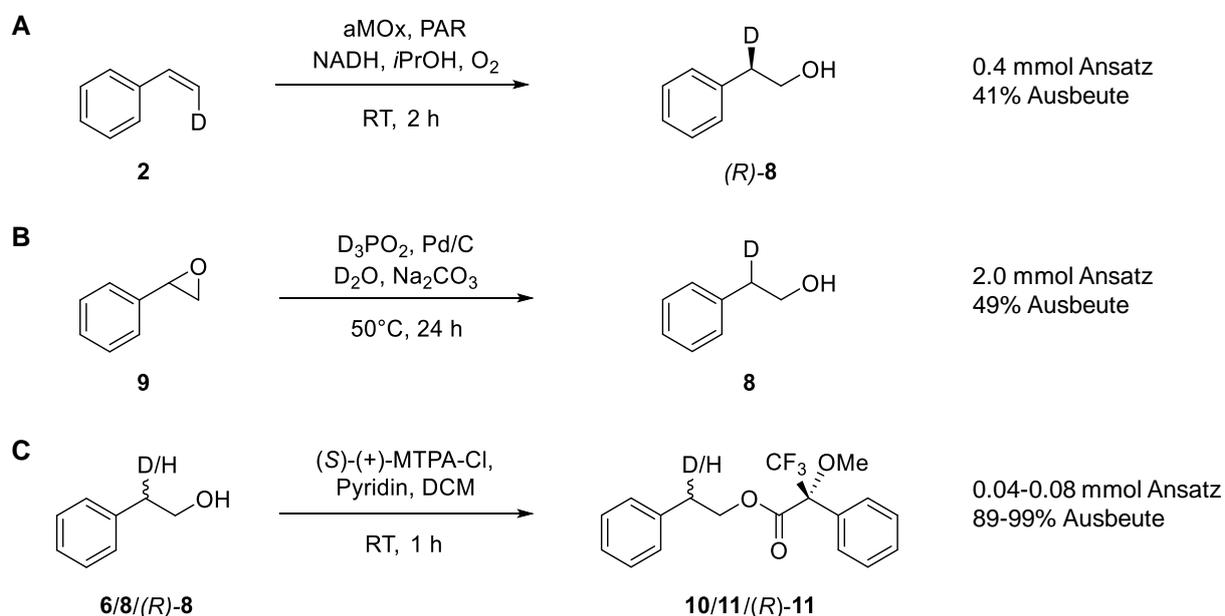


Abbildung 18 – (A) Enzymatische Synthese von (*R*)-2-Phenylethan-2-*d*-1-ol [(*R*)-**8**] und (B) Palladium-katalysierte reduktive Deuterierung von (*rac*)-2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**). (C) Mosher-Ester-Derivatisierung von 2-Phenylethanol (**6**) und 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**/(*R*)-**8**) mit (*S*)-(+)-MTPA-Cl.

Die NMR-gestützte Mosher-Ester-Analyse ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung der Konfiguration von unbekanntem stereogenen Zentren. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass eine chirale Verbindung in einen entsprechenden (*R*)-MTPA-Ester mit zwei möglichen Diastereomeren überführt wird.¹⁸¹ Während Enantiomere in standardmäßigen ¹H-NMR-Analysen nicht unterschieden werden können, so unterscheiden sich die ermittelten chemischen Verschiebungen (δ) der beiden möglichen Diastereomere deutlich voneinander. Dies erlaubt einen Rückschluss auf das Enantiomerenverhältnis der analysierten chiralen Verbindung. Für diastereomere Mosher-Ester mit Deuterium-Stereozentrum unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen jedoch nicht besonders deutlich. Wie in **Abbildung 19, A-b** gezeigt, überlappen die Signale der benzyliken Protonen der beiden deuterierten Diastereomere (**11**) und verhindern eine getrennte Betrachtung. Aus diesem Grund wurden die Spektren durch Entkopplung vereinfacht. Die Entkopplung erfolgte durch selektive Anregung der Methylenprotonen des β -C-Kohlenstoffatoms ($\delta = 4.52$) unter Verwendung des Bruker zghd.2 Standard-Pulsprogramms.^{182,183} Das Signal des racemischen *d*-Stereozentrums vereinfachte sich zu einem basisliniengetrennten Dublett, welches einfach integriert werden konnte (**Abbildung 19, B-b**). Die Integration entsprach annähernd einem 1:1-Verhältnis und

repräsentierte beide möglichen Mosher-Diastereomere und folglich auch beide Enantiomere des 2-Phenylethan-2-*d*-1-ols (**8**) (**Abbildung 20, B**). Eine in der Probe enthaltene leichte Verunreinigungen durch die nicht-deuterierte Spezies **6** führte zu einem Quartett-Signal (wie in **Abbildung 20, C**), das zu einer partiellen Überlagerung des Dubletts führte und leichte Ungenauigkeiten bei der Integration zur Folge hatte.

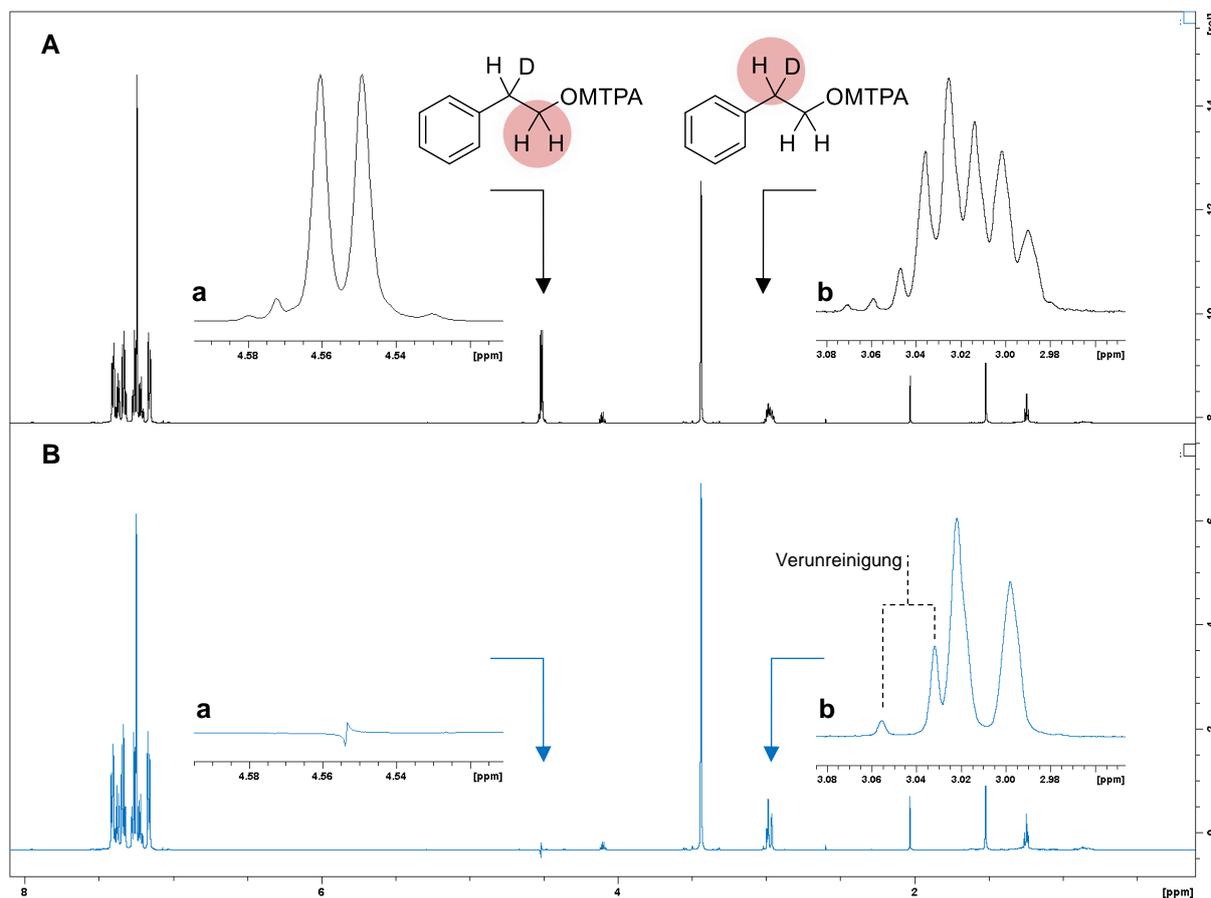


Abbildung 19 – (A) ¹H-NMR-gestützte Mosher-Ester-Analyse von racemisch deuteriertem 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**). Zur detaillierten Betrachtung sind die Signale für die (a) β -Protonen und (b) benzylicen Protonen vergrößert dargestellt. (B) Vereinfachung des Spektrums durch Entkopplung. Dies erfolgte durch selektive Anregung der β -ständigen Methylenprotonen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 4.52$ ppm mit dem zghd.2 Puls-Programm.

Analog zu der Mosher-Ester-Analyse für das racemisch deuterierte 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**) wurde dasselbe Verfahren zur Bestimmung des Deuterium-Stereozentrums des aus Biotransformationen erzeugten Produkts angewendet. Das durch Entkopplung vereinfachte NMR-Spektrum bestätigte das Vorhandensein von Stereoselektivität in der katalytischen Reaktion (**Abbildung 20, A**). Ein Vergleich mit Literaturdaten ergab, dass das gebildete Stereozentrum überwiegend (*R*)-konfiguriert ist.^{182,183} Durch Integration beider Signale wurde ein Enantiomerenverhältnis von >90:10 (*R*:*S*) ermittelt. Wie die Probe des synthetisierten Racemats **8** (**Abbildung 20, B**), enthielt auch die aus Biotransformationen erhaltene Verbindung (*R*)-**8** geringe Mengen des nicht-deuterierten Produkts **6**. Es wird vermutet, dass diese Spezies

ihre Deuterium-Markierung durch Keto-Enol-Tautomerie des Aldehyds verloren haben könnte, bevor sie zu dem entsprechenden Alkohol reduziert wurde. Diese Verunreinigung wurde bei der Integration der beiden Signale so weit wie möglich vernachlässigt.

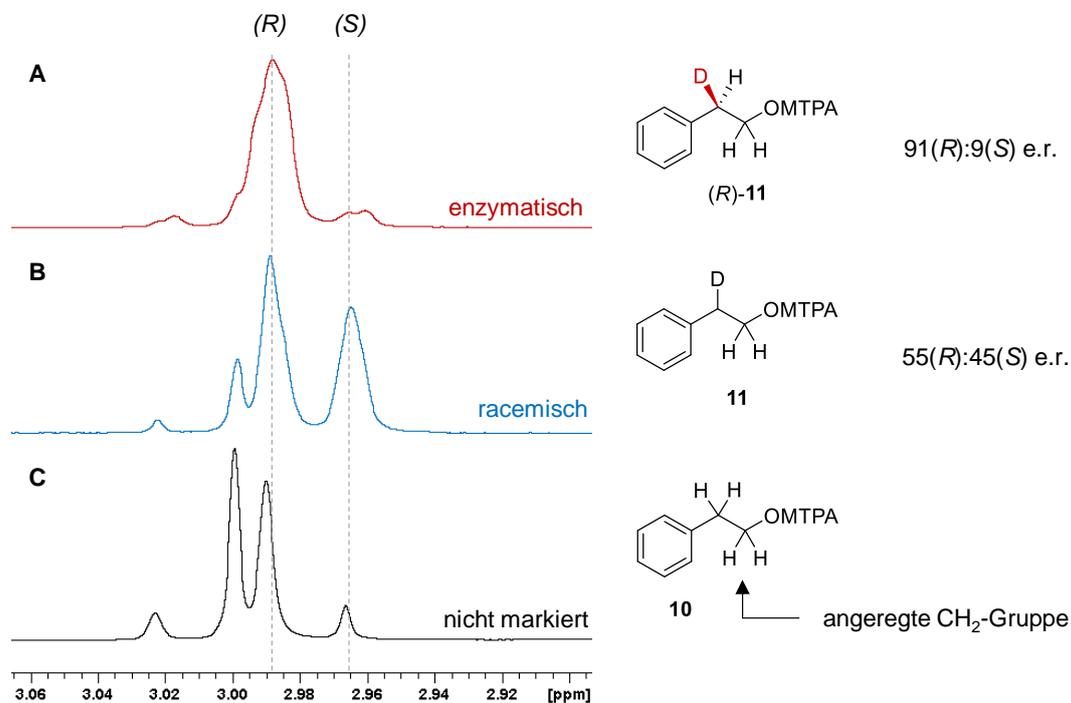


Abbildung 20 – Durch Entkopplung vereinfachte $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (selektive Anregung der β -ständigen Methylenprotonen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 4.52$ mit dem zghd.2 Puls-Programm). Gezeigt sind die Signale der benzylicischen Protonen. **(A)** Analyse des (R)-MTPA-Esters (R)-11 des aus Biotransformationen mit aMOx und PAR gewonnenen 2-Phenylethan-2-d-1-ols (R)-8. **(B)** Analyse eines racemischen Standards 11. Leichte Verunreinigungen mit der nicht-deutierten Spezies 10 sind enthalten. **(C)** Zum Vergleich wurde auch ein Spektrum des nicht-deutierten Mosher-Esters 10 von 2-Phenylethanol (6) aufgenommen. Die Enantioselektivitäten chiraler Verbindungen wurden durch Integration ermittelt. Die Zuordnung der Enantiomere erfolgte mithilfe von berichteten Literaturwerten.^{182,183}

Die ermittelte Enantioselektivität lässt die Folgerung zu, dass die von aMOx katalysierte 1,2-Hydrid-/Deuteridmigration selektiv auf der *re*-Seite des intermediären Carbokations erfolgt. Das Enzym ist damit nicht nur in der Lage zwischen *cis*- und *trans*-Hydriden zu unterscheiden, sondern weist auch ein hohes Maß an Kontrolle über den anschließenden enantiofacialen Hydridtransfer auf. Es ist derzeit nicht klar, ob das mit einem Anteil von <10% gebildete (S)-Enantiomer durch Tautomerisierung des Aldehyds (12) oder durch eine unselektive 1,2-Hydridmigration entsteht. Die ermittelte Enantioselektivität von aMOx reiht sich mit Erkenntnissen ein, die für die enantioselektive Umsetzung von α -Methylstyren bestimmt werden konnten (**Abbildung 21**). Auch in diesem Fall findet die Migration des *cis*-Hydrids über die *re*-Seite statt, was zur Bildung von (S)-2-Phenylpropanal (13) führt.⁷² Es handelt sich um dieselbe Enantiopräferenz wie im Fall der hier bestimmten Deuteridmigration und zeigt ebenfalls eine Enantioselektivität von >90% auf. Dieser Vergleich kann als Bestätigung der ermittelten Daten aus NMR-Analysen gewertet werden und zeigt, dass zwei verschiedene Analysemethoden zum identischen Ergebnis führen.

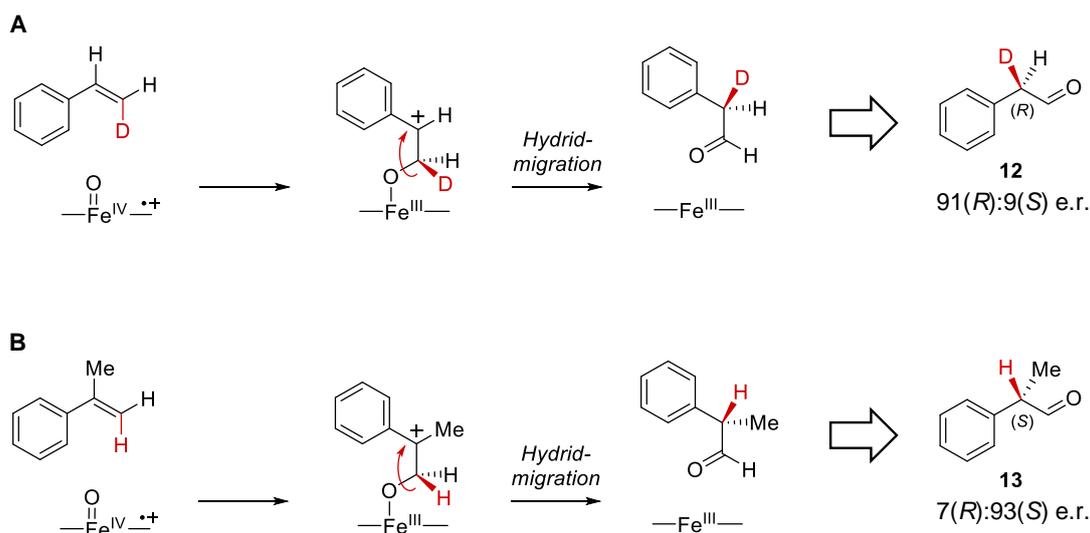


Abbildung 21 – Schematische Darstellung der enantioselektiven 1,2-Deuterid- bzw. Hydridmigration mit **(A)** *cis*-Styren-β-*d* (**2**) und **(B)** α-Methylstyren katalysiert durch aMOx. Die Enantioselektivitäten für (*R*)-2-phenylacetaldehyde-2-*d* (**12**) wurden durch NMR-gestützte Mosher-Ester-Analyse ermittelt, während für (*S*)-2-Phenylpropanal (**13**) eine chirale GC-Analyse durchgeführt wurde.⁷² Die jeweils ermittelten Enantiomerenverhältnisse (e.r.) sind angegeben.

Insgesamt stärken diese Ergebnisse die Erkenntnis, dass aMOx der erste Katalysator ist, der eine enantioselektive anti-Markovnikov-Alkenoxidation durchführen kann. Generell sind katalytische, enantioselektive 1,2-Migrationen sehr anspruchsvoll zu kontrollieren. Bisher sind solche asymmetrischen Transformationen weitestgehend auf die Migration von Alkyl- oder Phenylgruppen beschränkt (**Abbildung 22, A**).^{184–187} Auch stereoselektive 1,2-Hydridmigrationen sind zwar bereits bekannt, doch sind typischerweise chirale Moleküle für diesen substratgesteuerten Prozess erforderlich. Die stereochemische Information ist dabei bereits in der Struktur des Ausgangsmaterials codiert (**Abbildung 22, B**).^{188,189} Im Gegensatz dazu erreicht aMOx Enantioselektivität bei der 1,2-Hydridmigration durch Katalysatorsteuerung. Diese neuartige Enzymfunktion könnte damit zukünftig zur Kontrolle vieler weiterer Umlagerungsreaktionen genutzt werden, um diverse chirale Produkte direkt aus Alkenen zu synthetisieren.

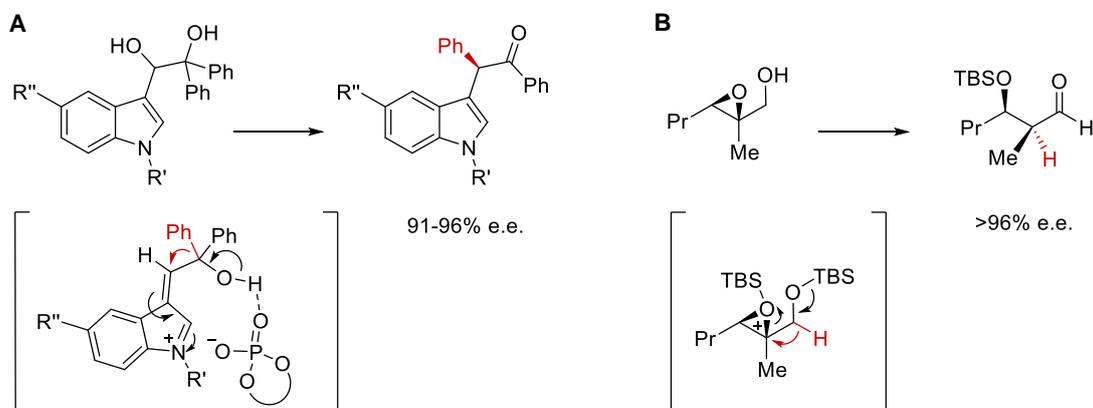


Abbildung 22 – Literaturbeispiele für asymmetrische Alkyl- und Hydridmigrationen. **(A)** Chirale Phosphorsäure-katalysierte, asymmetrische Pinakol-Umlagerung.¹⁸⁴ **(B)** Enantioselektiver, intramolekularer Transfer eines Hydrids im Rahmen einer Semipinacol-Umlagerung.^{188,189}

3.1.2. Computergestützte mechanistische Analysen

Bei der Metall-Oxo-vermittelten Alkenoxidation mit synthetischen Katalysatoren oder P450-Enzymen entstehen hauptsächlich Epoxide. Es wird davon ausgegangen, dass diese Reaktion aufgrund eines hochgradig konzertierten Prozesses kinetisch bevorzugt ist. Das thermodynamisch favorisierte Carbonyl-Produkt, das infolge eines gekoppelten Elektronen-/Hydridtransferprozess aus einer intermediären Radikal-Spezies hervor gehen kann, wird mit hochvalenten Metall-Oxo-Spezies nur in geringen Mengen als Nebenprodukt gebildet. Mit der entwickelten anti-Markovnikov Oxygenase (aMOx) wurde ein Enzym geschaffen, das den Oxo-Transfer auf einen carbonylselektiven Reaktionspfad umleitet und so die Bildung des thermodynamischen Produkts erreicht. Da es sich hierbei um den ersten Katalysator handelt, der solche katalytische Oxidationsmittel für die hochselektive Carbonylbildung anstelle von Epoxidierungen verwendet, ist dies eine gute Gelegenheit zu untersuchen, wie die 12 eingeführten Aminosäureaustausche in aMOx den Oxo-Transfer kontrollieren. In Kollaboration mit Jordi Soler i Parpal und Dr. Marc Garcia-Borràs (Universität de Girona) wurden daher computergestützte Analysen zum weiteren Verständnis des aMOx-Mechanismus durchgeführt. Die von unseren Partnern generierten Ergebnisse und Interpretationen werden in diesem Kapitel vorgestellt und als Diskussionsgrundlage herangezogen, um mit experimentellen Ergebnissen in Kontext gesetzt zu werden.

Zunächst wurden von unseren Kollaborationspartnern Dichtefunktionaltheorie-Berechnungen (DFT) zur Untersuchung der Oxidation von Styren an einem vereinfachten Katalysatormodell durchgeführt (**Abbildung 23**). Das Modell umfasste eine Eisen-Oxo-Spezies mit axial koordinierendem Methanthiolat (ähnlich zu *Compound I*), ohne das Protein einzubeziehen. In den Berechnungen wurden die beiden energetisch zugänglichen Spinzustände des Eisens, Dublett (d) und Quartett (q), berücksichtigt. Aus den ermittelten Energien (freie Energie und elektronische Energie) für alle relevanten Übergangszustände und Intermediate ging hervor, dass die Carbonylbildung in einem simplen Häm-Porphyrin-System energetisch zugänglich und gegenüber der Epoxidierung sogar leicht bevorzugt ist. Dies ist eine große Überraschung, da dieses Ergebnis im Gegensatz zu der Beobachtung steht, dass solche Metall-Oxo-Spezies Alkene mit hoher Selektivität epoxidieren.^{126,129,190}

Im Detail wird anhand der erstellten Potentialhyperfläche (*potential energy hypersurface*, PES) für das enzymfreie System ersichtlich, dass die Bildung der ersten C-O-Bindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Dieser führt zur Entstehung eines radikalischen Zwischenprodukts (Int1-q) mit einem großen Überschuss an kinetischer Energie ($\Delta\Delta G = 22.1$ kcal/mol). Ausgehend von diesem radikalischen Intermediat konkurrieren Carbonylbildung ($\Delta G^\ddagger = 0.8$ kcal/mol) und Epoxidierung ($\Delta G^\ddagger = 2.7$ kcal/mol) auf unterschiedlichem Niveau. Der carbonylselektive Reaktionspfad ist gemäß den berechneten Energien ein annähernd barrierefreier Prozess, der

über ein carbokationisches Zwischenprodukt (Int2-q) führt, gefolgt von einer 1,2-Hydridmigration (ÜZ3-q). Doch obwohl zur Epoxidierung von Styren ein energetisch höher liegender Übergangszustand (ÜZ2-q) überwunden werden muss, belegen experimentelle Daten, dass mit solchen Katalysatorsystemen Epoxide chemoselektiv gebildet werden. Die Dominanz der Epoxidierung lässt sich mit diesem statischen DFT-Modell zunächst nicht erklären. Dieser Widerspruch zwischen theoretischen und experimentellen Ergebnissen lässt sich damit auflösen, indem das dynamische Verhalten der vorliegenden Intermediate berücksichtigt wird.

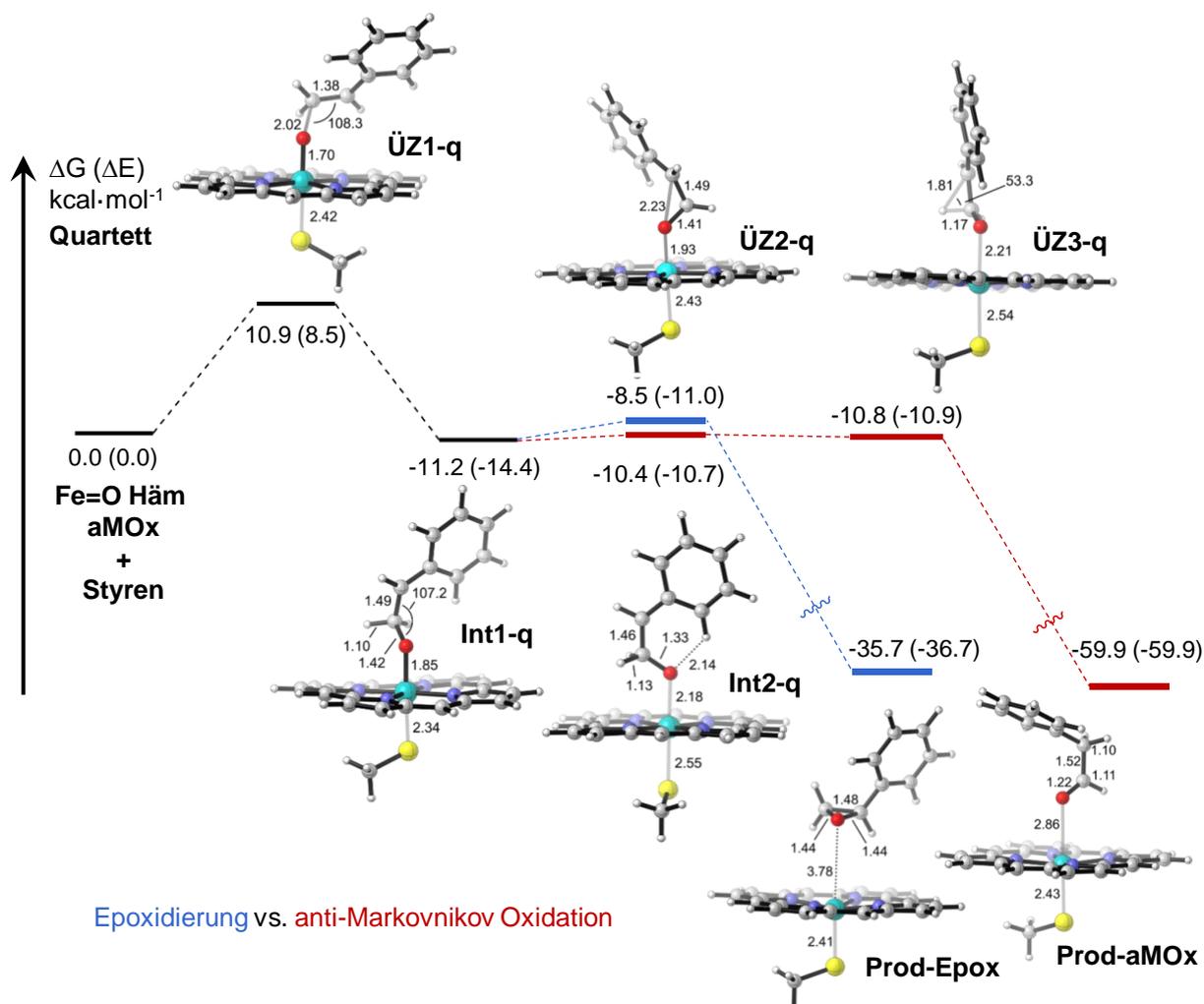


Abbildung 23 – DFT-Berechnungen zur Eisen-Oxo-vermittelten Oxidation von Styren (5) an einem vereinfachten enzymfreien System (ähnlich *Compound I*) für den Quartett-Spinzustand (q), dargestellt als Potentialhyperfläche (PES). Freie Energien (elektronische Energien) sind für alle relevanten stationären, energieminierten Übergangszustände (ÜZ) und Intermediate (Int) aufgetragen. Energien, Bindungslängen und Bindungswinkel für die dargestellten Strukturen sind in kcal mol⁻¹, Ångström (Å) sowie Grad (°) angegeben. Die Grafik wurde von unseren Kollaborationspartnern erstellt und für diese Arbeit überarbeitet.

Um das dynamische Verhalten des radikalischen Intermediats zu verstehen, wurden 40 quasiklassische Trajektorien ausgehend vom ersten Übergangszustand (ÜZ1-q) durch Molekulardynamik analysiert. Keine der Trajektorien führte dabei zum carbokationischen

Intermediat (Int2-q) oder zum finalen Carbonylprodukt, während 65% der erzeugten Trajektorien zur Epoxidbildung führten. Darüber hinaus ergaben diese Untersuchungen, dass die Schwingungs- und Rotationsbewegungen, die zur Überwindung des ersten Übergangszustands erforderlich sind, denen ähneln, die zur Bildung des Epoxids nötig sind (**Abbildung 24, A**). Dies deutet darauf hin, dass eine dynamische Kopplung (*dynamic match*¹⁹¹) zwischen den Übergangszuständen der Radikalbildung und denen der Epoxidbildung (ÜZ2-q) zu einer chemoselektiven Epoxidierung führt. Mit anderen Worten beschrieben: Das radikalische Intermediat weist im *status nascendi* ein dynamisches Verhalten auf, das es förmlich zur Epoxidbildung anregt. Zusätzlich begünstigt die niedrige Energiebarriere von ÜZ2-q eine sehr schnell stattfindende Epoxidierung. Der Reaktivität von nicht-äquilibrierten Intermediaten wurde in letzter Zeit viel Aufmerksamkeit gewidmet. Es hat sich in diesen Arbeiten gezeigt, dass die überschüssige kinetische Energie und deren Verteilung die Reaktivität der Zwischenprodukte sowohl in Lösung als auch in (bio)katalytischen Reaktionen steuern kann und damit den Reaktionsausgang determiniert.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Demzufolge ist zur Bevorzugung des carbonylselektiven Reaktionspfads ein Katalysator nötig, der Zugang zu kinetisch äquilibrierten Intermediaten ermöglicht. Gleichzeitig ist eine Kontrolle über spezifische Konformationen der reaktiven Zwischenprodukte erforderlich, damit zum einen das carbokationische Intermediat durch Resonanz stabilisiert wird und zum anderen die Orbitale für die 1,2-Hydridmigration vorjustiert werden können. Auch die hier vorgestellten Ergebnisse der MD-Simulationen deuten darauf hin, dass ein Katalysator, der Metall-Oxo-Spezies für die chemoselektive Carbonylbildung verwendet, besonders die Dynamik des radikalischen Intermediats kontrollieren muss. Als Nächstes wurde daher untersucht, wie die evolvierte anti-Markovnikov Oxygenase zur Überwindung der hier beschriebenen dynamischen Kopplung beiträgt.

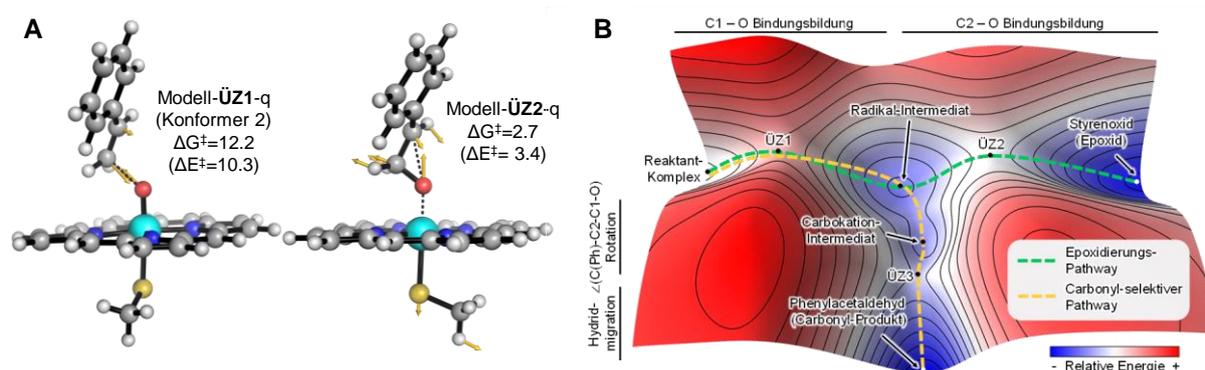


Abbildung 24 – (A) Quasiklassische MD Trajektorien für DFT-optimierte Übergangszustände im enzymfreien Modellsystem. Gezeigt sind Snapshots für den ersten Übergangszustand (ÜZ1-q, Bildung der ersten C-O-Bindung) und den Übergangszustand der Epoxidierung (ÜZ2-q). Die gelben Pfeile sind Verschiebungsvektoren, welche die imaginären Frequenzen der jeweiligen Übergangszustandsstruktur darstellen. (B) Qualitative 3D-Energielandschaft. Der kinetisch bevorzugte Epoxidierungsweg (grüne Linie) und der thermodynamisch favorisierte carbonylselektive Reaktionspfad (orange Linie) sind unter Angabe der Übergangszustände und Intermediate eingezeichnet. Die Grafik wurde von unseren Kollaborationspartnern erstellt und für diese Arbeit überarbeitet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im nächsten Schritt wurde von unseren Kollaborationspartnern untersucht, inwieweit das modifizierte aktive Zentrum von aMOx die Substratbindung und die anschließende Metall-Oxo-vermittelte Oxidation beeinflusst. Zunächst wurden dazu die auf einem Homologiemodell basierenden Strukturen von P450_{LA1} und aMOx durch Molekulardynamik-Simulationen (MD) in einem ausgedehnten Zeitraum optimiert (5 Replikate mit je 1000 ns Sampling-Zeit). Aus der Gegenüberstellung beider Strukturen wurde ersichtlich, dass das aktive Zentrum von P450_{LA1} durch die gerichtete Evolution signifikant umgestaltet wurde. Die zentrale Kavität von aMOx wurde im Vergleich zum Wildtyp deutlich schmaler. Dies deutet darauf hin, dass die zugänglichen Substratbindungsmodi im evolvierten Enzym viel eingeschränkter sind, was zudem durch Dockingstudien mit dem Substrat Styren bestätigt wurde. Nur relevante Angriffskonformationen (*near attack conformations*, NAC) wurden dabei berücksichtigt. Das Wildtyp-Enzym bindet das

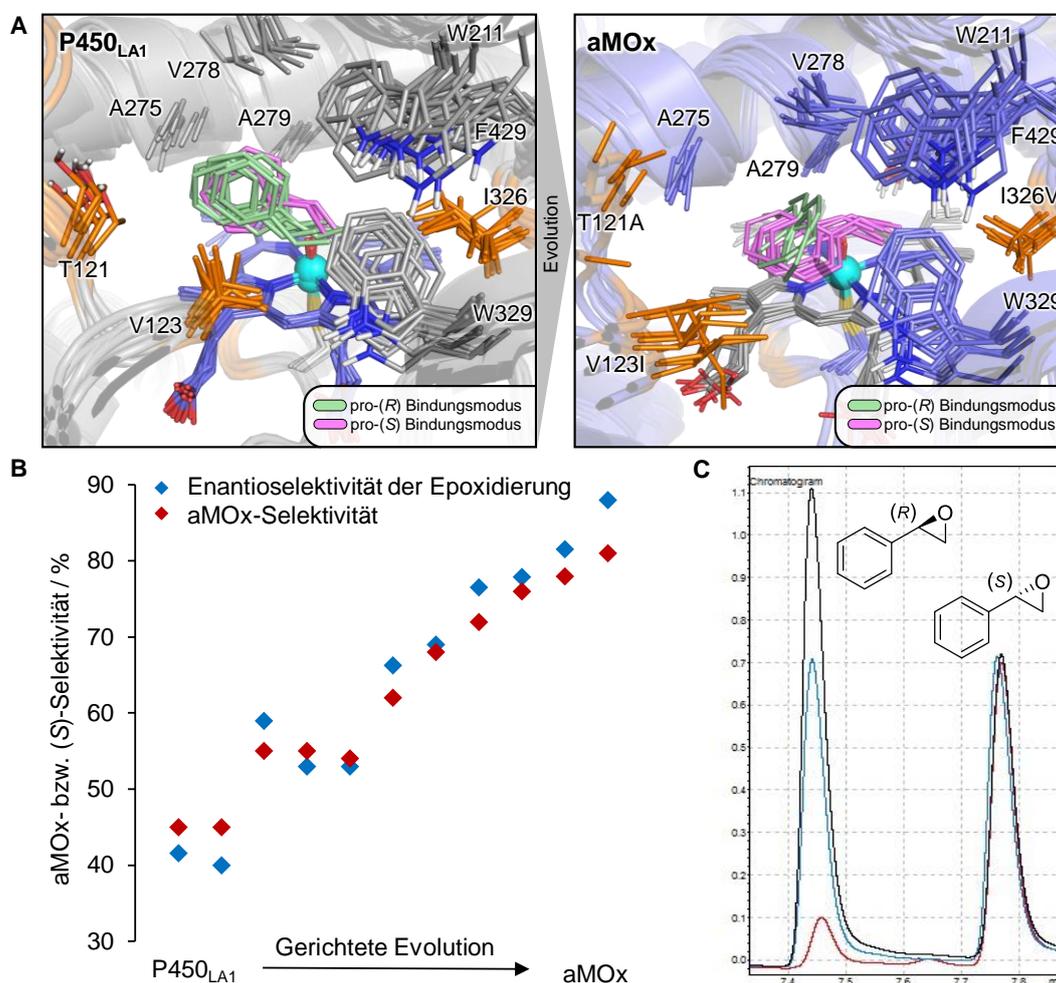


Abbildung 25 – (A) Dockingstudie von Styren (5) in MD-optimierten Strukturen von P450_{LA1} (links) und aMOx (rechts). Relevante, nicht-polare Aminosäuren sind orange eingefärbt. Die beiden möglichen Bindungsmodi sind in Grün (pro-(R)-Bindungsmodus) und Pink (pro-(S)-Bindungsmodus) dargestellt. Die Grafik wurde von unseren Kollaborationspartnern erstellt und für diese Arbeit überarbeitet. (B) Enantioselektivität der Epoxidierung als Funktion der gerichteten Evolution. Diese ändert sich während der Evolution schrittweise analog zur aMOx-Selektivität. Während P450_{LA1} vorzugsweise das (R)-Enantiomer mit 60:40 (R:S) erzeugt, wird die Epoxidierung während der gerichteten Evolution immer (S)-selektiver und erreicht für aMOx ein Verhältnis von 14:86 (R:S). (C) Chirale GC-Chromatogramme von ausgewählten Varianten: P450_{LA1} (schwarz), Variante P7 (blau) und aMOx (rot).

Substrat **5** in verschiedenen pro-(*R*)- und pro-(*S*)-Konformationen (bezogen auf die Stereokonfiguration des resultierenden Epoxids), während aMOx selektiv für die pro-(*S*)-Konformation ist (**Abbildung 25, A**). Als Ursache hierfür können insbesondere subtile Variationen an nicht-polaren Aminosäuren ausgemacht werden (z.B. M118L, V123I, I326V), die einige zuvor erreichbare Bindungsmodi des Styrens einschränken. Diese Präferenzen der Substratbindung wurden experimentell bestätigt, indem die Enantioselektivität der Epoxidierung als Funktion der Evolution verfolgt wurde (**Abbildung 25, B, C**). Während P450_{LA1} beide möglichen Epoxid-Enantiomere bildet, bringt aMOx hauptsächlich das (*S*)-Enantiomer hervor. Die hier beschriebene Einschränkung der Bindungsmodi könnte auch die zugänglichen Konformationen der Radikal- und Carbokation-Zwischenprodukte einschränken. Daher wurden im Folgenden QM/MM-Berechnungen für beide Enzymsysteme durchgeführt, um die Energetik der reaktiven Zwischenstufen zu beschreiben.

Zum weiteren Verständnis reaktiver Intermediate und Übergangszustände wurde von unseren Kollaborationspartnern ein quantenmechanischer und molekularmechanischer (QM/MM) Ansatz verfolgt.¹⁹⁶ Ein solches Vorgehen wird häufig für Proteine angewendet, da der Rechenaufwand bei einer reinen QM-Betrachtung des gesamten Systems exorbitant hoch wäre. Daher wurde ein QM-Ansatz ausschließlich für das Substrat sowie den Häm-Cofaktor angewendet und mit der molekularmechanisch modellierten Proteinumgebung kombiniert. Für P450_{LA1} ging aus dieser Betrachtung hervor, dass viele verschiedene Ähnlichkeiten mit dem enzymfreien DFT-Modell vorliegen. Erneut ist der carbonylselektive Reaktionspfad energetisch zugänglich und ausgehend vom radikalischen Intermediat ein annähernd barrierefreier Prozess. Da für das Wildtyp-Enzym nur geringe Mengen des Carbonylprodukts experimentell nachgewiesen werden können, bedeutet dies dennoch, dass der thermodynamische Gleichgewichtszustand des radikalischen Intermediats auch in dieser Proteinumgebung nicht ausreichend stabilisiert wird und der Anteil der kinetisch begünstigten Epoxidierung nicht signifikant abgeschwächt wird. Die Reaktion steht damit nach wie vor unter dynamischer Kontrolle. Eine geringe Promiskuität für die Carbonylbildung könnte durch Einschränkung mancher Substratkonformationen im aktiven Zentrum erklärt werden, was dazu beiträgt, die kinetische Energie schneller zu verteilen als dies in freier Lösung der Fall ist.

Aus QM/MM-Analysen für aMOx wurde deutlich, dass sich die berechnete Potentialhyperfläche maßgeblich von der des enzymfreien Modellsystems und von P450_{LA1} unterscheidet (**Abbildung 26**). Das radikalische Intermediat (Int1) wird wesentlich besser stabilisiert und die Energiebarriere der Epoxidierung liegt deutlich höher ($\Delta G^\ddagger = 5.7$ kcal/mol). Insgesamt wird die dynamische Kopplung zwischen den Übergangszuständen der Radikalbildung und denen der Epoxidbildung reduziert, sodass beide Reaktionspfade verstärkt über ein thermodynamisch stabilisiertes radikalisches Intermediat geleitet werden. Anders formuliert bedeutet dies, dass die überschüssige kinetische Energie des Übergangszustands (ÜZ1) durch aMOx besser reguliert

(bzw. umgeleitet) wird und sich somit die Lebenszeit des radikalischen Intermediats verlängert. Ausgehend von diesem Punkt ist der Übergang zum carbokationischen Intermediat (Int2) annähernd barrierefrei, während für die Epoxidierung eine deutlich höhere Aktivierungsbarriere überwunden werden muss. Die Energieunterschiede beider Reaktionspfade bestimmen im aMOx-System über die Chemoselektivität der Reaktion. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass intrinsische dynamische Effekte durch das neu geschaffene aktive Zentrum von aMOx überwunden werden können. Darüber hinaus wird das radikalische Intermediat in einer definierten Konformation kontrolliert, welche keine Epoxidierung erlaubt, sondern Grenzorbitale für eine gekoppelten Elektronen-/Hydridtransfer ausrichtet.

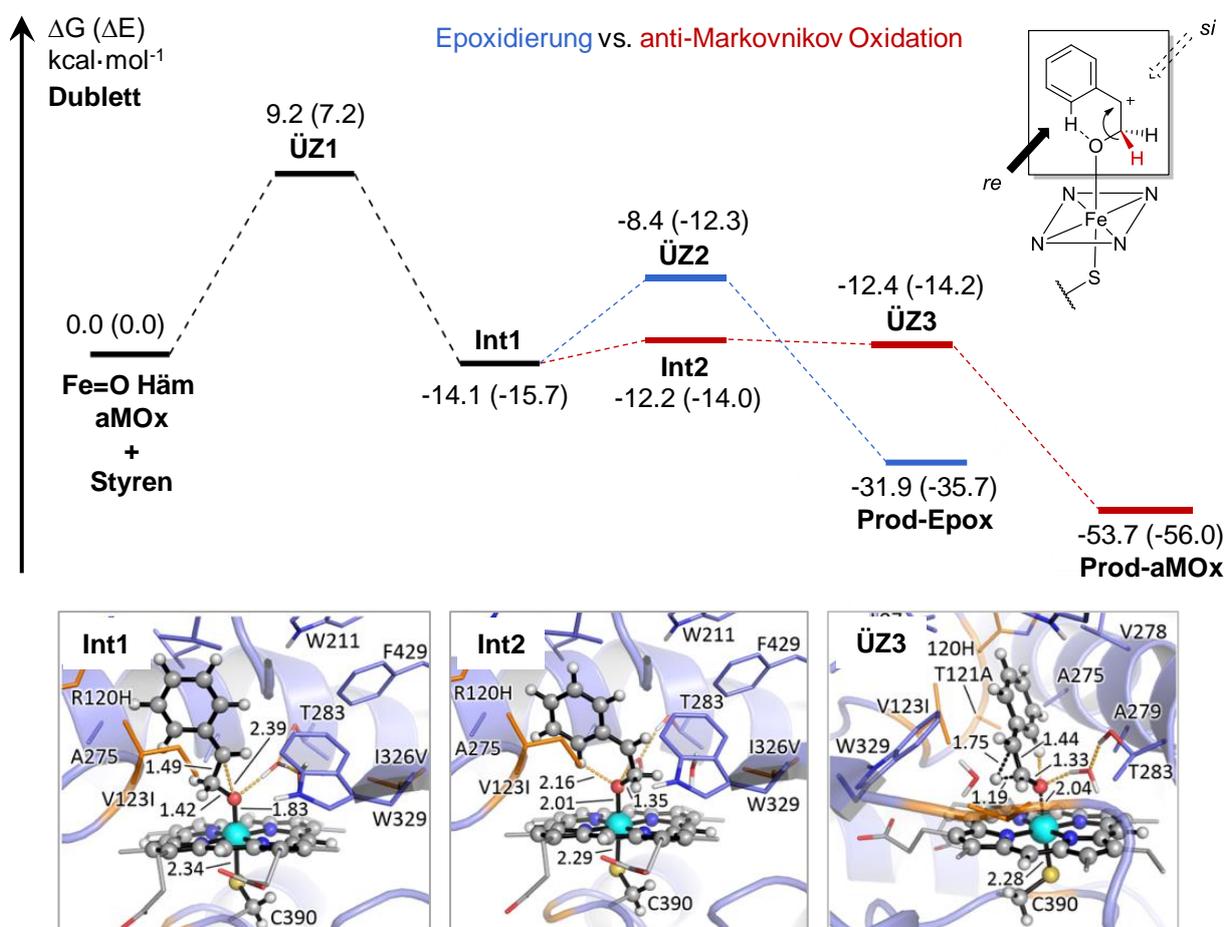


Abbildung 26 – QM/MM-Berechnungen zur Oxidation von Styren mit aMOx für den Dublett-Spinzustand dargestellt als Potentialhyperfläche (PES). Freie Energien (elektronische Energien) sind für alle relevanten stationären, energieminierten Übergangszustände (ÜZ) und Intermediate (Int) aufgetragen. MD-Snapshots für das radikalische (Int1) und carbokationische Intermediat (Int2) sind gezeigt, sowie eine schematische Darstellung des Übergangszustands (ÜZ3), der für die *cis-re*-Hydridmigration eingenommen wird. Die Grafik wurde von unseren Kollaborationspartnern erstellt und für diese Arbeit überarbeitet.

Um den Prozess des Hydridtransfers genauer zu verstehen, wurde dieser Schlüsselschritt für aMOx genauer beleuchtet. Interessanterweise zeigte die QM/MM-Analyse dieses Systems, dass für das carbokationische Intermediat (Int2) eine Konformation eingenommen wird, die eine 1,2-

Hydridmigration der β -ständigen Substituenten begünstigt (**Abbildung 26**). Dabei wird der Phenylring im aktiven Zentrum so orientiert, dass eine polare Interaktion zwischen dem Sauerstoffatom und dem nächstgelegenen phenylischen Proton ausgebildet wird. Der entstandene sechsgliedrige Ring bildet eine imaginäre Spiegelebene und unterteilt das Molekül in zwei enantiotope Seiten. Diese Ebene ist deckungsgleich mit dem trigonal-planaren Hybridorbital des sp^2 -Carbokations. Die beiden Hydride sind symmetrisch zu dieser Spiegelebene angeordnet. Theoretisch könnten beide Hydride gleichberechtigt in einem der beiden Halbräume (*re*- oder *si*-Seite) zur finalen Bildung des Aldehyds migrieren. Aus der QM/MM-Analyse für aMOx geht hervor, dass die Energiebarriere für die *trans-si*-1,2-Hydridmigration bei $2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ liegt, während die *cis-re*-1,2-Hydridmigration barrierefrei abläuft. Es wird postuliert, dass die Hydridmigration durch die chirale Umgebung des aktiven Zentrums von aMOx auf eine Weise beeinflusst wird, dass eine klare Enantiopräferenz vorliegt. Der Energieunterschied beider Migrationstrajektorien ist jedoch nicht so deutlich, dass eine Migration des *trans*-Hydrids zu geringen Anteilen ausgeschlossen werden kann. Die gewonnenen Ergebnisse sind mit experimentellen Daten in Einklang zu bringen und bekräftigten, dass die 1,2-Hydridmigration sowohl *cis*- als auch enantioselektiv ist und damit überwiegend auf *re*-Seite des Übergangszustandes erfolgt (vergleiche mit Kapitel 3.1.1.2.).

3.1.3. Untersuchung weiterer P450-Enzyme hinsichtlich ihrer Promiskuität

3.1.3.1. Anti-Markovnikov Oxidations-Potenzial in der CYP116B-Familie

Es stellte sich die Frage, ob der Katalysezyklus der anti-Markovnikov Oxidation (aMOx-Zyklus) ausschließlich mit P450_{LA1} und davon abgeleiteten Varianten zugänglich ist oder ob auch andere Cytochrom P450 Monooxygenasen Promiskuität für diese anspruchsvolle katalytische Transformation aufweisen. Um dies zu beantworten, wurde ein Set von autarken P450-Enzymen für die Umsetzung von Styren eingesetzt und das anti-Markovnikov Oxidations-Potenzial evaluiert. Autarke Cytochrom P450 Monooxygenasen (*self-sufficient* P450s) zeichnen sich dadurch aus, dass Häm-Domäne und die elektronenübertragende Redox-Domäne aus einer Polypeptidkette bestehen und damit nicht separat exprimiert werden müssen. Viele Vertreter dieser Klasse sind Teil der CYP116B-Familie, darunter auch P450_{LA1}.⁶⁴ In diesem Teil der Arbeit wurden daher hauptsächlich literaturbekannte CYP116B-Enzyme auf ihre Promiskuität untersucht. Fünf Vertreter dieser Enzym-Familie wurden von Prof. Sabine Flitsch (University of Manchester) bereitgestellt.⁶⁷ Weitere Enzyme, die aus dem BIOOX Projekt stammen, wurden aus der Sammlung des Instituts für Technische Biochemie (Universität Stuttgart) entnommen.^{71,197} Von der Firma Prozomix Ltd. wurden 14 Vertreter als kollaborativer Beitrag zum Testpanel

hinzugefügt. Dieses Set bestand zu einem Großteil aus nicht publizierten CYP116B-Vertretern, aber auch aus einzelnen anders klassifizierten autarken CYP-Enzymen. Aus der hauseigenen Sammlung wurden einige Varianten von P450_{BM3} (CYP102A1) für Testreaktionen herangezogen.

In einem ersten großangelegten Screening wurden alle Enzyme des Testpanels exprimiert und die anschließend erhaltenen Zellysate (37.5 Vol%) in Biotransformationen mit Styren (**5**) eingesetzt. Zur direkten Umsetzung des anti-Markovnikov Aldehyds (Phenylacetaldehyd) und zur Cofaktorregeneration wurde wie üblich PAR eingesetzt. Die Produktbildung wurde durch GC/MS-Analysen mit hoher produktspezifischer Sensitivität im SIM-Modus ermittelt. Die meisten Vertreter des Panels zeigten nur sehr schwache bis keine Umsätze des Substrats. Dies lag entweder an einer mangelhaften Expression unter den gewählten Bedingungen oder schlicht an fehlender Aktivität für die gewünschte Transformation. Die P450-Enzyme mit den besten promiskuitiven Aktivitäten für anti-Markovnikov Oxidationen waren neben der Benchmark P450_{LA1} unter anderem P450_{RhF}, P450_{RR} sowie alle fünf thermostabilen Enzyme, die von Prof. Sabine Flitsch bereitgestellt wurden (P450_{AT}, P450_{AX}, P450_{JT}, P450_{TB}, P450_{TT}). Für diese Enzym-Vertreter, die allesamt Teil der CYP116B-Familie sind, wurden erneut Biotransformationen mit definierten Katalysatorbeladungen in technischen Triplikaten und biologischen Duplikaten durchgeführt, um die Produktbildung nach zweistündiger Reaktionszeit zu quantifizieren (**Abbildung 27**). Zudem wurden die aMOx-Selektivitäten basierend auf den bestimmten Produktkonzentrationen beider gebildeten Oxidationsprodukte (Styrenoxid (**9**) und 2-Phenylethanol (**6**)) berechnet. Eine Kontrollreaktion mit Styrenoxid (**9**) als Substrat bestätigte für alle Vertreter, dass keine Epoxidierung-Isomerisierung katalysiert wurde.

Aus den quantitativen Ergebnissen ist klar abzuleiten, dass das größte Potenzial zur anti-Markovnikov-Oxidation von P450_{LA1} ausgeht. Mit einem Umsatz von circa 90 TTN und einer aMOx-Selektivität von 44% hebt sich dieser Vertreter deutlich von allen anderen ab. P450_{JT} weist dieselbe Selektivität für das anti-Markovnikov-Produkt **6** auf, jedoch nur mit halber Aktivität (48 TTN). Für die meisten anderen getesteten Enzyme liegt die Aktivität bei unter 20 TTN und die Selektivitäten bewegen sich in einem Bereich um 20%. Es ist überraschend zu sehen, dass carbonylselektive Alkenoxidationen für viele P450s identifiziert werden können, wenn auch gelegentlich mit sehr geringen Aktivitäten. Dieses Ergebnis steht etwas im Gegensatz zu bisherigen *substrate scope* Studien mit CYP116B-Enzymen.⁶⁷ Beim Einsatz von Styren als Substrat wurde in diesen Studien lediglich von geringen Produktbildungen des Epoxidierungs-Produkts berichtet. Das zeigt, dass eine sehr sensitive Analytik notwendig ist, um promiskuitive Aktivitäten wie anti-Markovnikov Oxidationen zu entdecken. Wie die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, tritt eine solche Chemie in Enzymen gar nicht so selten auf und eventuell ist eine solche Promiskuität nicht nur auf Styren als Substrat beschränkt. Mit sehr sensitiven Analysemethoden (z.B. GC/MS im SIM-Modus) sind potentiell auch carbonylselektive Oxidationen anderer Alkene erkennbar, wie zum Beispiel interne Alkene oder aliphatische Alkene. Selbst sehr gering

ausgeprägte promiskuitive Aktivitäten können den Startpunkt eines gerichteten Evolutions-experiments markieren und durch einen solchen Ansatz gesteigert werden.

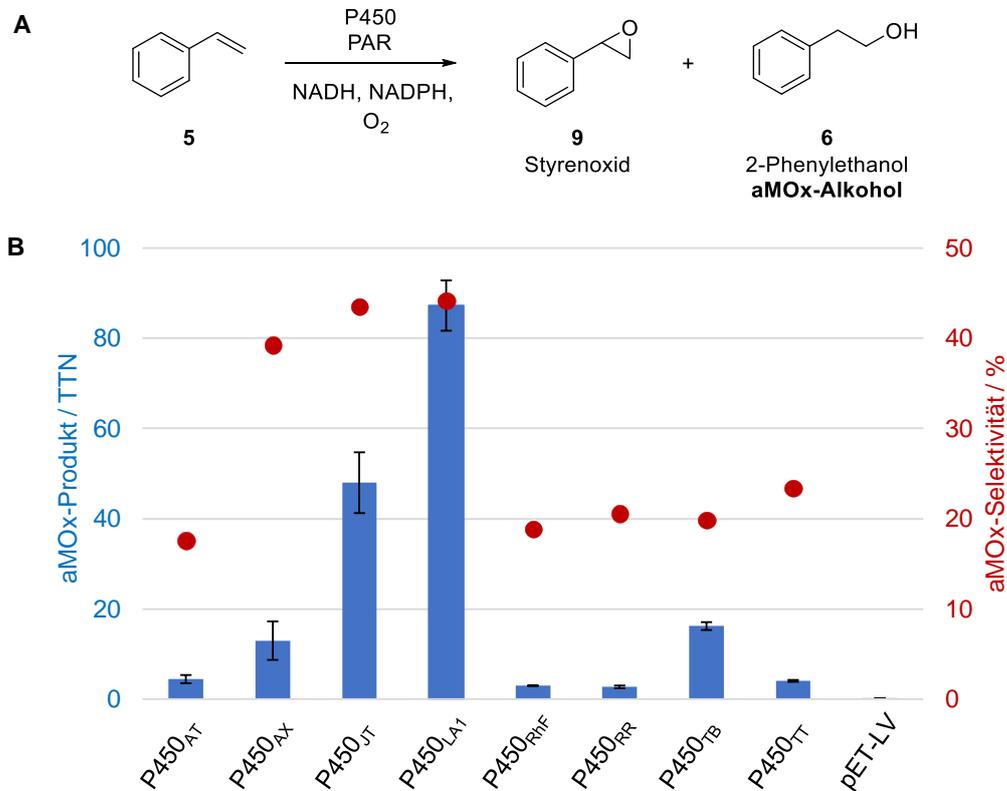


Abbildung 27 – (A) Analyse des aMOx-Potenzials für eine Reihe von CYP116B-Vertreter durch Umsetzung von Styren (**5**) als Testsubstrat. Gebildetes Phenylacetaldehyd (aMOx-Produkt) wurde durch Einsatz von PAR direkt zu 2-Phenylethanol (**6**) reduziert. (B) Quantitative Analysen von Biotransformationen wurden unter Standardbedingungen (5 mM Styren, je 0.25 mM NADH/NADPH, 150 μ L P450-Lysat, 100 μ L PAR-Lysat, 1% v/v *i*PrOH) in technischen Triplikaten und biologischen Duplikaten durchgeführt und die daraus berechneten Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken angegeben. Im Diagramm sind die Umsatzzahl je Enzymmolekül (TTN) und die berechneten aMOx-Selektivitäten aufgetragen (Berechnet: aMOx-Alkohol/(aMOx-Alkohol + Styrenoxid)). Eine Negativkontrolle mit dem pET-Leervektor (pET-LV) zeigte keine Produktbildung. SDS-PAGE-Analysen der eingesetzten Lysate sind in Anhang 7.7. gezeigt.

Um die interfamiliäre Beziehung der getesteten CYP116B-Enzyme besser zu verstehen, wurde im Rahmen der betreuten Masterarbeit von Kai Schülke ein Sequenzähnlichkeitsnetzwerk (*sequence similarity network*, SSN) erstellt. In einem solchen Netzwerk werden die Beziehungen zwischen allen bekannten Proteinsequenzen dieser Enzymfamilie grafisch visualisiert und Proteine mit einem hohen Verwandtschaftsgrad werden in Clustern gruppiert. Als Templat für die Sequenzsuche verwandter Proteine wurden 13 publizierte Sequenzen von Vertreter der CYP116B-Familie eingesetzt (**Tabelle 1**). In der anschließend durchgeführten BLAST-Suche wurden 483 Sequenzen gefunden. Aus diesem Datensatz wurde unter Anwendung des EFI-EST-Algorithmus ein SSN generiert, welches mit der Software Cytoscape visualisiert wurde (**Abbildung 28**).^{103,198} Um die dargestellten Vertreter in Cluster mit hohem Verwandtschaftsgrad zu gruppieren, wurde ein Schwellenwert von 64.5% für die Sequenzidentität empirisch angesetzt.

Jede Sequenz in einem solchen SSN wird als Knoten (blauer Punkt) dargestellt und ist mit Linien (*edge*) verbunden, sobald ein hoher Verwandtschaftsgrad vorliegt.

Tabelle 1 – Sequenzset mit literaturbekannten CYP116B-Vertretern, die für die Erstellung des Sequenzähnlichkeitsnetzwerks (SSN) berücksichtigt wurden.⁶⁴ Jede Sequenz ist mit ihrem Identifikator in der Uniport- oder NCBI-Datenbank, ihrer CYP-Nummerierung, dem entsprechenden Namen sowie dem Ursprungsorganismus angegeben. *Diese CYP116B-Vertreter waren als Plasmide verfügbar und wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

CYP-Nummer	Name	Identifikator	Ursprungsorganismus
CYP116B1	k.A.	Q1LDI2	<i>Cupriavidus metallidurans</i> ¹⁹⁹
CYP116B2*	P450 _{Rhf}	Q8KU27	<i>Rhodococcus</i> sp. ^{71,200}
CYP116B3*	P450 _{RR}	Q52TE7	<i>Rhodococcus ruber</i> ²⁰¹
CYP116B4	P450 _{RpMO}	H0JTW1	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> ⁶⁸
CYP116B5	k.A.	WP_005019032	<i>Acinetobacter radioresistens</i> ^{202,203}
CYP116B29*	P450 _{TB}	WP_013131366.1	<i>Thermobispora bispora</i> ⁶⁷
CYP116B39*	P450 _{LA1/LaMo}	A0P0F6	<i>Labrenzia aggregata</i> ⁶⁸
CYP116B46*	P450 _{TT}	WP_055423153.1	<i>Tepidiphilus thermophiles</i> ⁶⁷
CYP116B63*	P450 _{JT}	WP_104007096.1	<i>Jhaorihella thermophile</i> ⁶⁷
CYP116B64*	P450 _{AX}	WP_092497994.1	<i>Albidovulum xiamenense</i> ⁶⁷
CYP116B65*	P450 _{AT}	WP_027929347.1	<i>Amycolatopsis thermoflava</i> ⁶⁷
CYP116B146	P450 _{CiMO}	WP_003081031	<i>Comamonas testosterone</i> ²⁰⁴
CYP116B236	P450 _{SMO}	C7SFP5	<i>Rhodococcus</i> sp. ²⁰⁵

Die CYP116B-Familie bildet eine große Hauptgruppe mit vier klar geclusterten kleineren Untergruppen. Dabei verteilen sich die getesteten 8 Vertreter gleichmäßig auf alle der hier gezeigten Cluster. Somit wurde mit den quantitativ ermittelten Daten ein repräsentatives Ergebnis für die gesamte CYP116-Familie erzielt. Es ist zu erkennen, dass P450_{LA1} auf einem separaten Cluster liegt. Auch die beiden Enzyme P450_{AX} und P450_{JT} besetzen gemeinsam einen isolierten Cluster. Diese drei Enzyme zeigten experimentell die höchsten Aktivitäten und aMOx-Selektivitäten. Weitere Sequenzen dieser beiden Cluster können daher ebenfalls dieselbe oder sogar bessere Promiskuität gegenüber der anti-Markovnikov Oxidation von Styren aufweisen. Enzyme der Hauptcluster zeigten nur schwach ausgeprägte Promiskuität auf. Die Ursachen für die divergierende Evolution der Cluster und deren individuell zu Grunde liegenden katalytischen Eigenschaften sind bisher weitestgehend unbekannt. Für alle Vertreter der CYP116-Familie ist noch nicht geklärt, für welche Art von Oxidationsreaktionen diese Enzyme in der Natur verantwortlich sind oder welche metabolische Rolle sie in ihren Herkunftsorganismen einnehmen. Für Enzyme dieser Familie konnte bisher nur gezeigt werden, dass sie eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren können, darunter Hydroxylierung, Dealkylierung, Epoxidierung, Sulfoxidierung und neuerdings carbonylselektive Alkenoxidationen.⁶⁷

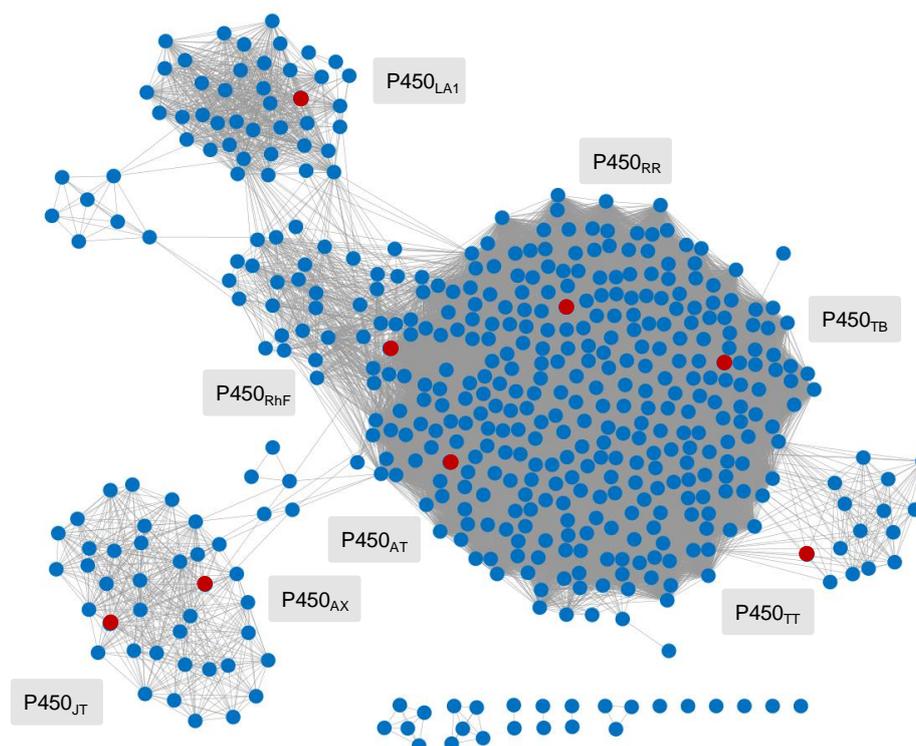


Abbildung 28 – Sequenzähnlichkeitsnetzwerk (SSN) für die CYP116B-Familie visualisiert mit Cytoscape.¹⁰³ Einzelne Vertreter jeder Sequenz sind als blaue Knoten dargestellt. Knoten, für die ein Schwellenwert von 64.5% für die Sequenzidentität überschritten wurde, sind miteinander verbunden (graue Verbindungslinie). Alle acht Vertreter, die experimentell auf das Potenzial zur anti-Markovnikov Oxidation von Styren untersucht wurden, sind als rote Knoten hervorgehoben.

3.1.3.2. Untersuchung der Hydridmigration mit weiteren P450-Enzymen

Für aMOx und Varianten von P450_{LA1} konnte in mechanistischen Studien mit Styren gezeigt werden, dass als Schlüsselschritt des aMOx-Zyklus eine enantioselektive Migration des *cis*-Hydrids katalysiert wird. Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass eine Vielzahl von CYP116B-Enzymen ebenfalls carbonylselektive Oxidationen von Styren katalysieren können, war es interessant zu studieren, inwieweit die 1,2-Hydridmigration für alle getesteten Enzyme der spezifischen Selektivität folgt, wie sie für aMOx ermittelt werden konnte. Um die *cis*-/*trans*-Migrationstendenz dieser promiskuitiven P450-Enzyme zu untersuchen, wurden daher erneut Biotransformationen mit isotope markierten Styrenen durchgeführt und eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.1.1.). Damit ein semiquantitatives Ergebnis aus dem GC/MS-Fragmentierungsmustern erhalten werden konnte, wurde eine Kalibrationskurve für die Deuteridmigration erstellt (**Abbildung 29, A, B**). Dafür wurden Produktmischungen von 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**) (100% Deuteridmigration) und 2-Phenylethanol (**6**) (0% Deuteridmigration) erstellt und das Massenverhältnis von 93/91 *m/z* für jeden Messpunkt aufgetragen. Die spezifische Masse von 91 *m/z* entspricht dabei dem

benzylischen Spaltprodukt ohne Deuterid, während 93 m/z dem Produkt einer McLafferty-Umlagerung nach 1,2-Deuteridmigration entspricht. Je höher das 93/91-Intensitätsverhältnis, desto höher der Anteil der Enzym-katalysierten 1,2-Deuteridmigration. Die Massenspektren der resultierenden isotopenmarkierten Alkohole wurden standardmäßig in der Zeitspanne zwischen 3.253 min und 3.273 min interpretiert und die Werte gemittelt (Darstellung von vier Massenspektren). Dies ermöglicht eine höhere Reproduzierbarkeit, da eine leichte chromatographische Trennung des deuterierten und nicht-deuterierten Produkts innerhalb des Produktpeaks beobachtet wurde. Die erhaltene Kalibrationskurve wurde durch eine Exponentialfunktion angepasst und im Folgenden zur Semiquantifizierung der Deuteridmigration angewendet.

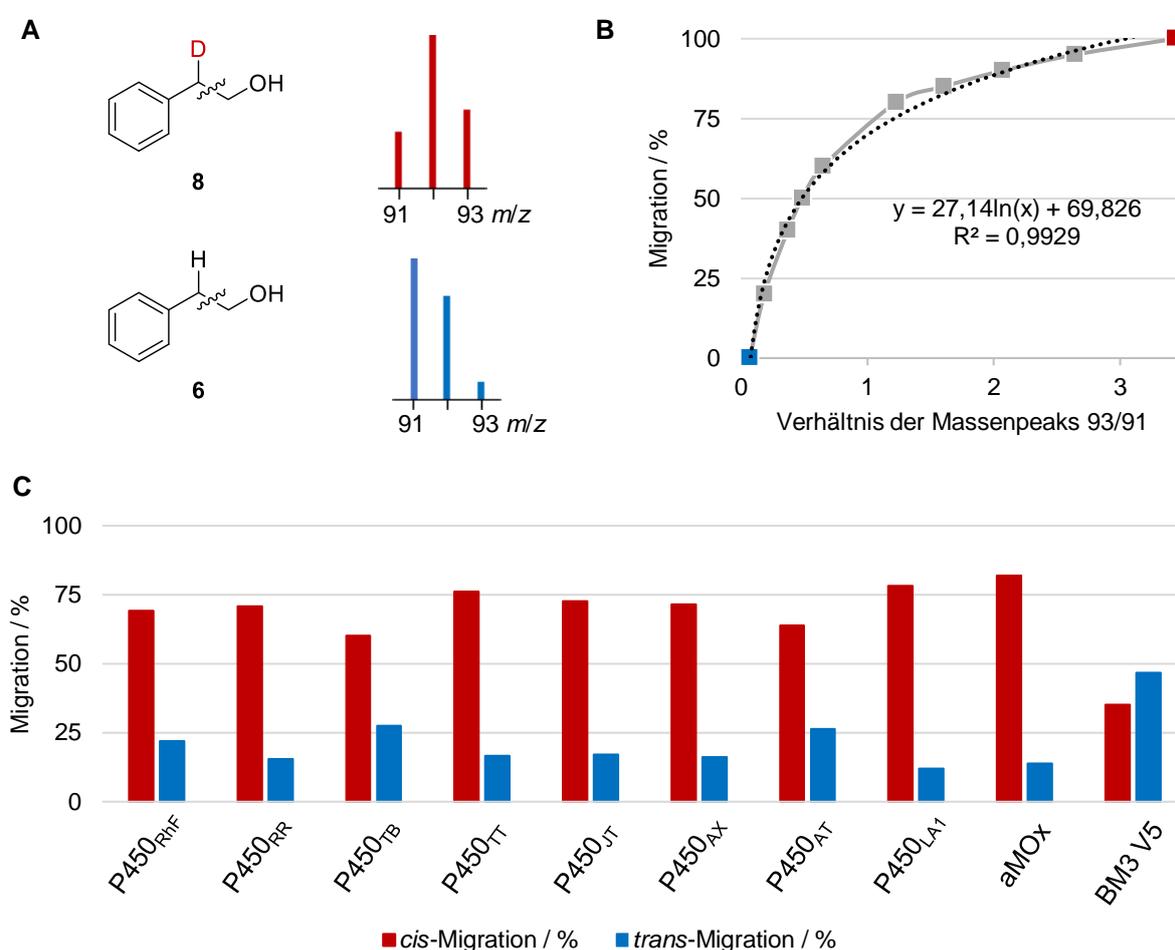


Abbildung 29 – (A) Charakteristische Massenspektren für 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**) und 2-Phenylethanol (**6**) mit Fokus auf die Fragmentmassen nach McLafferty-Umlagerung ($92+1 m/z$) und Benzylspaltung ($91+1 m/z$). (B) Mischung von deuterierten und nicht-deuterierten Standards für die Anfertigung einer Kalibriergerade zur quantitativen Bestimmung der *cis*-/*trans*-Migrationstendenz. Für jedes Mischungsverhältnis wurden die Massenverhältnisse zwischen 93/91 m/z berechnet und aufgetragen. Die mittlere Ionenzahl wurden in einer definierten Zeitspanne von 2 s (4 Datenpunkte) in der Mitte des Produktpeaks bestimmt. Blau: 100% 2-Phenylethanol (**6**) im Gemisch entspricht 0% *d*-Migration. Rot: 100% 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**) repräsentiert 100% *d*-Migration. (C) Migrationstendenzen für zehn getestete P450-Enzyme. Die Daten basieren auf massenspektrometrischen Analysen nach Biotransformation von isotopisch markiertem *cis*- und *trans*-Styren- β -*d* (**2**) & (**4**) und wurden unter Anwendung der Kalibriergerade aus (B) ermittelt.

Für alle acht Repräsentanten der CYP116B-Familie, für aMOx sowie eine Variante von CYP102A1 (P450_{BM3} V5) wurden Biotransformationen mit *cis*-Styren- β -d (**2**) und *trans*-Styren- β -d (**4**) unter Standardbedingungen durchgeführt und das Fragmentverhältnis zwischen 93/91 *m/z* bestimmt. Daraus wurde der Anteil von *cis*- sowie *trans*-Deuteridmigration berechnet (**Abbildung 29, C**). An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Migrationstendenzen mit der erstellten Kalibrierkurve leicht unterschätzt wurden und *cis*- und *trans*-Selektivitäten in Summe nicht 100% entsprachen (Wiederfindungsrate von 87-96%). Daher wurden die ermittelten Werte ein weiteres Mal ins Verhältnis gesetzt. Für aMOx und P450_{LA1} wurden die höchsten *cis*-/*trans*-Selektivität von 85:15 bzw. 87:13 bestimmt. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit der ermittelten Enantioselektivität der Deuteridmigration (Kapitel 3.1.3.2.). Wie auch schon an dieser Stelle diskutiert wurde, ist es möglich, dass in circa 10% der Fälle eine *trans*-selektive Deuteridmigration stattfindet oder eine schnelle Tautomerie zum Verlust des Deuterids in die Lösemittelumgebung führt. Für alle anderen CYP116B-Enzyme wurden geringer ausfallende *cis*-/*trans*-Selektivitäten ermittelt, die zwischen 71:29 für P450_{AT} und 82:18 für P450_{RR} lagen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Katalysezyklus auch für diese Enzyme dem postulierten aMOx-Mechanismus folgt, wenn auch nicht mit gleich hoher Katalysatorkontrolle wie von P450_{LA1}.

Interessanterweise konnte für die *in-house* Variante P450_{BM3} V5 eine entgegengesetzte Migrationstendenz ermittelt werden. In diesem Fall ergab sich die *cis*-/*trans*-Selektivität zu 43:57, was eine leichte Bevorzugung der *trans*-Deuteridmigration bedeutete. Dies lässt die Folgerung zu, dass P450-Enzyme aus anderen Familien ebenfalls den aMOx-Zyklus katalysieren können, jedoch nicht dieselbe Selektivität kontrollieren. Aus diesem Ergebnis geht nicht hervor, mit welcher Enantioselektivität die Migration erfolgt. Daher kann nicht ausgesagt werden, ob die *trans*-Migration auch zwangsläufig über die entgegengesetzte *si*-Seite des carbokationischen Intermediats erfolgt. Mosher-Ester-Analysen konnten für diesen Fall nicht durchgeführt werden, da die Enzymaktivität nicht zur präparativen Synthese des Produkts ausreichte. Würde sich in zukünftigen Studien bestätigen, dass die *trans*-Migration über den entgegengesetzten Halbraum erfolgt (*si*-Seite), so bedeutet dies, dass auch ein enantiokomplementärer Mechanismus zugänglich und möglicherweise evolvierbar wäre. Dies würde einen universellen Zugang zu einer Vielzahl chiraler Produkte in asymmetrischen anti-Markovnikov Oxidationen bedeuten.

3.2. Gerichtete Evolution einer Ketonsynthese

Die gerichtete Evolution von aMOx hat eindrucksvoll gezeigt, dass Metall-Oxo-Komplexe in Enzymen für die carbonylselektive Alkenoxidation bestimmter Mustersubstrate nutzbar gemacht werden können.⁷² Jedoch ist dieser Katalysezyklus bisher nur für wenige terminale Alkene wie Styren-Derivate effizient anwendbar. Der Einsatz von aMOx in der Synthese von Phenylacetaldehyd-Derivaten ist zudem nicht besonders lohnenswert, da solche Produkte auf anderen Wegen deutlich günstiger hergestellt werden können.²⁰⁶ Eine umso wertvollere Anwendung dieser neuen Enzymfunktion wäre möglich, wenn dieser Katalysezyklus auf die ketonselektive Oxidation unaktivierter interner Alkene ausgeweitet werden könnte. Methoden zur direkten und regioselektiven Synthese von Ketonen aus internen Alkenen sind aktuell sehr limitiert (siehe Kapitel 1.1.2.). Erste Erkenntnisse zeigen, dass Varianten von P450_{LA1} geringe Startaktivität für die carbonylselektive Oxidation des internen Alkens *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) aufweisen. Dies verdeutlicht, dass der gekoppelte Elektronen-/Hydridtransferprozess generell auch zur Erzeugung von Ketonen ausgenutzt werden kann. Interne Aryl-Alkene sind besonders anspruchsvolle Substrate in der Wacker-Oxidation, da mit Übergangsmetallkatalysatoren stets Mischungen von Keton-Produkten entstehen.^{15,207} Mit einer engineereten Ketonsynthese könnte diese Limitierung überwunden werden, indem wertvolle Ketone direkt und regioselektiv aus einfachen Startmaterialien zugänglich gemacht werden. Die gerichtete Evolution einer solchen Ketonsynthese ist in den folgenden Kapiteln beschrieben und inkludiert mechanistische Studien, die beschreiben, wie mehr als ein Dutzend identifizierter Aminosäuresubstitutionen zusammenwirken, um diesen ketonselektiven Katalysezyklus zu erreichen.

3.2.1. Identifizieren eines Startpunkts und Etablierung eines Screening-Systems

Um einen geeigneten Startpunkt für die gerichtete Evolution einer Ketonsynthese zu identifizieren, wurden verschiedene Cytochrom P450-Monooxygenasen auf ihre Aktivität und Selektivität für die Oxidation von internen Alkenen getestet. Hierzu wurde insbesondere eine hauseigene Mutantenbibliothek einer Cytochrom P450-Monooxygenase aus *Labrenzia aggregata* (P450_{LA1}) herangezogen (**Abbildung 30, B**; Anhang 7.1.), die kürzlich für die Oxidation von terminalen Alkenen zu Aldehyden evolviert wurde.⁷² Als Modellsubstrat wurde *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) ausgewählt, da hierfür mit einigen Enzymvarianten aus diesem Panel bereits initiale Aktivität festgestellt werden konnte.

Das Modellsubstrat *trans*-**14** wurde mit insgesamt 25 Enzymvarianten im 96-Well-Format (jeweils in Triplikaten) umgesetzt und die Aktivität sowie die Selektivität der Ketonbildung

bestimmt. An dieser Stelle ist anzumerken, dass für alle Varianten nur ein regioisomeres Keton (Phenylacetone) gebildet wurde. Propiophenon (**21**) konnte nicht nachgewiesen werden. Neben dem gewünschten Keton – in diesem Fall Phenylacetone (**16**) – entstanden 2-Methyl-3-phenyloxiran (**15**, Epoxid) als Resultat der konkurrierenden Epoxidierung und *trans*-Zimtalkohol (**17**) als allylisches Oxidationsprodukt (**Abbildung 30, A**). Mit steigendem Evolutionsgrad der getesteten Enzymvarianten konnte ein Anstieg der Aktivität sowie höhere Keton-Selektivitäten für die Umsetzung von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) beobachtet werden. Für die Selektivität zeichnete sich jedoch beginnend mit Enzymvariante P7E ein Plateau ab, welches einen Wert von annähernd 40% nicht überstieg. Bezüglich der Aktivität wurden für die Varianten P7E bis P9A die höchsten Produktbildungen erzielt. Höher evolvierte Varianten zeigten stattdessen hohe Schwankungen und überwiegend verringerte Aktivitäten auf. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass intermediären Varianten deutlich promiskuitiver sind, wohingegen spätere Evolutionsprodukte eher auf die Umsetzung terminaler Alkene oder ausschließlich Styren spezialisiert sind.²⁰⁸ Daher wurden die Varianten P7E, P7F, P7.5, P8, P8A, P9 und P9A ausgewählt, um in einem

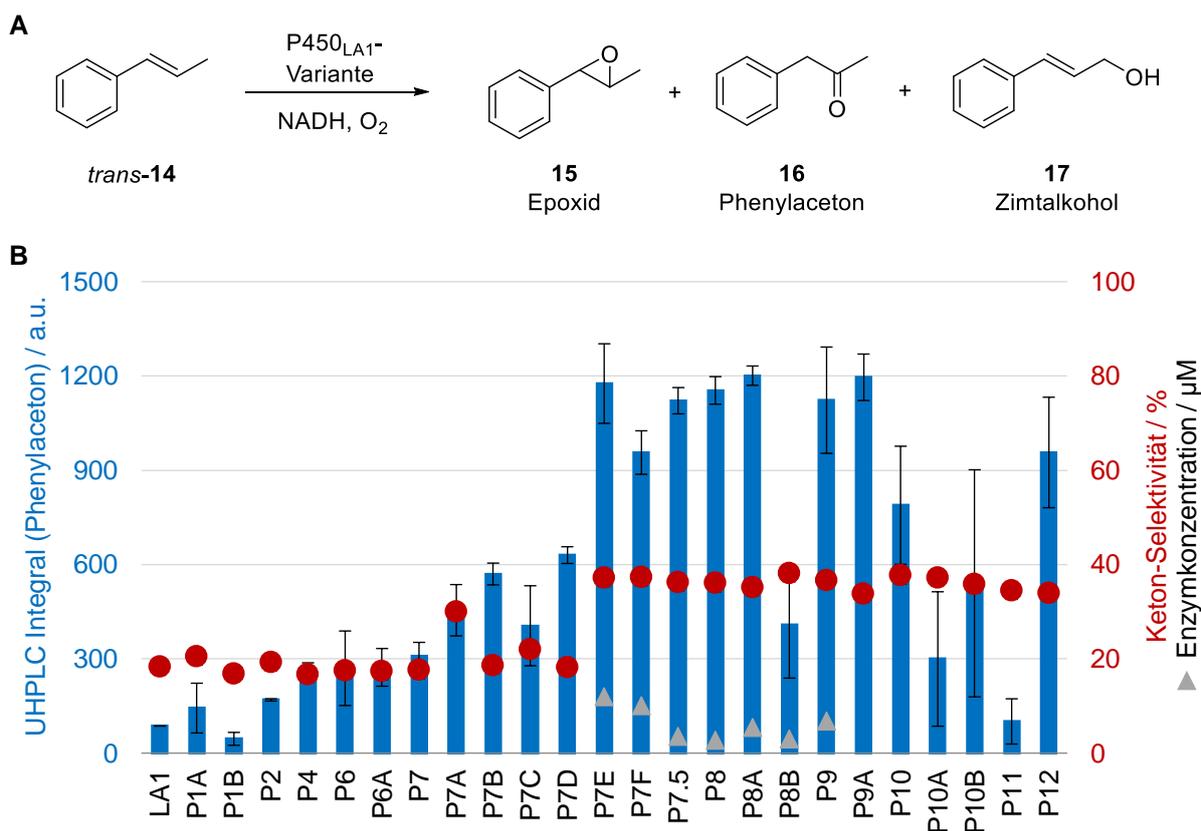


Abbildung 30 – (A) Reaktionsschema für die P450-katalysierte Oxidation von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) zu den drei möglichen Oxidationsprodukten Phenylacetone (**16**), 2-Methyl-3-phenyloxiran (**15**, Epoxidierung) und *trans*-Zimtalkohol (**17**, allylische Oxidation). (B) Evaluation von 25 Enzymvarianten basierend auf P450_{LA1} hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität für die oxidative Umsetzung des Mustersubstrats *trans*- β -Methylstyren. Aufgezeigt ist eine quantitative Bestimmung der Aktivität durch Angabe der Peakflächen für Phenylacetone, welche mittels UHPLC-Analytik ermittelt wurden. Die Bildung des gewünschten Phenylacetons im prozentualen Verhältnis zu den ebenfalls entstehenden Oxidationsprodukten **15** und **17** ist als Keton-Selektivität basierend auf Peakflächen angegeben. Für ausgewählte Varianten ist die ermittelte Enzymkonzentration im eingesetzten Lysat angegeben.

zweiten Evaluationsverfahren genauer charakterisiert zu werden. Dabei wurden neben der bisher erfolgten qualitativen Evaluierung auch *total turnover numbers* (TTN) als Maß der Enzymaktivität und das Expressionslevel im eingesetzten Zelllysate bestimmt. Ein quantitativer Indikator für ausgeprägte Proteinexpression sind hohe Enzymkonzentrationen im Lysat, was für Cytochrom P450-Monooxygenasen mithilfe von CO-Differenzspektroskopie einfach bestimmt werden konnte. Letztendlich wurde Variante P7E als Startpunkt der gerichteten Evolution ausgewählt, da diese Enzymvariante mitunter die höchste Selektivität für Phenylacetone (**16**) aufweist (30.7%) und zudem das höchste Expressionslevel im Lysat zeigt (11.9 μ M Enzymkonzentration). Eine stark ausgeprägte Expression des Enzyms ist zu Beginn eines Evolutionsprojekts besonders wichtig. Im Laufe der Evolution können stets selektivitätssteigernde Aminosäuresubstitutionen auftreten, die andererseits jedoch zu einer Verringerung des Expressionslevels oder zur Destabilisierung des Enzyms führen können. Um solche Varianten im Screening-Prozess überhaupt identifizieren zu können und nicht aufgrund mangelnder Produktbildung zu übersehen, ist es wichtig mit einem ausreichend aktiven, stabilen und stark überexprimierten Enzym als Startpunkt zu beginnen.

Variante P7E weist im Vergleich zum Wildtyp-Enzym P450_{LA1} insgesamt 8 Aminosäuresubstitutionen auf (**Tabelle 2**), steigert die Keton-Selektivität von 20% auf 31% und ist dreimal aktiver. Dennoch haben nicht alle Substitutionen einen gleichermaßen selektivitätssteigernden Effekt. Eine Analyse der Aktivitäts- und Selektivitätsdaten von Vorläufer-Varianten zeigt, dass lediglich vier Veränderungen (V123I, N201K, H206W und Y3A85H) eindeutig zu einer selektiveren Bildung von Phenylacetone (**16**) führen. Andere Substitutionen sind entweder stabilisierend, aktivitätssteigernd oder haben keinen definierbaren Effekt auf die Umsetzung von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**). Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass letztgenannte Aminosäurepositionen unbedeutend für die Katalyse sind.

Tabelle 2 – Aminosäuresubstitutionen von Variante P7E im Vergleich zum Wildtyp P450_{LA1} und deren Einfluss auf die Selektivität und Aktivität in Bezug auf die Bildung von Phenylacetone (**16**).

Substitution	Effekt	Substitution	Effekt
T121A	nicht definierbar	N209S	nicht definierbar
V123I	selektivitätssteigernd	I326V	stabilisierend und/oder aktivitätssteigernd
N201K	selektivitätssteigernd/ stabilisierend	Y385H	selektivitätssteigernd/ stabilisierend
H206W	selektivitätssteigernd	E418G	stabilisierend

Voraussetzung für ein belastbares und erfolgreiches Screening von Variantenbibliotheken in gerichteten Evolutionsexperimenten ist ein homogenes Zellwachstum und eine homogene Expression der generierten Enzymvarianten. Um dies zu gewährleisten wurde ein bestehendes Expressions-Protokoll für P450_{LA1} im 96-Well-Format adaptiert und optimiert. Als

Wirtsorganismus für die heterologe Proteinexpression wurde E. cloni® EXPRESS BL21(DE3) verwendet und in TB-Medium kultiviert. Evaluiert wurde die Homogenität des Expressions-Systems für Variante P7E, welche als Startpunkt der Evolution diente. Den größten Einfluss auf das Zellwachstum äußerte die Durchmischung der Zellkultur. Eine starke Durchmischung und hoher Sauerstoffeintrag bei hohen Drehzahlen im Schüttelinkubator (300 bis 350 rpm) führte zur Bildung von Indigo durch E. cloni® selbst. Moderate Drehzahlen (250 rpm) führten hingegen zu einer optimal homogenen Zelldichte ohne Indigoproduktion. Zudem erfolgte die Inkubation stets bei einer hohen Luftfeuchtigkeit (*humidity control*), um Verdunstungseffekte zu vermeiden.

Um die Gleichmäßigkeit der Proteinexpression und die Homogenität der Enzymaktivität in Biotransformationen zu evaluieren, wurde eine 96-Deep-Well-Platte mit 90 individuellen Transformanten von Variante P7E unter optimierten Bedingungen exprimiert (inklusive sechs Kontrollen). Für die im Anschluss durchgeführte enzymatische Zellyse, Biotransformation und Probenvorbereitung im Plattenformat wurden ebenfalls bestehende Protokolle optimiert und angewendet. Die finale Analyse und Evaluierung jeder einzelnen Enzymvariante erfolgte mithilfe einer eigens entwickelten UHPLC-gestützten Screening-Methode (**Abbildung 31, A**). Diese erlaubte eine schnelle chromatographische Analyse jeder einzelnen Variante in 3 min und ermöglichte das Screening einer ganzen 96-Deep-Well-Platte in unter 6 h.

Das hier verwendete Expressions- und Screeningsystem erlaubt eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Experimente im 96-Well-Format, was zum einen aus der graphisch veranschaulichten Plattenansicht zu entnehmen ist (**Abbildung 31, B**). Die Produktbildung liegt für jede Kammer der 96-Well-Platte in einem vergleichbaren Bereich. Dennoch ist ein Randeffekt zu beobachten, der sich in einer leicht verringerten Keton-Bildung im Außenbereich der Platte äußert. Mögliche Erklärung für diesen Effekt sind ungleichmäßige Temperaturverteilung während der Expression. Durch Erstellen einer *Retention of Function Curve* (**Abbildung 31, C**) lässt sich die Homogenität des Expressions- und Screeningsystem auch quantitativ bestimmen. Hierbei wurden die Integrale des gebildeten Phenylacetons (**16**) für jede Variante aufgetragen und absteigend sortiert. Ein annähernd linearer Kurvenverlauf spricht dabei für eine homogene Expression, Zellyse, Biotransformation und Probenvorbereitung. Je kleiner die Wertschwankungen bzw. der Variationskoeffizient (c_v), desto gleichmäßiger ist die Produktbildung. Für dieses System wurde ein ausgezeichneter Variationskoeffizient von $c_v = 7.2\%$ berechnet. Vor allem die ermittelten Keton-Selektivitäten sind sehr geringen Schwankungen unterworfen und der Variationskoeffizient äußerte sich in einem sehr niedrigen Wert von $c_v = 2.5\%$. Dies lässt ein präzises Screening von Variantenbibliotheken mit sehr geringer Ungenauigkeit hinsichtlich der Selektivität zu und ist somit allgemein gesprochen sehr gut geeignet für jegliche gerichteten Evolutionsexperimente.

3. Ergebnisse und Diskussion

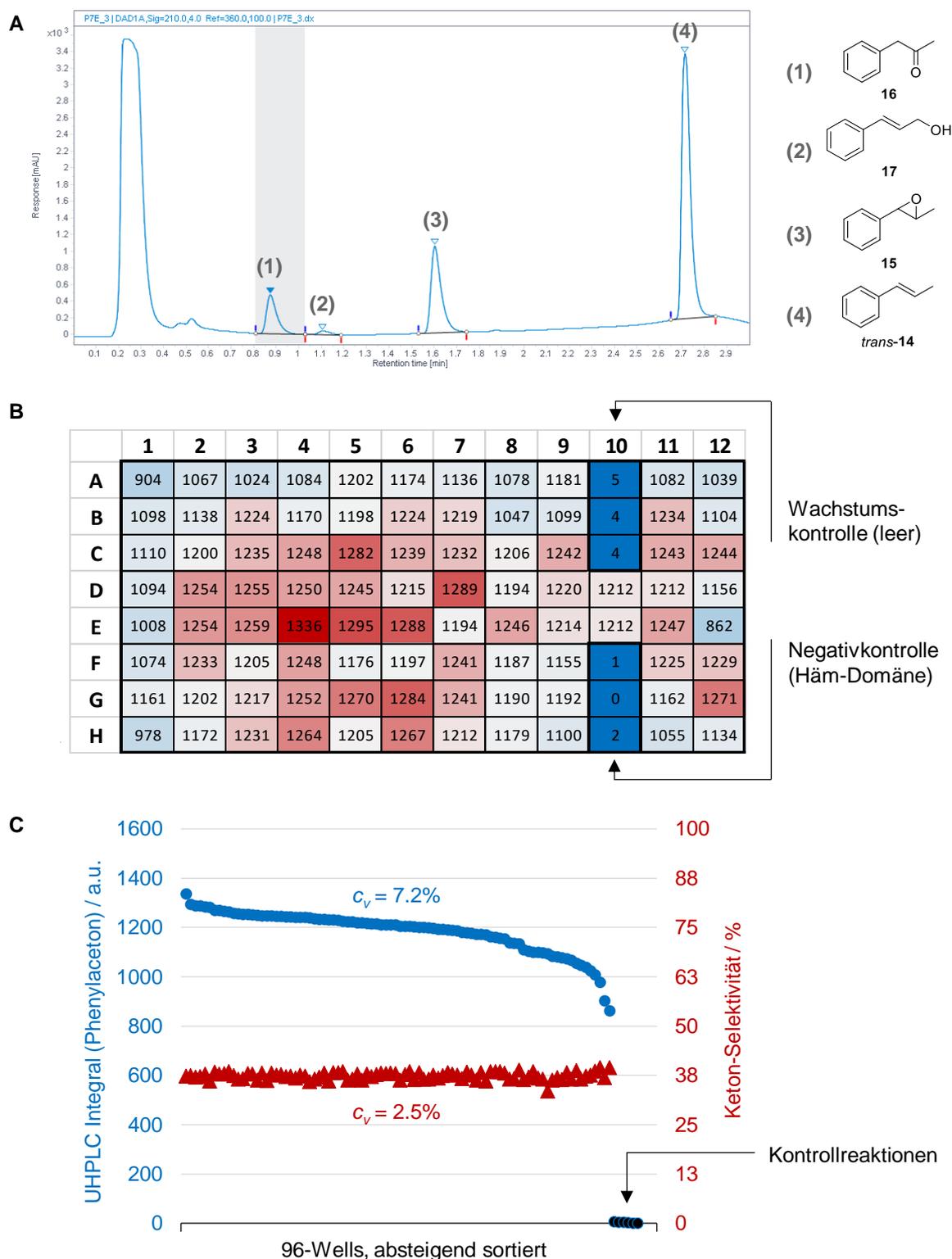


Abbildung 31 – (A) Chromatogramm (UHPLC) einer Biotransformation von *trans*- β -Methylstyren mit P7E. Alle auftretenden Oxidationsprodukte (1) – (3) sowie das unverbrauchte Substrat (4) können innerhalb von 3 min getrennt werden. (B) Plattenübersicht und Datenanalyse im 96-Well Format. In dieser Ansicht wird die Produktbildung veranschaulicht (Peakflächen des gebildeten Phenylacetons) und die Daten mithilfe einer Farbskala gewertet (rot: hohe Produktbildung, blau: niedrige Produktbildung). (C) *Retention of Function Curve* für die Bildung von Phenylacetone mit P7E im 96 well-Format. Alle chromatographisch ermittelten Integrale (Phenylacetone) sind in absteigender Reihenfolge sortiert (blau) und die entsprechend ermittelte Keton-Selektivität ist jedem Datenpunkt zugeordnet angegeben (rot). Variationskoeffizienten (c_v) sind als Maß für die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Messwerte angegeben und ergeben sich aus der ermittelten relativen Standardabweichung aller Datenpunkte (ohne Kontrollreaktionen).

Auch wenn das hier angewendete UHPLC-basierte Screeningsystem hohe Durchsätze ermöglicht, wurden darüber hinaus Bemühungen unternommen, um ein Assay-System für noch höhere Screening-Durchsätze zu entwickeln. Insbesondere für das Screening von *error prone* Variantenbibliotheken oder kombinatorische Variantenbibliotheken wird vorausgesetzt, dass 10^3 bis 10^4 Varianten mit geringem Aufwand gescreent werden können. Für solche Anwendungen sind colorimetrische Assay-Systeme besonders gut geeignet, da das Auslesen der Ergebnisse besonders schnell mithilfe eines Plattenlesers direkt im 96-Well-Format erfolgen kann. Daher wurden insgesamt drei Assay-Systeme erprobt, um die Produktbildung von Phenylacetone (**16**) möglichst schnell bestimmen zu können.

Ein Maß für die Aktivität von Cytochrom P450 Monooxygenasen ist die Umsetzung des Cofaktors NADH oder NADPH, welches für die Bildung der aktiven Eisen-Oxo-Spezies (*Compound I*) benötigt wird. Die Oxidation des Cofaktors kann dabei photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden (**Abbildung 32, A**).^{209,210} Dies ermöglicht, aktive Varianten von inaktiven Varianten zu unterscheiden, ermöglicht aber nicht, die Produktbildung und Selektivität zu bestimmen. Aktive Varianten müssten daher in einem zweiten Schritt erneut evaluiert werden. Dennoch ist diese Art Assay nicht besonders gut für Cytochrom P450 Monooxygenasen geeignet, da die intermediäre Eisen-Oxo-Spezies unter Verbrauch weiterer Cofaktormoleküle auch leicht zu Wasser abreagieren könnte.²¹¹ Diese sogenannte Entkopplung des Reaktionszyklus entzieht dem System zusätzlich stöchiometrische Mengen NADH/NADPH und resultiert folglich nicht in der gewünschten Produktbildung. Dies führt dazu, dass der Substratumsatz überschätzt wird.

Carbonylsensitive Hochdurchsatz-Screening-Methoden basieren auf der nukleophilen Addition eines organischen Farbstoffs an Carbonylgruppen und führt zu einer Farbänderung, die photometrisch bestimmt werden kann. In Kombination mit Ketonen wird besonders häufig 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) verwendet.²¹²⁻²¹⁴ Die resultierenden Hydrazone besitzen ein Absorptionsmaximum bei 520 nm und sind bereits optisch an der Rotfärbung in Lösung erkennbar. Ein solches Assay-System wurde auch für Phenylacetone erprobt und für Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen angepasst (**Abbildung 32, B**). Trotz diverser Optimierungsversuche konnte kein robustes, sensitives und reproduzierbares System entwickelt werden. Besonders problematisch gestaltete sich das Auftreten von Nebenreaktionen zwischen DNPH und NADH. Pyridinnukleotide reagieren mit DNPH zu Produkten mit Absorptionsmaxima in einem Bereich zwischen 410 nm und 560 nm.^{215,216} Diese Überlagerung führte zu der Schlussfolgerung, dass dieses Assay-System nicht für die gewünschte Anwendung nutzbar ist. Des Weiteren wurde auch an einem semispezifischen pH-Umschlag-Assay gearbeitet.^{217,218} Dieser basiert auf dem Farbumschlag eines pH-Indikators (Bromthymolblau), sobald erhebliche Mengen des gewünschten Phenylacetons (**16**) gebildet wurden (**Abbildung 32, C**). Durch Kopplung in einer Enzymkaskade sollte der Säure-freisetzende Prozess

zusätzlich produktspezifisch amplifiziert werden. Dennoch erwies sich auch dieser Assay als nicht sonderlich robust und reproduzierbar, sodass die Weiterentwicklung eingestellt wurde.

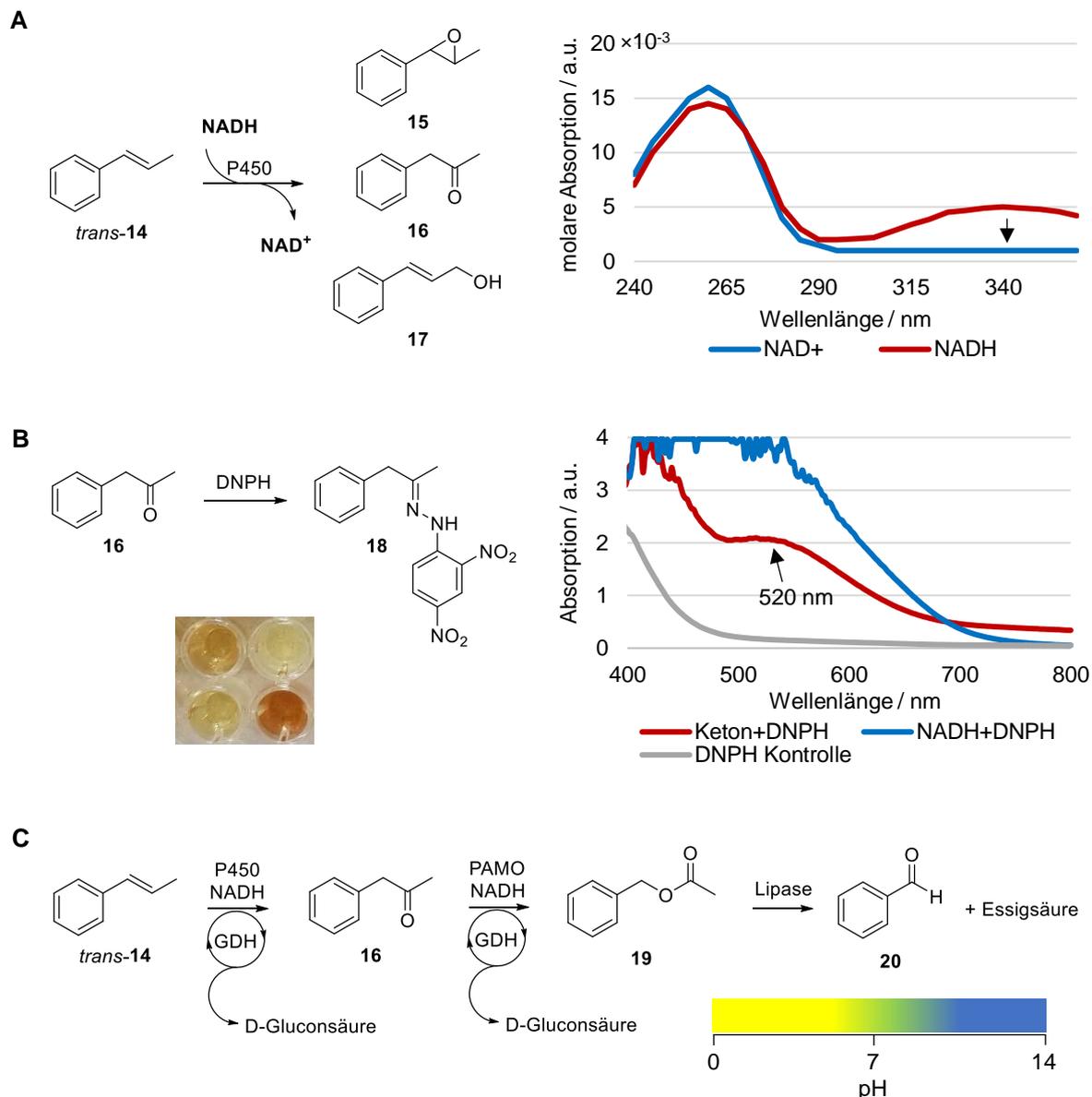


Abbildung 32 – (A) NADH-Abnahme-Assay zur Identifizierung aktiver P450-Varianten. Die Umsetzung des Cofaktors kann bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch verfolgt werden. Dieser Assay ist jedoch aufgrund der Entkopplung des Katalysezyklus (cofaktorabhängige Bildung von H_2O) nicht Keton-spezifisch. (B) Carbonylsensitiver Assay unter Einsatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Die Bildung des entsprechenden Hydrazons aus Phenylacetone (**16**) und DNPH führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums und kann photometrisch verfolgt werden. Nebenreaktionen zwischen DNPH und NADH sowie weiteren Carbonylen im Zellysate führen zu einer schlechten Reproduzierbarkeit und machen den Assay für diese Anwendung ungeeignet. (C) Semispezifischer pH-Umschlag-Assay mit Bromthymolblau als pH-Indikator. P450-katalysierte Oxidationsreaktionen führen zum Verbrauch von NADH, welches durch eine Glucosedehydrogenase (GDH) rezykliert wird. Pro reduziertem Cofaktormolekül wird ein Molekül D-Glucose zu D-Gluconsäure oxidiert, welches zu einer Absenkung des pH-Werts führt. Um eine produktspezifische Amplifikation des Signals zu erreichen, wird das gebildete Keton **16** in einer nachgeschalteten Enzymkaskade verbraucht. Zunächst wird im Rahmen der Umsetzung mit einer Bayer-Villiger-Monooxygenase (PAMO) ein weiteres Molekül D-Gluconsäure gebildet. Der entstandene Ester **19** wird anschließend mithilfe einer Lipase (CAL-B) unter Bildung von Essigsäure hydrolysiert. Ein Farbumschlag von Grün nach Gelb ist die Folge.

3.2.2. Gerichtete Evolution

3.2.2.1. Mutagenesestrategie und Erstellen von Variantenbibliotheken

Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) ist eine Mutagenesestrategie, die häufig zur gerichteten Evolution neuer Enzymfunktionen angewendet wird und zu einem großen Teil auch in diesem Projekt zum Einsatz kam.²¹⁹ Hierbei werden zunächst Aminosäurepositionen rational ausgewählt und anschließend iterativen Zyklen ortsgerichteter Sättigungsmutagenese unterworfen. Vorteil dieser Methode ist, dass nur Aminosäureaustausche in definierten Bereichen des Proteins durchgeführt werden. Dadurch wird nur ein relevanter Sequenzraum des Enzyms adressiert, was den Screening-Aufwand deutlich verringert. Identifizierte Aminosäuresubstitutionen mit positivem Effekt, die zu einer gesteigerten Keton-Selektivität oder Enzymaktivität führen, werden mit diesem Ansatz additiv akkumuliert.

Für die gerichtete Evolution eines ketonselektiven Enzyms ausgehend von P7E wurden zunächst rational Bereiche des Proteins identifiziert, die zu einer Veränderung der katalytischen Aktivität maßgeblich beitragen können. Die Auswahl der Aminosäurepositionen basierte auf Strukturdaten der Startpunkt-Variante (P7E). Da für den Wildtyp P450_{LA1} nach wie vor keine Kristallstruktur gelöst werden konnte (in Kollaboration mit Prof. Gideon Grogan, University of York), wurde alternativ ein Homologiemodell erstellt (**Abbildung 33, A**). Dieses Modell basiert auf der Kristallstruktur von P450_{TT} aus derselben CYP116 Familie.²²⁰ Für die ortsgerichtete Sättigungsmutagenese wurden zu Beginn Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum oberhalb des Häm-Cofaktors ausgewählt (**Abbildung 33, B**). Die Variantenbibliotheken wurden mit der 22c-Trick-Methode erstellt.²²¹ Diese Methode besitzt im Vergleich zur Sättigungsmutagenese mit NNK-Codon den entscheidenden Vorteil, dass eine geringere Anzahl Varianten gescreent werden muss. Um mit 95%iger Wahrscheinlichkeit alle 20 möglichen Varianten mindestens einmal gescreent zu haben, müssen lediglich 66 Varianten analysiert werden (96 Varianten mit NNK-Codon) und 77 für eine statistische Abdeckung von 99.99%. In der Regel wurden pro Variantenbibliothek 90 Varianten analysiert, was ein deutliches *oversampling* zur Folge hatte. Damit war es sehr unwahrscheinlich, dass nicht alle 20 Varianten in der Bibliothek vorkamen. Zudem wurde die Qualität jeder Variantenbibliothek durch Sequenzierung überprüft (QQC, *quick quality control*²²¹). Dieses Vorgehen ermöglichte es qualitativ hochwertige Variantenbibliotheken zu generieren und zu analysieren. Auf welche Weise verbesserte Varianten mit gewünschter Enzymfunktion im Detail identifiziert und charakterisiert wurden, wird im folgenden Kapitel am Beispiel der ersten durchgeführten Runde gerichteter Evolution verdeutlicht.

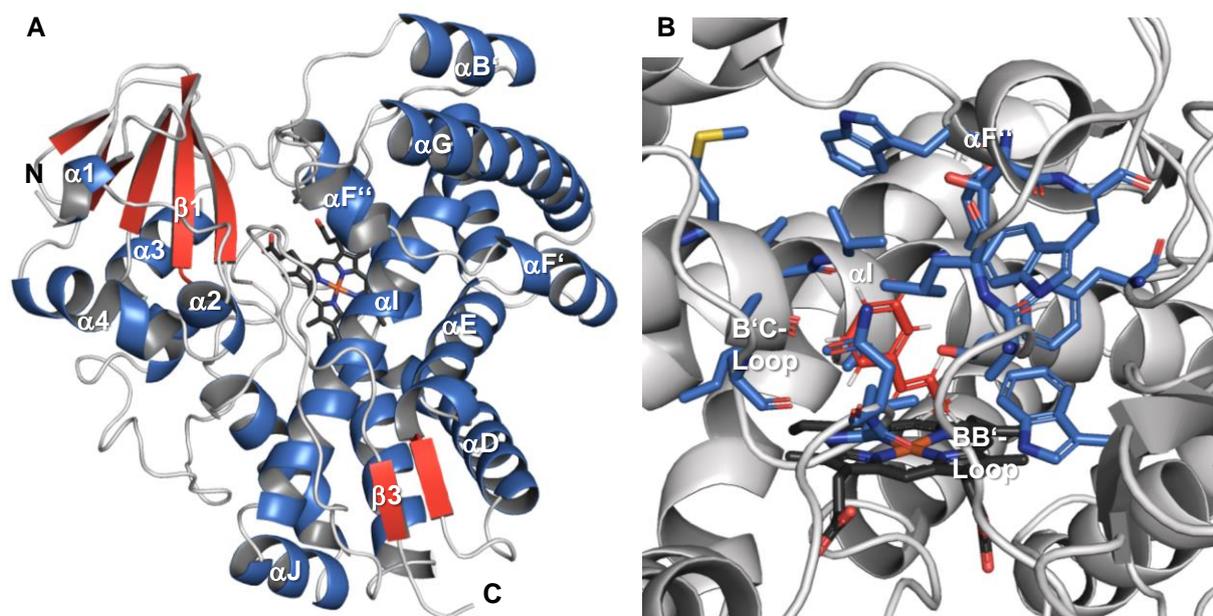


Abbildung 33 – (A) Homologiemodell der Variante P7E basierend auf der Kristallstruktur von P450_{TT}. Die abgebildete Proteinstruktur wurde mithilfe von SWISS-MODEL²²² erstellt und mit PyMOL visualisiert (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC). Strukturelemente sind gemäß der für Cytochrom P450 Monooxygenasen üblichen Nomenklatur benannt (α -Helices in Blau, β -Faltblätter in Rot, Loopstrukturen in Grau). (B) Visualisierung des aktiven Zentrums von P7E mit illustrativ dargestelltem Substrat *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**, rot). Alle Aminosäuren in 8 Å Radius zum Substratmittelpunkt sind in Blau hervorgehoben.

3.2.2.2. Datenanalyse und Verifikation

In gerichteten Evolutionsexperimenten werden Mutagenese und Screening/Selektion zyklisch in mehreren aufeinanderfolgenden Runden durchlaufen, bis ein Enzym mit gewünschten Eigenschaften erhalten wird.^{87,223} Da dieses Vorgehen repetitiv ist, wird in diesem Kapitel exemplarisch die erste Runde gerichteter Evolution des gewünschten ketonselektiven Enzyms gezeigt und erklärt. Ausgehend von P7E wurden dabei zehn verschiedene Aminosäurepositionen im Bereich des aktiven Zentrums mittels ortsgerichteter Sättigungsmutagenese adressiert (L97, V123, W206, T210, W211, V278, S325, V326, W329, F429). Bei einigen davon handelte es sich um bereits gesättigte, vielversprechende Positionen aus der Evolution der anti-Markovnikov Oxygenase. Möglicherweise wurde an einigen dieser Positionen noch nicht das Optimum erreicht, um den carbonylselektiven Reaktionspfad für *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) zu begünstigen. Für alle zehn Positionen wurde die bereits beschriebene Mutagenese-strategie (Kapitel 3.2.2.1.) angewendet und jede Variantenbibliothek mit dem etablierten Expressions- und Screeningsystem präpariert und analysiert (Kapitel 3.2.1.). Anschließend wurden die Daten prozessiert und für jede Bibliothek eine *Retention of Function Curve* erstellt (**Abbildung 34, A**). In einer solchen Auftragung sind Produktbildungen (Phenylacetone) und die Keton-Selektivität (Quotient aus

Keton / Keton + Epoxid + Zimtalkohol) nach Enzymaktivität sortiert aufgetragen. Referenzwerte für die Variante der vorherigen Evolutionsrunde (je 3 bis 4 pro 96-Deep-Well-Platte) wurden zum Vergleich herangezogen und ermöglichten es, aktivere und selektivere Varianten (*Hit*-Varianten) zu identifizieren. Selektivere Varianten mit hohen bis moderaten Aktivitäten wurden ausgewählt und die entsprechenden codierenden Plasmide sequenziert. Zudem wurden auch Varianten mit stark erhöhter Aktivität bei gleichbleibender Selektivität in Betracht gezogen, da sie zu einem späteren Zeitpunkt zur Stabilisierung und Effizienzsteigerung des Enzyms berücksichtigt werden konnten. Die erhaltenen Varianten wurden im Anschluss validiert (*rescreening*), um die ermittelten verbesserten Aktivitäten und Selektivitäten zu bestätigen. Dazu wurden die Varianten im Schüttelkolben exprimiert und die Enzymkonzentration im Lysat mittels CO-Differenzspektroskopie ermittelt. Für die durchgeführten Biotransformationen wurde eine definierte Enzymkonzentration eingesetzt (0.625 μM), um vergleichbare Werte zu erhalten. Aus den ermittelten Produktbildungen konnte die Aktivität der Varianten als *total turnover number* (TTN) ermittelt werden. Diese Kennzahl entspricht der Anzahl katalytischer Zyklen pro Enzymmolekül in einem definierten Zeitraum (hier 2 h). Die erhobenen Daten wurden gemeinsam mit der daraus berechneten Keton-Selektivität aufgetragen (**Abbildung 34, B**). Für die Auswahl des nächsten Templats (*parent*) der darauffolgenden Runde wurden drei Kriterien berücksichtigt. Die Keton-Selektivität wurde hauptsächlich in Betracht gezogen und am stärksten gewichtet. Traten jedoch mehrere Varianten mit ähnlichen Selektivitäten auf (hier: P7E-W206I und P7E-W206A), wurde auch die Aktivität der Varianten berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde für die nächste Runde gerichteter Evolution P7E-W206A als Templat ausgewählt. Ein drittes Selektionskriterium war in einigen Fällen die Enzymkonzentration im Zellysate. Bei sehr geringer Überexpression vermeintlicher *Hit*-Varianten wurden im Screeningprozess der nächsten Runde nur sehr geringe Produktbildungen erzielt, die teilweise nicht mehr detektiert werden konnten. Selektivere Varianten mit noch schwächerer Aktivität oder Überexpression konnten dabei nicht mehr identifiziert werden. Die Produktverteilung aller drei Oxidationsprodukte (**Abbildung 34, C**) konnte einen Eindruck darüber vermitteln, inwieweit sich der Bindungsmodus des Substrats für die jeweiligen Varianten verändert hat. Dieses Kriterium hatte auf den Entscheidungsprozess für und gegen eine Variante jedoch wenig Einfluss.

In den nachfolgenden Evolutionsrunden wurde das beschriebene Vorgehen stets wiederholt. Die Datenanalyse und das *rescreening* besserer Varianten erfolgte dabei analog wie in diesem Kapitel beschrieben. Neben ortsgerechter Sättigungsmutagenese wurden in späteren Runden auch (fokussierte) kombinatorische Variantenbibliotheken sowie Einzelvarianten erstellt und gescreent. Details zu den einzelnen Runden, sowie das Gesamtergebnis der gerichteten Evolution einer Ketonsynthase sind im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

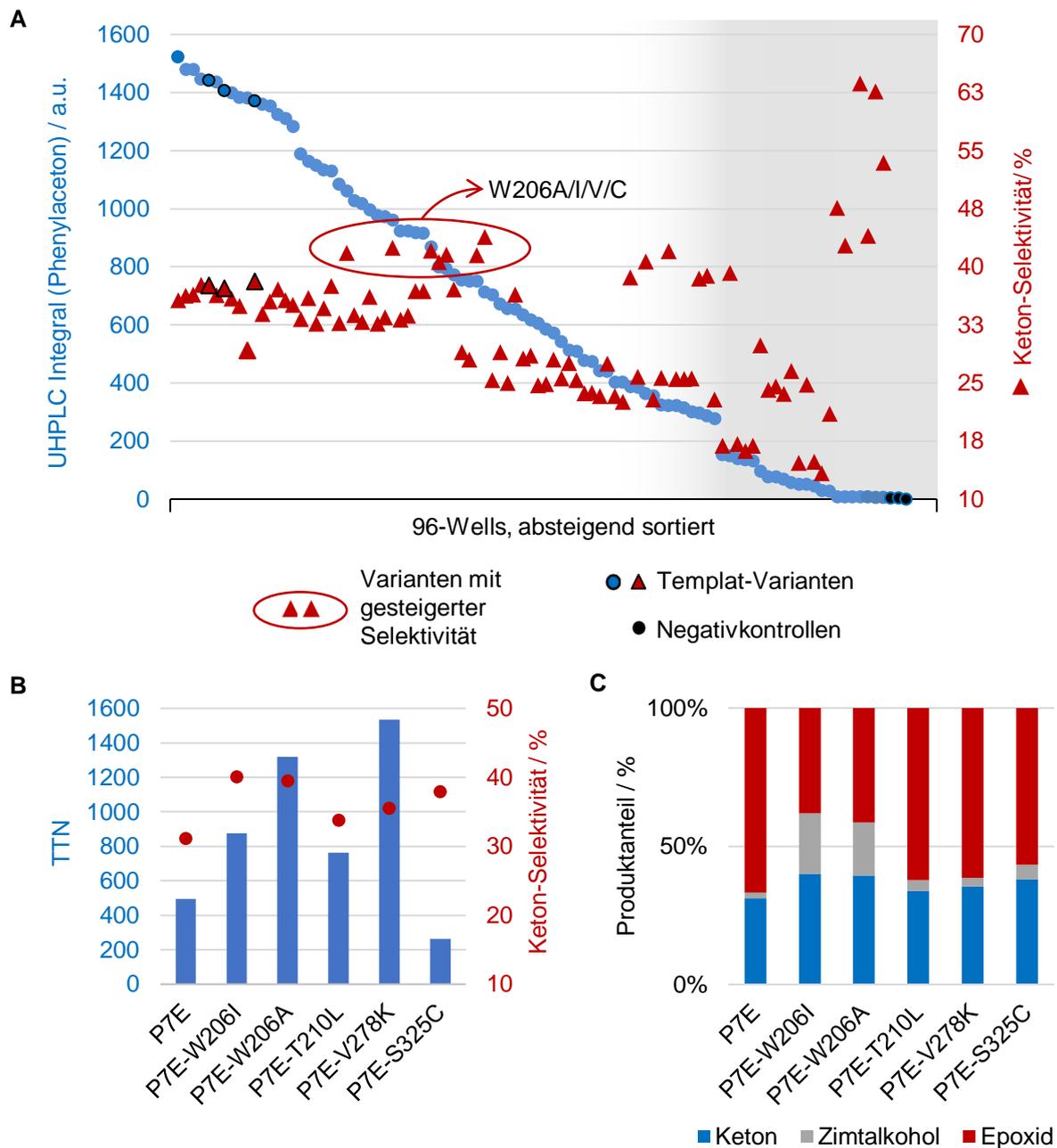


Abbildung 34 – (A) *Retention of Function Curve* am Beispiel einer Sättigungsbibliothek an Position W206X ausgehend von Variante P7E. Die ermittelten Produktbildungen von Phenylacetone (Integral) durch die jeweilige Variante sind absteigend sortiert dargestellt (blau) und die entsprechenden Keton-Selektivitäten (rot) sind zugeordnet. Ermittelte Werte für die Templat-Variante P7E sind durch schwarz gerahmte Datenpunkte hervorgehoben. Selektivere Varianten, die im Folgenden sequenziert und validiert wurden, sind in einem roten Kreis eingefasst. In dem grau gekennzeichneten Bereich wurden keine Varianten berücksichtigt, da es sich hierbei wahrscheinlich um Artefakte handelt (unpräzise Integration) oder die Varianten nahezu inaktiv sind. (B) Erneute Validierung (*rescreening*) von *Hit*-Varianten, die in der ersten Evolutionsrunde identifiziert wurden. Anhand der quantitativ ermittelten katalytischen Aktivität (TTN) und der Keton-Selektivität wurde entschieden, welche Variante für die nächste Evolutionsrunde herangezogen wurde. (C) Produktverteilung der erneut validierten Varianten.

3.2.2.3. Resultat der gerichteten Evolution und Diskussion

Ziel war es, die Aktivität und Keton-Selektivität von P7E durch gerichtete Evolution schrittweise zu optimieren. Das Evolutionsexperiment umfasste sowohl Sättigungsmutagenese- als auch kombinatorische Mutagenese-Bibliotheken und wurde mittels Hochdurchsatz-UHPLC-Analyse durchgeführt. In zwölf Evolutionsrunden wurden mehr als ein Dutzend vorteilhafte Mutationen entdeckt, die P7E in eine effiziente Ketonsynthase (KS) verwandelten (**Abbildung 35, A**).

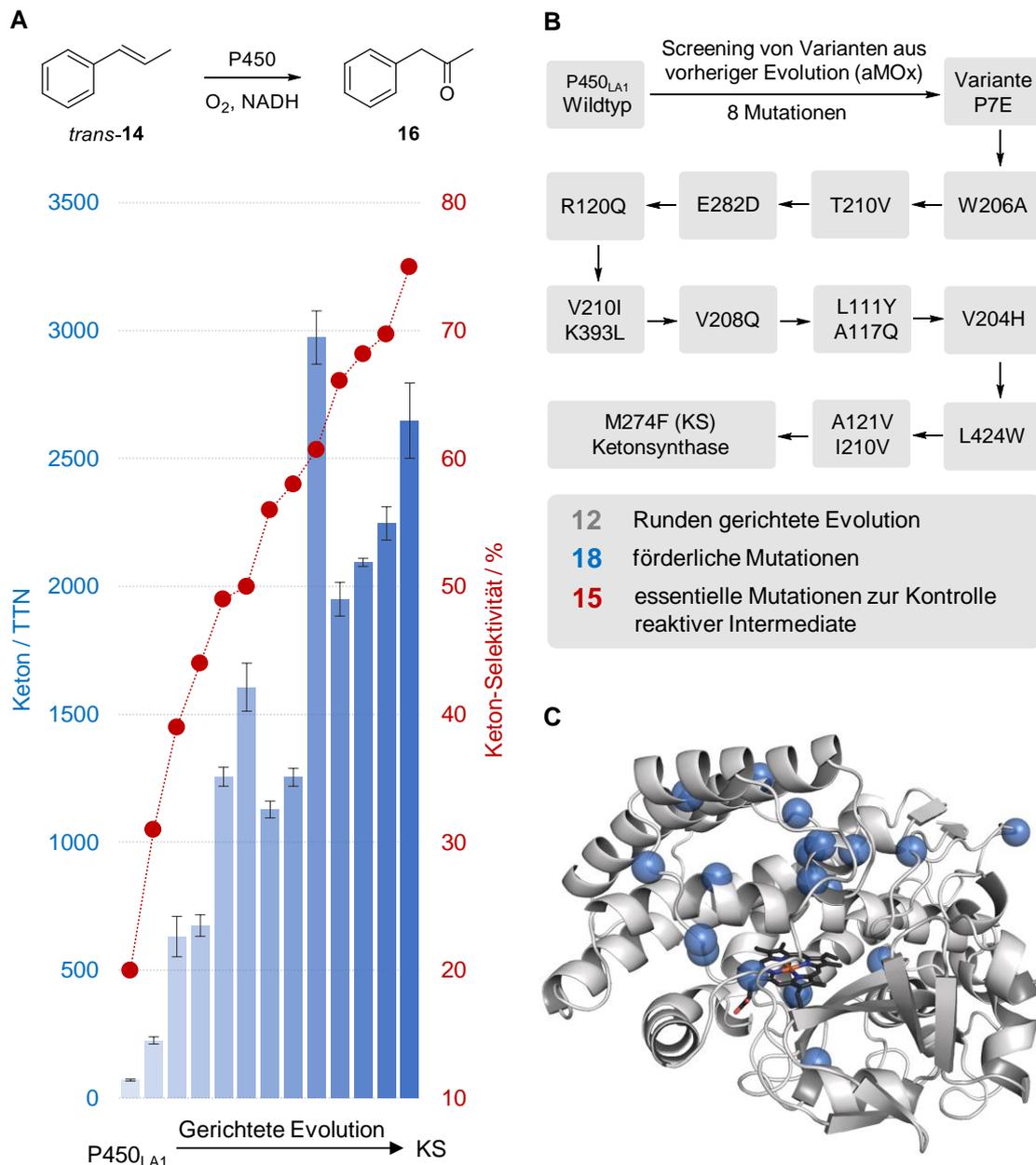


Abbildung 35 – (A) Gerichtete Evolution einer Ketonsynthase (KS) für die Oxidation von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-14) zu Phenylacetone (16) ausgehend von P450_{LA1}. Aktivität und Selektivität sind als Funktion der Evolution aufgetragen. Die katalytische Aktivität in TTN (2 h Reaktionszeit, 5 mM Substrat, 5 mM NADH, 0.625 μ M Enzym) und die Keton-Selektivität sind aufgetragen (Quotient der Produktkonzentrationen: Keton / (Keton + Epoxid + Zimtalkohol)). (B) Trajektorie des gerichteten Evolutionsexperiments mit Auflistung der eingeführten Aminosäuresubstitutionen in jeder Runde. (C) Homologiemodell der evolvierten Ketonsynthase mit Hervorhebung der eingeführten Mutationen als blaue Kugeln. Der Häm-Cofaktor ist schwarz dargestellt.

In den zwölf durchgeführten Evolutionsrunden wurden insgesamt 77 Aminosäurepositionen der Häm-Domäne (350 Aminosäuren insgesamt) adressiert, was circa 22% aller Aminosäuren entspricht (**Tabelle 3**). Nachdem über die ersten vier Runden ausschließlich ortsgerichtete Sättigungsmutagenese angewendet wurde, kamen im Verlauf der Evolution weitere Mutageneseansätze zum Tragen. Neben fokussierter kombinatorischer Mutagenese an jeweils zwei Positionen, wurden auch größere kombinatorische Variantenbibliotheken an bis zu acht Aminosäurepositionen erprobt. Rekombinationen von *Hit*-Varianten erfolgten während der gesamten Evolution, indem Sättigungen an bekanntermaßen funktionalen Aminosäurepositionen wiederholt wurden. Außerdem wurden in der letzten Runde Einzelvarianten erstellt, die im Laufe der Evolution selektivitätssteigernde Effekte zeigten, aber noch nicht berücksichtigt werden konnten. Neben Aminosäuren in der Häm-Domäne wurden auch drei Aminosäuren der Reduktasedomäne verändert, welche nach Literaturangaben effizienzsteigernde Effekte zeigen sollten.²²⁴ Dies konnte in diesem Fall nicht bestätigt werden.

Die resultierende, evolvierte Ketonsynthase produziert Phenylaceton (**16**) mit hoher Aktivität (2620 TTN) und guter Selektivität (75%) bei vollständiger Regiokontrolle. Die konkurrierende allylische Oxidation konnte letztendlich unterbunden werden, sodass nur noch das Epoxidprodukt **15** als alleiniges Nebenprodukt der Endvariante beobachtet werden konnte. Es ist anzumerken, dass Epoxide durch die Ketonsynthase nicht isomerisiert werden (Kapitel 3.2.4.), was dafür spricht, dass die Katalyse wie postuliert über den gekoppelten Elektronen-/Hydrid-transferprozess abläuft.

Die entwickelte Ketonsynthase ist 37-mal aktiver als das Wildtyp-Enzym P450_{LA1} und um zwei Größenordnungen effizienter als bisher berichtete chemische Katalysatoren.^{15,207} Insgesamt wurden 18 Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu P450_{LA1} eingeführt (**Abbildung 35, B, C**). Eine sorgfältige Analyse ergab, dass 15 dieser 18 Mutationen entscheidend für die Verbesserung der Selektivität im Laufe der Evolution sind. Interessanterweise sind die vorteilhaften Mutationen nicht auf das aktive Zentrum beschränkt. Viele Mutationen befinden sich in der zweiten und dritten Schale und ihre einzelnen Beiträge addieren sich, um Zugang zum Keton-Produkt zu ermöglichen. Dies schließt kooperative Effekte ein, die zum Beispiel gut an Position 210 verfolgt werden können (Kapitel 3.2.2.4.). Während der Evolution konnten keine großen Sprünge in der Selektivität verzeichnet werden. Insgesamt gab es keine einzige Mutation, die die Keton-Selektivität um mehr als 8% steigerte. Besonders anspruchsvoll war es, die konkurrierende Epoxidierung zu unterdrücken, während allylische Oxidationsprodukte deutlich leichter aus dem Produktgemisch verdrängt werden konnten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Diskriminierung des Substratbindungsmodus der allylischen Oxidation im Allgemeinen einfacher zu realisieren ist, als die Kontrolle über reaktive Radikal-Intermediate (Epoxidierung vs. carbonylselektive Oxidation).

Tabelle 3 – Tabellarische Übersicht der durchgeführten gerichteten Evolution. Je Runde sind die Templat-Variante und die entsprechend gescreenten Variantenbibliotheken benannt. Die angewendeten Mutagenesestrategien sind angegeben sowie die adressierten Aminosäurepositionen. Förderliche Aminosäuresubstitutionen (*Hit*-Varianten) die in der jeweiligen Runde identifiziert wurden sind vermerkt. Eine Legende am Ende der Tabelle listet die verwendeten reduzierten Codons und die jeweils codierten Aminosäuren auf.

Runde	Templat-Variante	Variantenbibliothek	Förderliche Substitution
1	P450 _{LA1} Wildtyp	Screening von Evolutionsintermediaten aus gerichteter Evolution für die anti-Markovnikov-Oxidation von Styren	T121A, V123I, N201K, H206W, N209S, I326V, Y385H, E418G
2	T121A, V123I, N201K, H206W, N209S, I326V, Y385H, E418G (P7E)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese L97X, V123X, W206X, T210X, W211X, V278X, S325X, V326X, W329X, F429X	W206A
3	P7E-W206A (S2)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese L97X, A121X, S207X, T210X, G212X, V278X, S325X	T210V
4	S2-T210V (S3)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese A103X, R120X, A121X, A205X, S209X, E282X, T283X, M391X	E282D
5	S3-E282D (S4)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese A96X, Y116X, M118X, N119X, R120X, V226X	R120Q
6	S4-R120Q (S5)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese L97X, M122X, W206X, M272X, M274X, A275X, V278X, V327X, H385X, G386X, S387X, Q389X, M391X, K393X Fokussierte kombinatorische Mutagenese (mit reduzierten Codons*) V210(DYA) – Q120(VAM), V210(DYA) – A121(DYA), V210(DYA) – I123(DYA), V210(DYA) – E282(VAM), V210(DYA) – A206(KBG), V210(DYA) – S207(WVC), A206(KBG) – S207(WVC), Q120(VAM) – A121(DAY), Q120(VAM) – I123(DAY), A121(DAY) – I123(DAY) Fokussierte Mutagenese (mit NDT-Codon) K99(NDT), A103(NDT), A107(NDT), L111(NDT), A118(NDT), N124(NDT), V204(NDT), V208(NDT), W211(NDT), I222(NDT), A279(NDT), A280(NDT), L286(NDT)	V210I, K393L

Runde	Templat-Variante	Variantebibliothek	Förderliche Substitution
7	S5-V210I-K393L (S6)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese L111X, V208X, S428X	V208Q
		Retrospektive, kombinatorische Bibliothek an 7 bekannten <i>Hit</i> -Positionen (mit reduzierten Codons*) Q120R/Q(CRG) – A121I/A(RCT) – I123V/I(RTT) – A206W/A – Q208V/Q – I210V/T/I/A(RYT) – D282E/D(GAW)	
8	S6-V208Q (S7)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese R94X, N95X, E98X, A117X, S203X, S271X, I276X, R330X	L111Y A117Q
		Fokussierte Mutagenese (mit NDT-Codon) I395(NDT), A396(NDT)	
		Fokussierte kombinatorische Mutagenese (mit reduzierten Codons*) mit S7-A117Q als Templat-Variante L111F/Y/L/H(YWT) – M118L/M(WTG)	
9	S7-L111Y-A117Q (S8)	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese I100X, T101X, T104X, D194X, K201X, F202X, V204X, K213X, A328X, L424X, S425X, T427X	V204H
10	S8-V204H (S9)	Fokussierte kombinatorische Mutagenese (mit reduzierten Codons*) I100M/I(ATS) – L424Q/W/L(CWG/TGG) – T427V/I/L/P/AT(VYC)	L424W
		Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese P93X, K99X, P102X, A107X, N124X, I222X, A223X, W230X, H281X, L286X, A287X, N426X, R430X	
11	S9-L424W (S10)	Fokussierte kombinatorische Mutagenese an 8 Positionen (mit reduzierten Codons*) ²²⁵ L97V/L(STG) – A121V/A(GYC) – I123V/I(RTT) – A206V/A(GYG) – I210V/I(RTA) – A275V/A(GYG) – V278A/V(GYT) – V326I/V(RTT)	A121V I210V

Runde	Templat-Variante	Variantenbibliothek	Förderliche Substitution
		Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese A103X, N119X, Q120X, A205X, S207X	
		Fokussierte kombinatorische Mutagenese (mit reduzierten Codons*) L97L/I/M(MTS) – W211Y/F/W(TWC/TGG) – A275G/I/S/T/V/A(RBC)	
12	S10-A121V-I210V (S11)	Kombinatorische Sättigungsmutagenese A206X – Q120X	M274F
		Einzelvarianten (im Verlauf der Evolution identifizierte förderliche Mutationen sowie potenziell effizienzsteigernde Varianten nach Literatur ²²⁴) L97I, L97M, V278K, S325C, M391L, M274F, S428C, E418G, C390S, M612L, N694D, K774Y	

*Liste der reduzierten Codons und der entsprechenden codierenden Aminosäureresten:

NDT – R, N, D, C, G, I, H, L, F, S, Y, V	RYT – T, I, A, V	CRG – R, Q
DYA – V, I, L, A, S, T	YWT – L, F, Y, H	RCT – T, A
VAM – N, D, Q, E, H, K	MTS – L, I, M	RTT – V, I
KBG – A, W, V, L, S, G	GYC/GYG/GYT – A, V	GAW – E, D
WVC – N, 2xS, C, Y, T	RTT/RTA – I, V	WTG – M, L
VYC – V, I, L, T, P, A	TWC – Y, F	ATS – I, M
RBC – A, G, I, S, T, V	STG – L, V	CWG – L, Q
		TGG – W

3. Ergebnisse und Diskussion

Bereich	Position	P7E	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
B Region	P93											
	R94											
	N95											
	A96											
	L97											
	E98											
	K99											
	I100											
	T101											
	P102											
B' Helix	A103											
	T104											
B/C Region	A107											
	L111											
	Y116											
	A117											
	M118											
	N119											
	R120											
	T121											
	M122											
	V123											
F Helix	N124											
	D194											
	N201											
	F202											
F/G Loop	S203											
	V204											
	A205											
	H206											
	S207											
	V208											
	S209											
	T210											
	W211											
	G212											
G Helix	K213											
	I222											
	A223											
	V226											
I Helix	W230											
	S271											
	M272											
	M274											
	A275											
	I276											
	V278											
	A279											
	A280											
	H281											
β1 Region	E282											
	T283											
	L286											
	A287											
	S325											
	I326											
	V327											
	A328											
	W329											
	R330											
Cys-Ligand Loop	Y385											
	G386											
	S387											
	Q389											
	C390											
	M391											
L Helix	K393											
	I395											
Reduktase	A396											
	E418											
	L424											
	S425											
	N426											
	T427											
	S428											
	F429											
R430												
Reduktase	M612											
	N694											
	K774											

Tabelle 4 – Tabellarische Übersicht des gerichteten Evolutionsexperiments. Adressierte Aminosäurepositionen (sowie eine strukturelle Lokalisierung) sind in der jeweiligen Evolutionsrunde farbig markiert. Ein Farbcode gibt Auskunft über die angewendete Mutagenese-strategie. Identifizierte förderliche Aminosäuresubstitutionen sind rot markiert.

	Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese
	Fokussierte kombinatorische Mutagenese
	Kombinatorische Sättigungsmutagenese
	Fokussierte Mutagenese (NDT)
	Einzelvarianten
X	Identifizierte, förderliche Aminosäuresubstitution

Vergleicht man die Evolution von aMOx⁷² mit der Evolution der Ketonsynthase, so fällt auf, dass deutlich mehr Aminosäuresubstitutionen durchgeführt werden mussten, um den vergleichbaren Katalysezyklus zu ermöglichen. Ketonsynthase und aMOx unterscheiden sich in insgesamt 17 Mutationen. Das sind circa 5% aller Aminosäuren, die von der Häm-Domäne umfasst werden. Im Vergleich zu aMOx wurden zudem an sechs weiteren Positionen Aminosäuresubstitutionen durchgeführt, um eine carbonylselektive Oxidation von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) mit vergleichbarer Aktivität und Selektivität zu ermöglichen. In der Analyse bedeutet das, dass die Kontrolle über den Katalysezyklus für interne Alkene verglichen zu terminalen Alkenen deutlich anspruchsvoller ist. Auch im Vergleich mit anderen gerichteten Evolutionen selektiver Enzyme, waren für die Entwicklung der Ketonsynthase überdurchschnittlich viele Aminosäuresubstitutionen notwendig. In zahlreichen literaturbekannten Beispielen war es möglich, bereits mit wenigen Mutationen die Regio- oder Enantioselektivität der Enzyme drastisch zu verbessern oder diese gar umzukehren.^{226,227} Nennenswert ist das *enzyme engineering* von P450_{BM3} für die regioselektive Hydroxylierung von Testosteron. Im Rahmen verschiedener Evolutionsprojekte konnten für die Umsetzung dieses Substrats bereits mehrere Varianten mit lediglich bis zu sechs Mutationen identifiziert werden, die jeweils 2 β -, 15 β -, 16 β - oder 16 α -hydroxylierte Produkte mit sehr hohen Regioselektivitäten liefern.^{228,229} Dabei wurde die Substratbindetasche des Enzyms für jede Variante individuell remodelliert, um das Substrat in einer bestimmten Orientierung gegenüber *Compound I* zu akkomodieren. Im Falle der Ketonsynthase sind die 18 eingeführten Mutationen nicht ausschließlich für die initiale Kontrolle des Substratbindungsmodus vor dem Oxo-Transfer zuständig (allylische Oxidation *versus* Epoxidierung/carbonylselektive Oxidation). Sie generieren ein neues aktives Zentrum, das nach der ersten C-O-Bindungsbildung zwischen zwei verschiedenen Katalysezyklen unterscheidet (Epoxidierung *versus* carbonylselektive Oxidation), indem Dynamik und Konformation hoch-energetischer Intermediate zielgerichtet kontrolliert werden. Eine tiefgreifendere strukturelle und mechanistische Diskussion zur Frage, wie die präzise Katalysator-Kontrolle der Ketonsynthase zustande kommt, schließt sich in den Kapiteln 3.2.3. und 3.2.4. an.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sowohl aMOx als auch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Ketonsynthase interessante Beispiele sind, wie durch gerichtete Evolution neue Katalysezyklen erschlossen werden können, die bisher mit keinem anderen Katalysatorsystem effizient genutzt werden konnten. Die meisten evolvierten Biokatalysatoren mit neuen Enzymfunktionen katalysieren in der Regel bekannte Reaktionen und nutzen dabei dieselben Katalysezyklen, die auch mit niedermolekularen Katalysatoren zugänglich sind (z.B. Cyclopropanierung⁸⁸, Kemp-Eliminierung¹¹⁴, Hetero-Diels-Alder-Reaktionen²³⁰ oder Metathese¹¹⁰). Häufig wird der Reaktionsmechanismus durch *enzyme engineering* auf die Umsetzung neuer (anspruchsvollerer) Substrate ausgeweitet. Dabei wird die makromolekulare Proteinstruktur genutzt, um zusätzlich Chemo-, Regio- und Enantioselektivitäten zu kontrollieren,

die mit anderen synthetischen Katalysatoren bisher nicht erreichbar waren. Dieser Vergleich soll verdeutlichen, dass aMOx und Ketonsynthase keine klassischen evolvierten Enzyme mit nicht-natürlicher Funktion sind, die bekannte Katalysekonzepte ausweiten. Sie eröffnen stattdessen einen neuen Reaktionspfad, der sowohl mit synthetischen als auch biologischen Katalysatorsystemen bisher nicht selektiv kontrollierbar war. Mit diesem innovativen Ansatz wurde eine neue Syntheseroute eröffnet, die eine direkte und regioselektive Alkenoxidation zu Carbonylen erlaubt und damit eine neue Methode im Repertoire der Synthesechemie darstellt.

3.2.2.4. Nicht-additive Effekte und ihre Ausnutzung in der Mutagenese

Im Verlauf der gerichteten Evolution konnten an einigen Aminosäurepositionen nicht-additive Mutationseffekte nachgewiesen werden.²³¹ Darunter fallen vor allem kooperative Effekte, die sich gut anhand Position 210 veranschaulichen lassen. Die Aminosäure an dieser Position änderte sich im Laufe der Evolution von Threonin zu Valin, anschließend zu Leucin und wieder zurück zu Valin (**Abbildung 36, A**). Die Substitutionen trugen stets dazu bei, die Selektivität zu erhöhen und die Aktivität zu steigern.

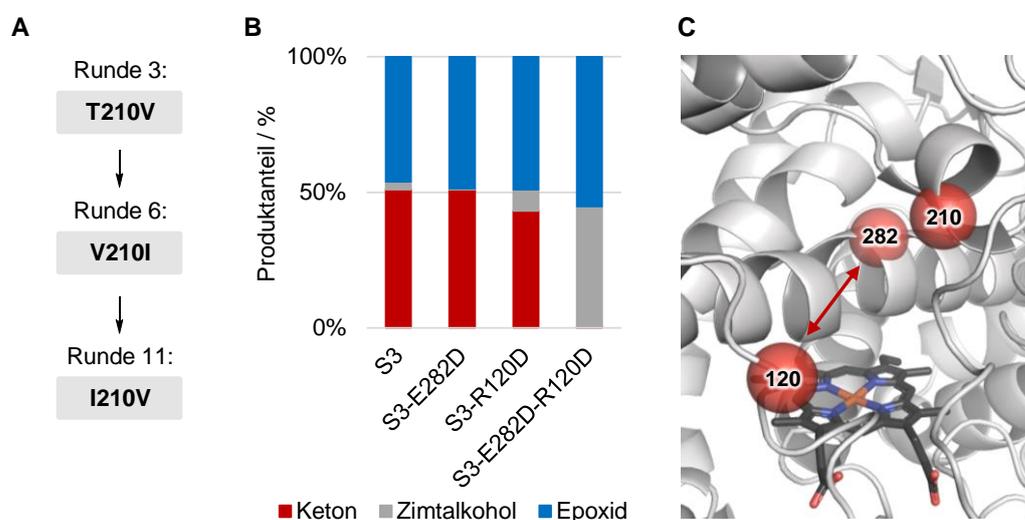


Abbildung 36 – Beispiele für im Laufe der gerichteten Evolution aufgetretener kombinatorischer Effekte. **(A)** Aminosäuresubstitutionen an Position 210 wurden im Verlauf der Evolution mehrfach geändert. Jede Änderung im Kontext anderer Mutationen führte stets zu einer Selektivitätssteigerung. **(B)** Ausgehend von Variante S3 führten die Aminosäureaustausche E282D und R120D zu veränderten Produktverteilungen. Eine Kombination beider Substitutionen führte zum Kollaps des Katalysezyklus der Ketonbildung zugunsten des allylischen Oxidationsprodukts. **(C)** Homologiemodell von P7E mit hervorgehobenen Aminosäurepositionen (rot), die im Zusammenhang mit kombinatorischen Effekten aufgefallen sind.

Neben kooperativen Effekten, die einen gewinnbringenden Einfluss hatten, konnten auch Effekte beobachtet werden, welche die Ketonbildung stark reduzierten. Ein eindrückliches Beispiel liefern die Positionen 120 und 282, trotz signifikanter Distanz zueinander (**Abbildung 36, B, C**).

Ausgehend von Variante S3 führten die Substitutionen R120D und E282D alleine lediglich zu geringfügiger Veränderung der Produktverteilung. In Kombination wiesen die beiden Substitutionen einen antagonistischen Effekt auf.^{231,232} Die Doppelvariante katalysierte lediglich Epoxidierung und allylische Oxidation, während Phenylacetone (**16**) nicht mehr als Produkt detektiert werden konnte. Beide Aminosäuresubstitutionen verhindern vermutlich die Zugänglichkeit des Katalysezyklus, der für die Ketonbildung nötig ist. Während das Substrat zuvor beide Bindungsmodi für allylische Oxidation und Ketonbildung erreichen konnte, führte die neue geschaffene Konformation des aktiven Zentrums zu einer klaren Diskriminierung zugunsten der allylischen Oxidation.

Inspiziert von den beobachteten nicht-additiven Effekten wurden Unternehmungen angestellt, kooperative Effekte durch fokussierte kombinatorische Mutagenese gezielt nutzbar zu machen. Daher wurden im Verlauf der Evolution auch kombinatorische Variantenbibliotheken an rational gewählten Positionen erstellt und gescreent. Begonnen wurde zunächst mit kleinen Bibliotheken, bei denen nur zwei Aminosäurepositionen in Kombination adressiert wurden. Allgemein wurde auf Aminosäuren abgezielt, die bekanntermaßen Einfluss auf die Keton-Selektivität nehmen können. Um den Screening-Aufwand zu minimieren wurden ausschließlich reduzierte Codons verwendet, die für subtile strukturelle Änderungen sorgten. So wurde für unpolare Aminosäuren beispielsweise das Codon *DYA* verwendet, welches für diverse unpolare Aminosäuren codiert (Valin, Isoleucin, Alanin, Leucin). Für die Mutagenese wurden einerseits Aminosäuren kombiniert adressiert, die sich in der aktiven Tasche ausgehend von Position 210 quer gegenüberstehen (**Abbildung 37, A**). Die Motivation bestand darin, weitere kooperative Effekte an dieser Position zu ergründen. Andererseits wurden auch in Nachbarschaft befindliche Aminosäuren in Kombination adressiert, was für ein zielgerichtetes Feintuning in entscheidenden Strukturelementen sorgen sollte (**Abbildung 37, B, C**). Im speziellen beschränkte sich dieser Ansatz auf relevante Aminosäurepositionen der B/C- und F/G-Region. Diese strukturellen Bereiche gelten als *Hot-Spot*-Regionen, die besonders großen Einfluss auf die Keton-Selektivität ausbilden, da im Verlauf der Evolution die meisten förderlichen Variationen in diesen Bereichen eingeführt wurden. Überraschenderweise konnten mit kombinatorischen Variantenbibliotheken keine signifikant verbesserten Varianten identifiziert werden.

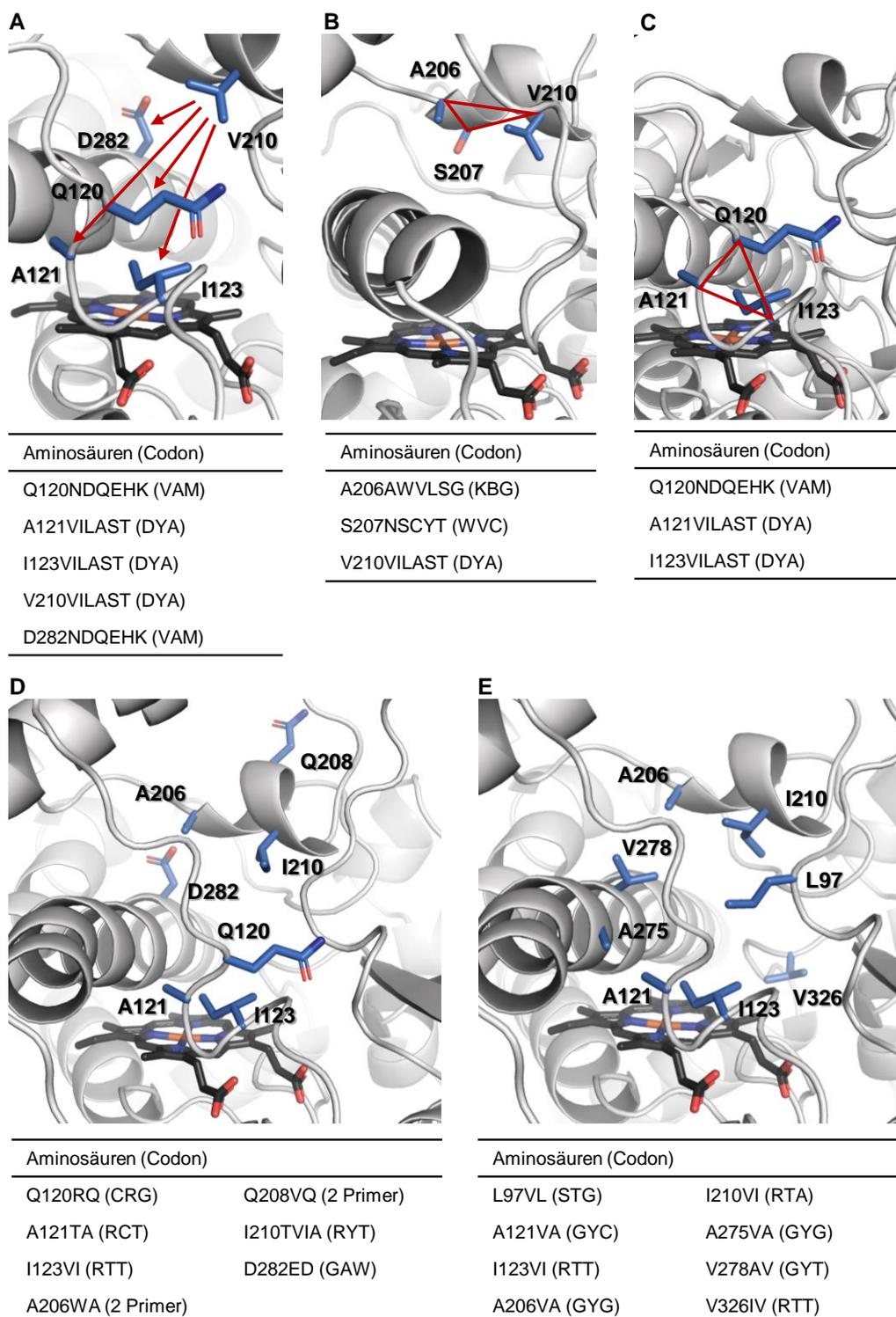


Abbildung 37 – (A) Fokussierte kombinatorische Variantenbibliotheken an zwei Positionen gleichzeitig, ausgehend von Position 210 diagonal über die aktive Tasche. (B & C) Variantenbibliothek für benachbarte Aminosäuren, die zuvor als *Hot-Spots* für Selektivität aufgefallen sind. (D) Retrospektive kombinatorische Bibliothek an sieben Positionen simultan. Je Aminosäureposition wurde die Aminosäure des Startpunkts (P7E) gegen die identifizierte, selektivitätssteigernde Aminosäure des aktuellen Templates (S7) kombiniert. (E) Für diese fokussierte kombinatorische Variantenbibliothek wurden an 8 Positionen gleichzeitig sehr subtile Mutationen vorgenommen (z.B. L zu V, A zu V, I zu V).²²⁵ Bei den adressierten Positionen handelte es sich um Selektivitäts-*Hot-Spots*, die bis dahin (Variante S10) identifiziert wurden.

Neben kleinen kombinatorischen Variantenbibliotheken wurden auch größere Bibliotheken erstellt, mit denen bis zu acht Aminosäurepositionen gleichzeitig adressiert werden konnten. Präparativ wurde dafür die MISO-Strategie angewendet, die das Einführen ortsgerichteter Mutationen an mehreren Positionen gleichzeitig ermöglichte.²³³ Um den Screening-Aufwand in einem angemessenen Rahmen zu halten, wurde ein Setup gewählt, dass für eine 95%ige Abdeckung aller möglichen Variantenkombinationen nur 800 gescreente Varianten erfordert. Daher wurden an jeder Position ausschließlich Codons gewählt, die nur für zwei mögliche Aminosäuren codieren. In einer erstellten Variantenbibliothek wurden sieben selektivitätssteigernden Aminosäurevariationen der zu diesem Zeitpunkt besten Variante (S7) in Kombination mit den ursprünglichen Aminosäuren des Startpunkts (P7E) adressiert (**Abbildung 37, D**). Möglicherweise könnte ein stellenweiser Rückschritt zur vorherigen Aminosäure zu einem kooperativen Effekt führen, der außerhalb der Evolutionstrajektorie liegt. Ein solcher selektivitätssteigernder Effekt wurde jedoch nicht beobachtet. In einer weiteren kombinatorischen Variantenbibliothek wurde eine erst kürzlich publizierte "intelligente" Mutagenese-strategie angewendet, die sich durch eine besonders hohe Häufigkeit von aktiven Varianten mit veränderten Selektivitäten auszeichnet (**Abbildung 37, E**).²²⁵ Dabei wurden an mehreren Aminosäurepositionen sehr subtile Änderungen durchgeführt, die sich nur durch Hinzufügen oder Entfernen einer Methylengruppe am Aminosäurerest äußerten. So wurden beispielsweise Austausch von Isoleucin zu Valin oder Alanin zu Valin durchgeführt. Bei den adressierten acht Positionen handelte es sich wiederum um *Hot-Spot*-Positionen, die um die gesamte aktive Tasche verteilt angeordnet waren. Interessanterweise waren 80-90% aller gescreenten Varianten inaktiv und brachten keines der drei möglichen Oxidationsprodukte hervor. Dennoch konnten in dieser Bibliothek gleich zwei selektivitätssteigernde Austausche identifiziert werden (A121V, I210V).

Dieses Ergebnis zeigt, dass mit derartigen kombinatorischen Bibliotheken kooperative Beziehungen zwischen Aminosäuren ausfindig gemacht werden können. Dennoch bewegt sich der Zugewinn an Selektivität in einem überschaubaren Rahmen und lässt sich nicht mit kooperativen Effekten vergleichen, die in anderen Evolutionsprojekten gefunden werden konnten.²³¹ Im Verlauf der Evolution der Ketonsynthase war es notwendig, die kinetisch privilegierte Epoxidierung schrittweise zu benachteiligen, indem bevorzugt reaktive Radikal- und Carbokation-Intermediate kontrolliert werden, die für den carbonylselektiven Reaktionspfad essentiell sind. Das bedeutet hauptsächlich, dass eine präzise Kontrolle der Intermediat-Konformationen (um rotierbare Bindungen) erfolgen muss. Eine selektivere Bevorzugung dieser Konformere gegenüber anderen, die zur Epoxidierung führen, wird vermutlich bereits durch sehr subtile Veränderungen in der Proteinstruktur bestimmt. In Evolutionsprojekten, die von besonders ausgeprägten kooperativen Effekten berichten, wurden hauptsächlich Varianten mit stark gesteigerten Enzymaktivitäten oder Enantioselektivitäten engineer²³⁴⁻²³⁷ Anhand dieser

Beispiele wird deutlich, dass diese drastischen Aktivitäts- oder Selektivitätssprünge hauptsächlich ein Resultat optimierter Substratbindungen sind und mit größeren strukturellen Veränderungen der aktiven Zentren zusammenhängen. Derart signifikante strukturelle Änderungen sind für die präzise Kontrolle von Intermediat-Konformeren – wie es für den Katalysezyklus der carbonylselektiven Alkenoxidation relevant ist – vermutlich nicht erforderlich. Zu große Strukturänderungen können die Ursache sein, warum 80-90% der Varianten in kombinatorischen Variantenbibliotheken inaktiv waren und warum andererseits ausschließlich subtile Aminosäuresubstitutionen in *Hit*-Varianten identifiziert wurden (z.B. A121V, I210V). Im größeren Kontext verdeutlicht dies, wieso insgesamt 18 Mutationen aus 12 Runden gerichteter Evolution notwendig waren, um die finale Ketonsynthase zu generieren; denn ein sorgfältiges Feintuning des aktiven Zentrums für eine verbesserte Katalysatorkontrolle konnte in diesem Fall nur in vielen kleinen Schritten erfolgen.

3.2.2.5. Allylische Oxidation als Konkurrenzreaktion

In zwölf Runden gerichteter Evolution konnte die Selektivität für Phenylaceton stetig verbessert werden, während die beiden konkurrierenden Oxidationsprodukte (Epoxid und Zimtalkohol) allmählich aus dem Produktgemisch verdrängt wurden (**Abbildung 38, A**). Die Benachteiligung von Epoxidierung und allylischer Oxidation war jedoch nicht gleichermaßen einfach. Einfluss auf die Epoxidierung zu nehmen gestaltete sich als besonders anspruchsvoll. Den größten Effekt auf diese Konkurrenzreaktion äußerte sich durch Variante S2 zu Beginn der Evolution mit einer sehr drastischen Aminosäuresubstitution (W206A). Im Gegenzug zum Epoxid bildete diese Variante erhebliche Mengen des allylischen Oxidationsprodukts. Während der Zimtalkohol bis Runde 11 vollständig aus dem Produktgemisch entfernt werden konnte, gelang es nur in sehr kleinen Schritten, den Beitrag der Epoxidierung zu unterdrücken. Im Laufe des Screening-Prozesses wurden auch Varianten entdeckt, die fast ausschließlich zur allylischen Oxidation des internen Alkens führten. In den beobachteten Fällen war lediglich ein einziger Aminosäureaustausch notwendig, um diese Selektivität zu erreichen (**Abbildung 38, B**).

Zur allylischen Oxidation ist vermutlich eine bestimmte Angriffskonformation (*near attack conformation*, NAC) des Substrats notwendig, welche sich erheblich von den Substratbindemodi zur Ketonbildung und der Epoxidierung unterscheiden muss. Es wird postuliert, dass sich das Substrat *trans-14* mit der terminalen Methylgruppe voran an die aktive Spezies (*Compound I*) annähert. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden in Kollaboration mit der Gruppe von Dr. Marc Garcia-Borràs MD-optimierte Modelle der Häm-Domänen des Wildtypenzym P450_{LA1} und der Variante S5-A275F erstellt. Anhand dieser Strukturmodelle konnte die Form und das Volumen

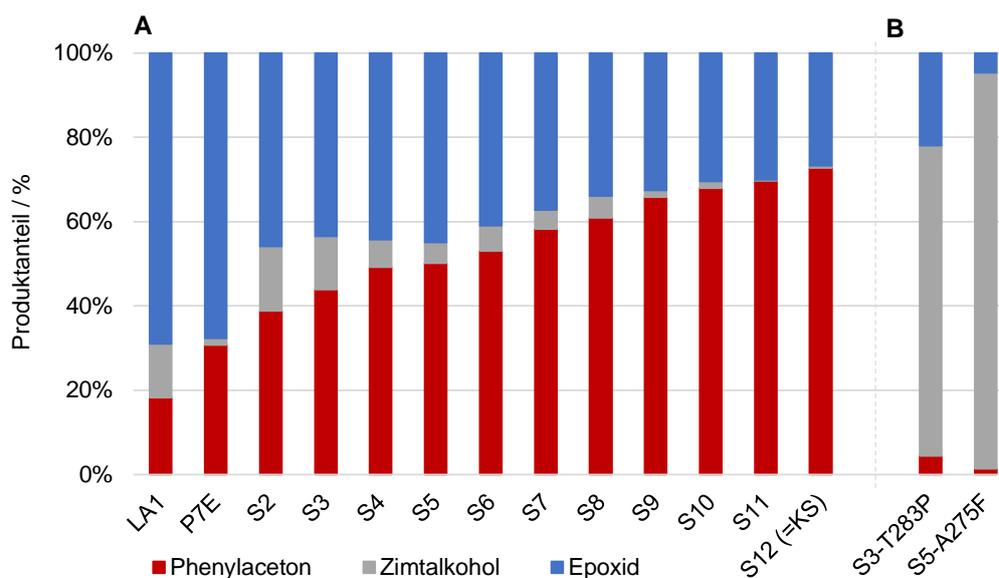


Abbildung 38 – (A) Produktverteilung der drei möglichen Oxidationsprodukte mit fortschreitender Evolution. (B) Produktverteilung von Einzelvarianten die hauptsächlich zur Bildung des allylischen Oxidationsprodukts 17 (Zimtalkohol) führen.

der jeweiligen aktiven Zentren bestimmt werden (**Abbildung 39, A, B**). Dabei ist zu erkennen, dass die stark raumfordernde Substitution mit Phenylalanin an Position 275 einen Flaschenhals induziert, welcher das aktive Zentrum unübersehbar verengt. Durch Docking des Substrats in das Strukturmodell der Variante wird erkennbar, dass nur noch Bindungsmodi erreichbar sind, bei denen das Molekül nahezu orthogonal zur Häm-Gruppe angeordnet ist (**Abbildung 39, C**). Damit kann nur noch die β -Methylgruppe mit *Compound I* interagieren. Die Kavität von P450_{LA1} hingegen ist sehr breit und erlaubt mehrere Bindungsmodi. Wie aus experimentellen Daten bekannt ist, resultiert dies in einem ausgeglichenen Verhältnis aller drei Oxidationsprodukte. Interessanterweise können bereits einzelne Aminosäureaustausche (z.B. T283P oder A275F) ausreichen, um mit diesem Proteingerüst große Selektivitätssprünge zugunsten der allylischen Oxidation zu erzielen. Dies ist jedoch nur der Fall, wenn die Selektivität von einem bestimmten Substratbindungsmodus abhängt, was deutlich leichter zu beeinflussen ist. Hängt die zu erreichende Selektivität von der Kontrolle bestimmter Konformation der reaktiven Zwischenstufen ab (Kontrolle von Drehungen um rotierbare Bindungen der Intermediate), so können mit einzelnen Mutationen nur geringe Selektivitätssteigerungen erzielt werden. Als Fazit steht daher fest, dass eine passgenaue Anpassung der aktiven Tasche für Komplexe Reaktionen wie die carbonylselektive Alkenoxidation nur durch Akkumulation mehrerer Aminosäurevariationen möglich ist.

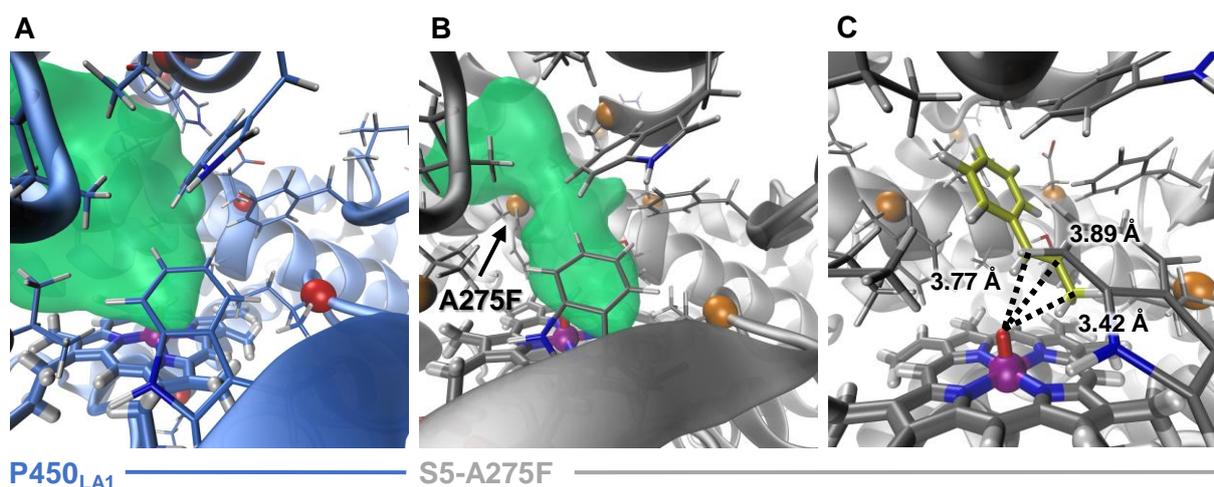


Abbildung 39 – (A/B) Strukturmodelle der Häm-Domänen von P450_{LA1} (blau) und der Variante S5-A275F (grau), die zuvor durch MD-Simulationen optimiert wurden (repräsentativer Mittelwert aus fünf Replikaten mit 1000 ns Simulationszeit). Volumen und Formen der aktiven Zentren sind in grün dargestellt. (C) Docking des Substrats *trans*-β-Methylstyren (*trans*-**14**) in das aktive Zentrum von Variante S5-A275F zeigt, dass das Alken mit der β-Methylgruppe voran in die Kavität eindringt. Abstände zwischen *Compound I* und den nächsten Kohlenstoffatomen des Substrats sind in Ångström (Å) angegeben. Die Simulationen und Abbildungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Marc Gracia-Borràs erstellt und für diese Arbeit neu aufbereitet.

3.2.3. Computergestützte Analyse der evolvierten Ketonsynthase

Insgesamt 18 Aminosäuresubstitutionen ausgehend von P450_{LA1} waren notwendig, damit die ketonselektive Oxidation von *trans*-β-Methylstyren (*trans*-**14**) gegenüber anderen Nebenreaktionen begünstigt katalysiert wird. Um genauer zu verstehen, in wie weit einzelne Aminosäuren oder das gesamte Ensemble Einfluss auf die Substratbindung und die Stabilisierung von Schlüsselintermediaten nehmen, wurden in Kollaboration mit Jordi Soler i Parpal und Dr. Marc Garcia-Borràs (Universität de Girona) computergestützte Analysen zum Vergleich der beiden Enzyme P450_{LA1} und der evolvierten Ketonsynthase durchgeführt.

Zunächst wurden von unseren Kollaborationspartnern DFT-Berechnungen ausgeführt, um den intrinsischen Mechanismus der Metall-Oxo-vermittelte Oxidation von *trans*-β-Methylstyren an einem vereinfachten Modellsystem zu untersuchen. Wie bereits zuvor für Styren (**5**) gezeigt werden konnte (Kapitel 3.1.2.), existieren zwei energetisch vergleichbare Reaktionswege, die im Anschluss an einen gemeinsamen ersten Schritt (Bildung der ersten C-O-Bindung) zum Keton (**16**) oder Epoxid (**15**) führen. Doch obwohl der carbonylselektive Reaktionspfad energetisch zugänglich ist, wird in Experimenten mit synthetischen Katalysatoren eine chemoselektive Epoxidbildung beobachtet.²³⁸ Dies ist eine Folge des dynamischen Verhaltens des radikalischen Intermediats, welches mit überschüssiger Energie gebildet wird. Das schwingungsaktivierte Radikal verfügt über Bewegungsvektoren, die dem Übergangszustand der Epoxidbildung in ihrer

Dynamik ähneln, sodass dieser Reaktionspfad folglich favorisiert wird. Es wird postuliert, dass die Chemoselektivität für die Carbonyl-Bildung durch Konformationskontrolle der Ketonsynthase über reaktive Zwischenprodukte (ein Radikal- sowie Carbokation-Intermediat) begünstigt wird. Daher stellt sich die Frage, wie diese dynamische Kontrolle strukturell erreicht wird und wie alle vorteilhaften Mutationen zusammenwirken, um die Konformationen der reaktiven Intermediate zu kontrollieren.

Als nächstes wurden optimierte Strukturmodelle für das Wildtyp-Enzym und die Ketonsynthase mithilfe der Rosetta Design Software erstellt und durch MD-Simulationen optimiert (jeweils 5 Replikate mit 1000 ns gemittelt). Bei der vergleichenden Betrachtung beider Modelle sind ein paar strukturelle Veränderungen mit hervorstechender Auffälligkeit ersichtlich. Besonders signifikant ist eine veränderte Ausrichtung der $\alpha F''$ -Helix (**Abbildung 40, A**). In diesem Bereich wurden im Verlauf der gerichteten Evolution die meisten Aminosäuresubstitutionen akkumuliert. Das gesamte Strukturelement ist damit nachweislich für die Kontrolle der Keton-Selektivität relevant. Die Strukturanalyse zeigt zudem, dass besonders die beiden Substitutionen H206A ($\alpha F''$ -Helix) und E282D (αI -Helix) für diese Neuausrichtung verantwortlich sind. Durch die Verkleinerung der Seitenketten wurde neuer Raum geschaffen, der beide Helices näher zusammenrücken lässt, folglich die Kavität des aktiven Zentrums verkleinert und zudem die Orientierung der $\alpha F''$ -Helix leicht verändert (**Abbildung 40, B**). Diese Verschiebung sorgt zusätzlich dafür, dass die konservierte Aminosäure W211 ($\alpha F''$ -Helix) tiefer in der Kavität des aktiven Zentrums platziert wird und zu einer weiteren Verkleinerung des Volumens beiträgt (**Abbildung 41, A**). Damit wurde die Bewegungsfreiheit des Substrats sowie der reaktiven Intermediate zunehmend eingeschränkt. An dieser Stelle ist anzumerken, dass bereits in anderen Arbeiten mit P450s gezeigt werden konnte, dass der $\alpha F''$ -Helix sowie dem F/G-Loop ein großer Effekt auf die Ausrichtung der Substrate beigemessen wird und bereits einzelne Mutationen in dieser Region zu signifikanten Selektivitätsänderungen führen können.^{239–242}

Fünf weitere Aminosäuresubstitutionen, gelegen auf der $\alpha B'$ -Helix und dem B'C-Loop, haben ebenfalls einen anteiligen Einfluss auf die neu geschaffene zentrale Kavität der Ketonsynthase. Besonders die Substitution R120Q sorgt dafür, dass die Interaktion mit dem gegenüberliegenden BB'-Loop durch aufbrechen der polaren Wechselwirkung mit Aminosäure E98 stellenweise unterbunden wird (**Abbildung 40, C**). Andererseits wird durch Mutation L111Y eine zusätzliche polare Interaktion mit K99 auf dem BB'-Loop geschaffen. Beide Effekte sorgen gleichermaßen dafür, dass die konservierte Aminosäure L97 (ähnlich wie W211) tiefer in das aktive Zentrum eindringt und ebenfalls zu einer zusätzlichen Reduktion des Volumens beiträgt (**Abbildung 41, A**). Unabhängig hiervon hat auch die Aminosäuresubstitution M274F einen stark raumfordernden Effekt und trägt zur Remodellierung des aktiven Zentrums maßgeblich bei. Diese Aminosäure ist außerdem die einzige, die sich direkt im aktiven Zentrum und in unmittelbarer

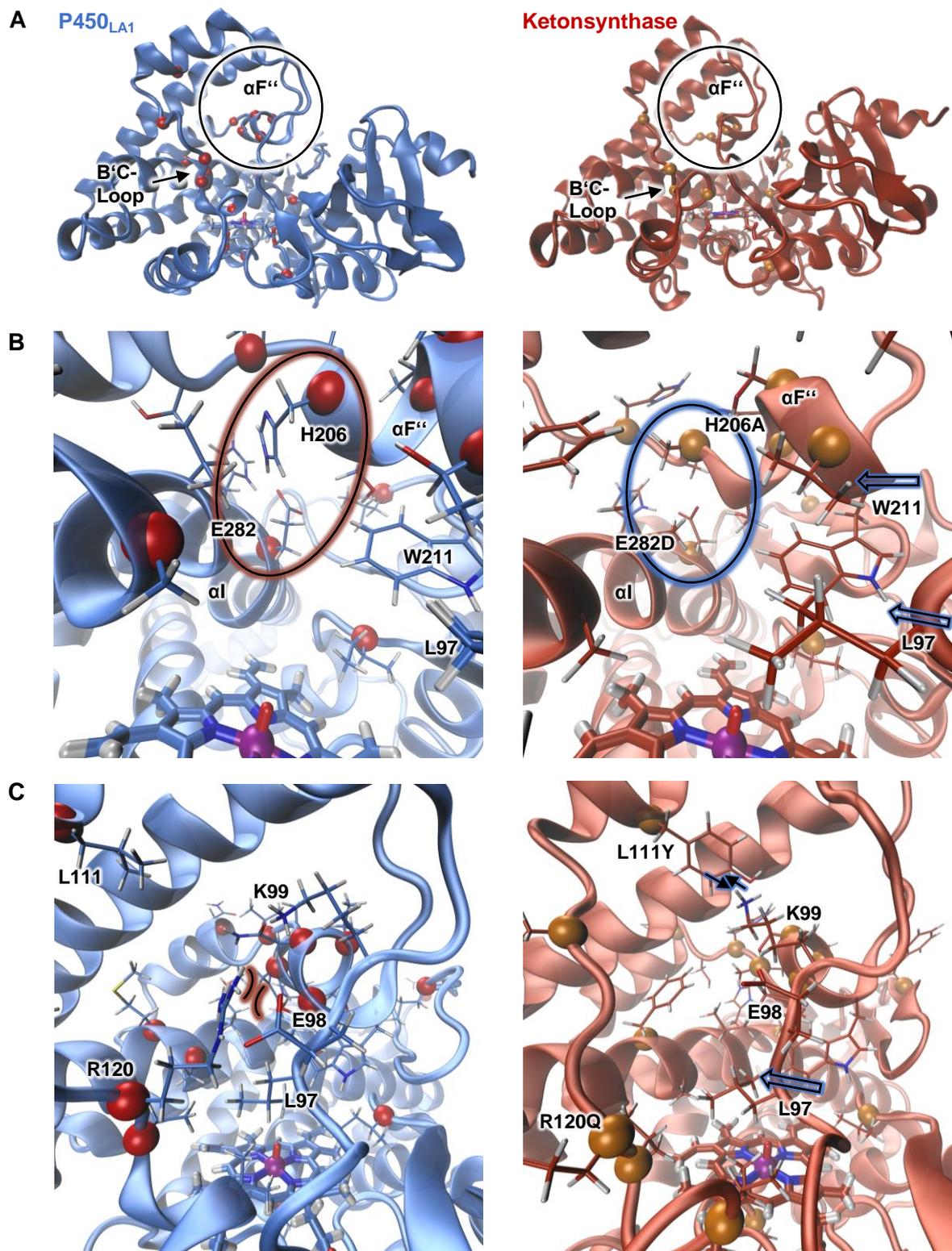


Abbildung 40 – Vergleich optimierter Strukturmodelle von P450_{LA1} und der evolvierten Ketonsynthase, erhalten aus MD-Simulationen. Die Modelle wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Marc Gracia-Borràs erstellt und die erhaltenen Abbildungen für diese Arbeit neu aufbereitet. (A) Die beiden Häm-Domänen im Gesamtvergleich, wobei besonders ausgeprägte strukturelle Änderungen hervorgehoben sind (F/G-Loop bzw. αF''-Helix). (B) Einfluss der Substitutionen H206A und E282D: Die αF''-Helix nähert sich der αI-Helix und verkleinert das aktive Zentrum [eingekreist]. Aminosäure W211 rückt tiefer in die Kavität ein [⇐]. (C) Polare Interaktion zwischen R120Q und E98 wurden gebrochen [](), während L111Y und K99 eine neue Interaktion eingehen [⇔]. Die daraus resultierende Reorientierung des BB'-Loops sorgt dafür, dass L97 tiefer im aktiven Zentrum platziert wird [⇔, auch in (B) gezeigt] und das Volumen der Kavität weiter reduziert wird.

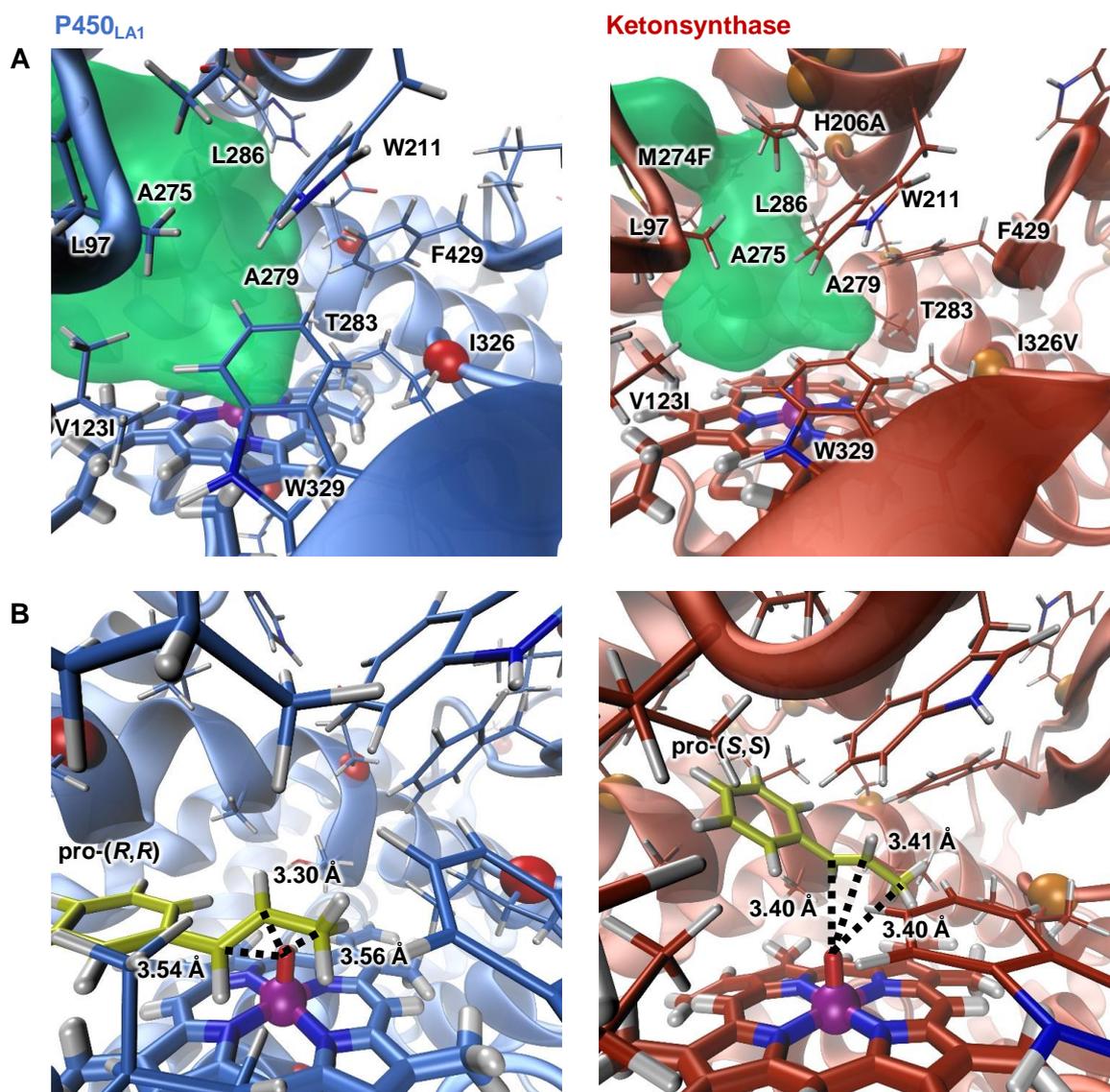


Abbildung 41 – Vergleich repräsentativer Strukturen von P450_{LA1} (blau) und der evolvierten Ketonsynthase (rot). Die Strukturanalyse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Marc Gracia-Borràs und die erhaltenen Abbildungen wurden für diese Arbeit neu aufbereitet. (A) Kavitäten der zu vergleichenden aktiven Zentren (grün). Die Form wird durch die angebenen, flankierenden Aminosäuren determiniert. (B) Docking von *trans*-β-Methylstyren (gelb) in beiden aktiven Zentren. Für P450_{LA1} liegt das Substrat in der meist populierten *pro*-(*R,R*)-Konformation vor, während die Ketonsynthase vorwiegend eine *pro*-(*S,S*)-Orientierung des Substrats kontrolliert. Abstände zwischen *Compound*1 und den nächsten Kohlenstoffatomen des Substrats sind in Ångström (Å) angegeben.

Nähe des Häm-Cofaktors befindet. Auch alle weiteren Aminosäuresubstitutionen, die an dieser Stelle nicht explizit diskutiert werden, haben mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls einen wichtigen strukturellen Einfluss. Dieser kann jedoch nicht eindeutig und kausal anhand der generierten Modelle begründet werden. Insbesondere Substitutionen in der zweiten und dritten Schale sorgen für sehr subtile Änderungen, die ihrerseits Konformationen von Strukturelementen beeinflussen, die in der ersten Schale das aktive Zentrum flankieren.

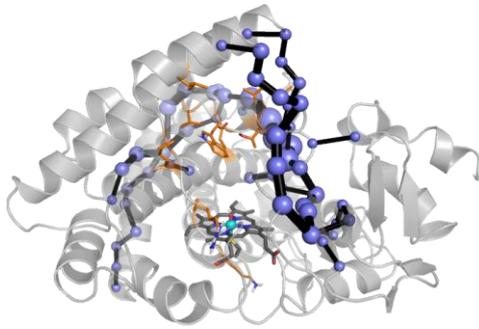
Anhand der erhaltenen strukturellen Informationen aus der vergleichenden Analyse konnte den Aminosäuresubstitutionen H206A und R120Q eine besondere Wichtigkeit zugesprochen werden, da sie sich auf die Positionierung von L97 und W211 im aktiven Zentrum auswirken. Aus diesem Grund wurde für diese beiden Positionen eine kombinatorische Variantenbibliothek erstellt, die beiderseits alle 20 Aminosäuren zulässt. Trotz der generierten Vielfalt (400 mögliche Varianten) konnte kein verbessertes Enzym identifiziert werden, welches von einem vermuteten kooperativen Effekt an diesen Schlüsselpositionen profitiert. Für die Ketonsynthase bedeutet dies, dass bereits ein Optimum an beiden strukturbestimmenden Positionen erreicht wurde.

Neben strukturellen Unterschieden zwischen P450_{LA1} und der Ketonsynthase, wurden von unseren Kollaborationspartnern auch die Wechselwirkungen der aktiven Zentren mit dem Substrat studiert. Es wurde dabei festgestellt, dass die Verengung des aktiven Zentrums durch die gerichtete Evolution mögliche Konformationen des Substrats sowie der reaktiven Intermediate einschränkt und dadurch vermutlich auch die inhärente dynamische Präferenz für die Epoxidbildung aufgehoben wird. Um die Substratbindung in der neu geschaffenen Kavität genauer zu untersuchen, wurden Dockingstudien durchgeführt, die mithilfe von MD-Simulationen in ihrer Aussagekraft verbessert wurden. Bei dieser Vorgehensweise nimmt das Substrat gezielt Angriffskonformationen ein (*near attack conformation*, NAC), die zum gemeinsamen Übergangszustand (ÜZ1) vor der Bifurkation der Reaktionspfade führen. Aus den erhaltenen Daten resultiert, dass *trans*- β -Methylstyren bevorzugt in einer pro-(*R,R*)-Konformation bindet und die Phenylgruppe in etwa parallel zum Häm-Porphyrin ausgerichtet wird (**Abbildung 41, B**). Aufgrund der Größe des aktiven Zentrums sind jedoch auch eine Reihe anderer Bindungsmodi zulässig, da deutlich weniger sterische Restriktionen vorherrschen als im aktiven Zentrum der Ketonsynthase. Im Fall der Ketonsynthase zeichnet sich ab, dass das aktive Zentrum durch die Evolution komplementärer zu *trans*- β -Methylstyren wurde, da vornehmlich eine bestimmte Substrat-Konformation eingenommen wird. Es handelt sich dabei um eine pro-(*S,S*)-Orientierung des Alkens, bei der das Molekül in einem Winkel von circa 20-30° zur Porphyrin-Ebene geneigt bindet. Der Phenylring des Substrats ist aufgrund des Flaschenhalses im oberen Teil des aktiven Zentrums in seiner Bewegung limitiert und favorisiert eine andere Konformation als in P450_{LA1}. Zudem beschreiben die MD-Simulationen der Enzymstrukturen eine stärker gepackte Umgebung des aktiven Zentrums. Diese Präorganisation der Struktur äußert sich zum einen durch die verstärkten Wechselwirkungen zwischen dem in einer Angriffskonformation gebundenen Substrat *trans*-**14** und den Aminosäureresten L97, A121V, W211, A275 und I276 des aktiven Zentrums. Diese Interaktionen könnten wichtig sein, um zu verhindern, dass der Übergangszustand der Epoxidierung (ÜZ2) direkt nach der ersten C-O-Bindung gebildet wird. Andererseits wird eine Versteifung der Reste des aktiven Zentrums beobachtet, was durch die Abnahme der mittleren quadratischen Verschiebungen (RMSF, *root-mean-square fluctuation*) im Vergleich zu den Simulationen im substratfreien Zustand beschrieben wird. Zusammenfassend

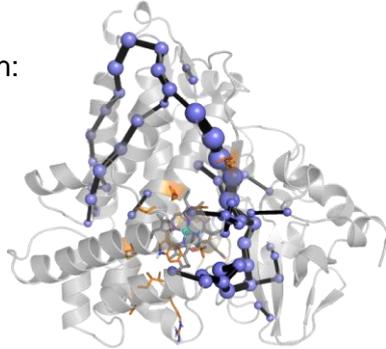
konnte also festgestellt werden, dass das aktive Zentrum der Ketonsynthase im Vergleich zum Wildtyp-Enzym P450_{LA1} nicht nur enger und stärker präorganisiert ist, sondern auch starr ist, was maßgeblich zur Stabilisierung reaktiver Konformation beiträgt. QM/MM-Berechnungen zeigen entsprechend, dass das kovalente radikalische Intermediat (Int1) energetisch barrierefrei zu einem carbokationischen Intermediat (Int2) übergehen kann, um letztendlich das Carbonyl-Produkt hervorzubringen. Die erhaltenen Energien und Intermediat-Konformationen ähneln denen des aMOx-Systems mit Styren (Kapitel 3.1.2.) und werden daher an dieser Stelle nicht im Detail beschrieben.

Um genauer zu verstehen, wie alle 18 eingeführten Mutationen zur Versteifung und Präorganisation des aktiven Zentrums der Ketonsynthase beitragen, wurde das dynamische Verhalten der Enzymstruktur untersucht. Durch diese Analyse war es zudem möglich zu beschreiben, welchen Einfluss Aminosäuresubstitution in der zweiten und dritten Schale auf die finale Struktur der Ketonsynthase ausüben. Dynamische Netzwerke zeigen Korrelationen zwischen Aminosäureresten über große Abstände hinweg, welche die aktiven Struktur-Konformationen von Enzymen stabilisieren.²⁴³ Es wird angenommen, dass sich Veränderungen in den dynamischen Netzwerken direkt auf die Präorganisation des aktiven Zentrums eines Enzyms auswirken können und dass diese Netzwerke durch Einführung anderer Aminosäuren reguliert werden können, selbst wenn diese in großer Entfernung zum aktiven Zentrum liegen.^{243,244} Die Analyse der dynamischen Korrelationen in der Startpunkt-Variante P7E und der Ketonsynthase ergab, dass durch gerichtete Evolution ein erweitertes korreliertes, dynamisches Netzwerk entstanden ist, das die zentrale Kavität vollständig umgibt (**Abbildung 42**). Die Veränderungen im dynamischen Netzwerk des evolvierten Proteins lassen sich auf zahlreiche neue Mutationen zurückführen, die vom aktiven Zentrum weit entfernt sind. Obwohl nur wenige der veränderten Aminosäuren direkt als Knoten im gezeigten Netzwerk erscheinen, sind praktisch alle Mutationen an benachbarten Positionen platziert und damit in engem Kontakt mit dem neu geschaffenen dynamischen Netzwerk. Gemeinsam mit den experimentellen Ergebnissen der gerichteten Evolution zeigen diese computergestützten Daten, dass jede einzelne neu eingebrachte Veränderung in der Aminosäuresequenz der Ketonsynthase eine relevante Rolle spielt, um die Metall-Oxo-vermittelte carbonylselektive Oxidation interner Alkene zu ermöglichen, auch wenn diese aus der Struktur nicht direkt abgeleitet werden kann.

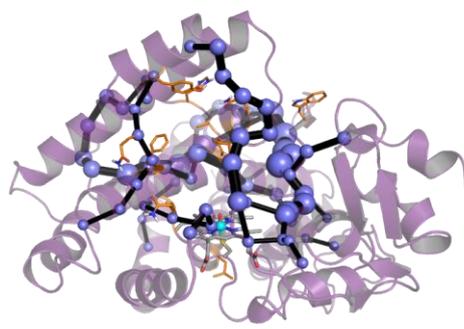
P7E



Von
oben:



Ketonsynthase



Von
oben:

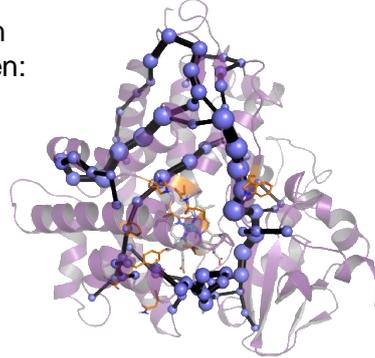


Abbildung 42 – Darstellung dynamischer Netzwerke in MD-optimierten Strukturmodellen der Startpunkt-Variante P7E (grau) und der evolvierten Ketonsynthase (violett). Korrelierte Aminosäure-Netzwerke sind durch sogenannte *shortest path maps* (SPM) visualisiert und sind als violette Sphären (Knoten) gekennzeichnet, die miteinander verbunden sind. In der gerichteten Evolution adressierte und veränderte Aminosäuren sind orange hervorgehoben. Die gezeigten Ergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Marc Gracia-Borràs generiert und die erhaltenen Abbildungen wurden für diese Arbeit neu aufbereitet.

3.2.4. Mechanistische Besonderheiten der evolvierten Ketonsynthase

Die evolvierte Ketonsynthase katalysiert eine direkte Oxidation des internen Alkens *trans*-**14** zu Phenylacetone (**16**). Diese mechanistische Besonderheit der evolvierten Enzymfunktion wurde mithilfe von Kontrollexperimenten bestätigt, indem überprüft wurde, ob nicht möglicherweise das zuvor gebildete Epoxid **15** (2-Methyl-3-phenyloxiran) in einem anschließenden Reaktionsschritt zu Phenylacetone isomerisiert wird. Generell ist bekannt, dass Metall-Porphyrin-Systeme Epoxidierung-Isomerisierung Kaskaden katalysieren können.^{26,245} Wie gezeigt werden konnte, ermöglicht das evolvierte Enzym jedoch keine Isomerisierung von Epoxiden. Jeweils beide Enantiomere von *trans*-2-Methyl-3-phenyloxiran ((*trans*)-**15**) und *cis*-2-Methyl-3-phenyloxiran ((*cis*)-**15**) wurden nicht zu den entsprechenden Ketonen Phenylacetone (**16**) oder Propiophenone (**21**) umgesetzt (**Abbildung 43**).

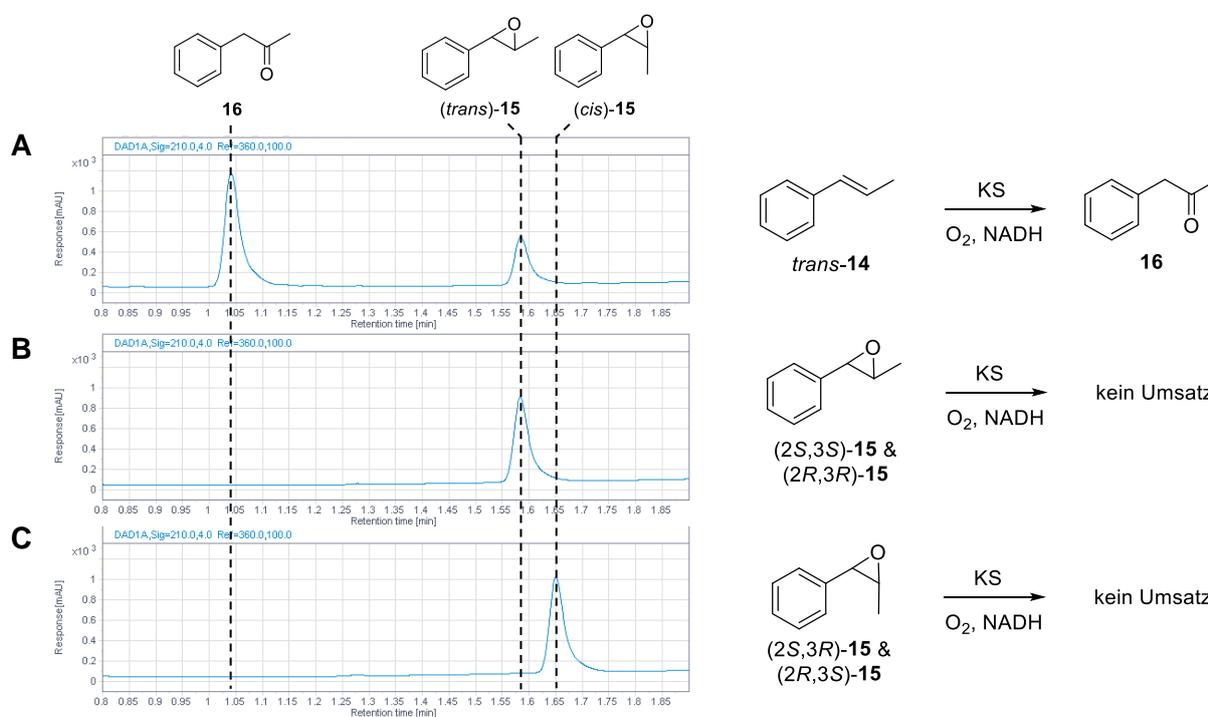


Abbildung 43 – Kontrollreaktionen zeigen, dass weder (**B**) *trans*-Epoxide noch (**C**) *cis*-Epoxide durch die evolvierte Ketonsynthase (KS) umgesetzt werden. Die Oxidation von *trans*-**14** zu Phenylacetone (**A**) verläuft direkt und erfolgt nicht durch Isomerisierung des *in situ* gebildeten Epoxids (**15**).

Hinsichtlich des Mechanismus der Ketonsynthase ist auch eine genauere Betrachtung der konkurrierenden Epoxidierungs-Reaktion sinnvoll. Obwohl diese Reaktivität nur noch einen sehr geringen Anteil der Enzymselektivität ausmacht, konnte beobachtet werden, dass die Enantioselektivität der Epoxidierung im Vergleich zum Wildtyp-Enzym P450_{LA1} zugenommen hat (**Abbildung 44**). Eine ähnliche Beobachtung wurde für aMOx gemacht. Dies deutet darauf hin, dass sich der Bindungsmodus für die Epoxidierung im Laufe der Evolution geändert haben muss und aufgrund der gesteigerten Selektivität zunehmend eingeschränkt wurde. In Kollaboration

durchgeführte Dockingstudien untermauern diese Hypothese. Während *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) in P450_{LA1} präferiert in einer pro-(*R,R*)-Orientierung vorliegt, so ist der am häufigsten populierte Bindungsmodus für die evolvierte Ketonsynthase in einer pro-(*S,S*)-Konformation vorzufinden (**Abbildung 41, B**). Die Eingrenzung der möglichen Substrat-Konformationen führt dazu, dass nicht mehr alle reaktiven Zwischenprodukte gebildet werden können und setzt damit die dynamisch favorisierte Epoxidbildung weitestgehend außer Kraft (siehe Kapitel 3.2.3.). Dies bedeutet, dass die Voraborganisation der reaktiven Intermediate im neu geschaffenen aktiven Zentrum der Ketonsynthase nicht nur zu Gunsten der carbonylselektiven Oxidation erfolgt, sondern auch zur gezielten Diskriminierung des Epoxidierungs-Pfads beiträgt.

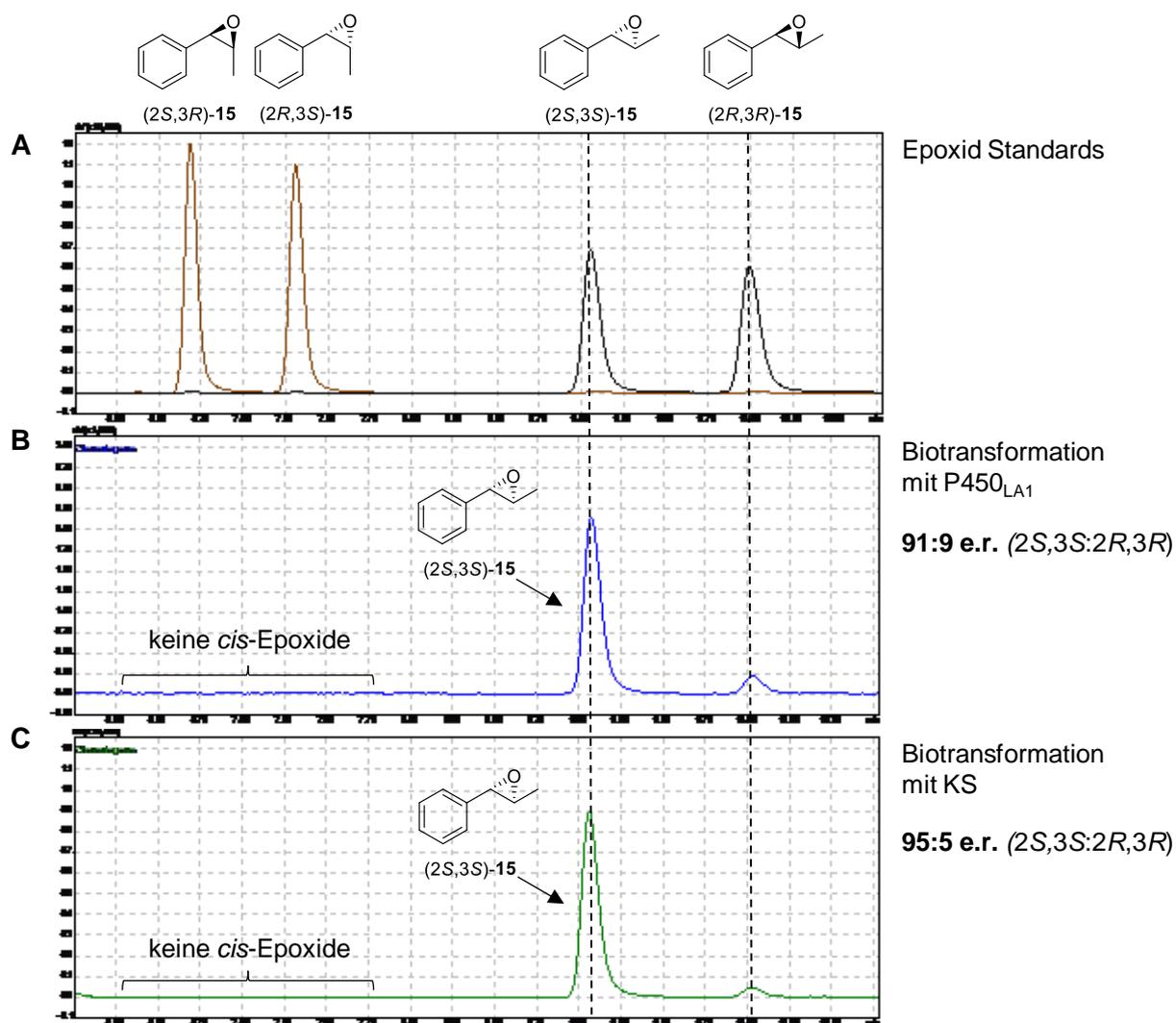


Abbildung 44 – Gaschromatographische Analysen zur Bestimmung der Enantioselektivität der Epoxidierung. **(A)** Chirale Trennung von Epoxid-Standards **15** (*cis*- und *trans*-Epoxid). **(B)** Chirale Analyse von Biotransformationen mit Wildtyp-Enzym P450_{LA1} und **(C)** mit der evolvierten Ketonsynthase. Die berechneten Enantiomerenverhältnisse (e.r.) für das Hauptprodukt (2S,3S)-2-Methyl-3-phenyloxiran sind für beide Enzyme gegeben.

Eine letzte diskussionswürdige Besonderheit des Mechanismus ist die strikte Regiokontrolle der ketonselektiven Alkenoxidation. In hochsensitiven GC/MS-Analysen konnte nach Biotransformation von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) mit der evolvierten Ketonsynthase nur Phenylacetone (**16**) und kein Propiophenon (**21**) als resultierendes Carbonyl identifiziert werden. Eine Erklärung hierfür könnte der zugrunde liegende Mechanismus liefern, welcher über einen gekoppelte Elektronen-/Hydridtransferprozess verläuft (**Abbildung 45**). Während bei der Bildung von Phenylacetone von einem intermediären benzyllischen Carbokation ausgegangen wird, so müsste im regiokomplementären Vorgang ein aliphatisches Carbokation vorliegen. Die größere Stabilität des benzyllischen Carbokations aufgrund seiner Resonanzstabilisierung erklärt, warum dieses Intermediat gegenüber dem anderen bevorzugt auftritt. Andererseits ist es möglich, dass der Bindungsmodus des aliphatischen carbokationischen Intermediats nicht nur aus elektronischen Gründen, sondern aufgrund der Sterik des Enzyms nicht erreicht werden kann. Möglicherweise können im aktiven Zentrum der Ketonsynthase sowie aller getesteten P450_{LA1}-Varianten keine Substrat-Konformationen eingenommen werden, die die Bildung des komplementären Keton-Produkts **21** erlauben. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass die Kontrolle beider Reaktionspfade mit geeigneten Enzymen generell möglich ist. In einer Studie von Guengerich *et al.* wird von einem promiskuitiven P450-Enzym aus Rattenleber berichtet, dass neben der Epoxidierung von *trans*-1-Phenyl-1-buten (**59**) (ca. 70-80% Epoxid-Selektivität) auch die Bildung der beiden Ketone 1-Phenyl-1-butanon und 1-Phenyl-2-butanon zu etwa gleichen Teilen katalysiert (jeweils ca. 10-15% Keton-Selektivität).¹²¹ Dieses Enzym wäre damit ein geeigneter Startpunkt, um zwei Enzyme mit jeweils einer von beiden möglichen Regiopräferenzen zu evolvieren.

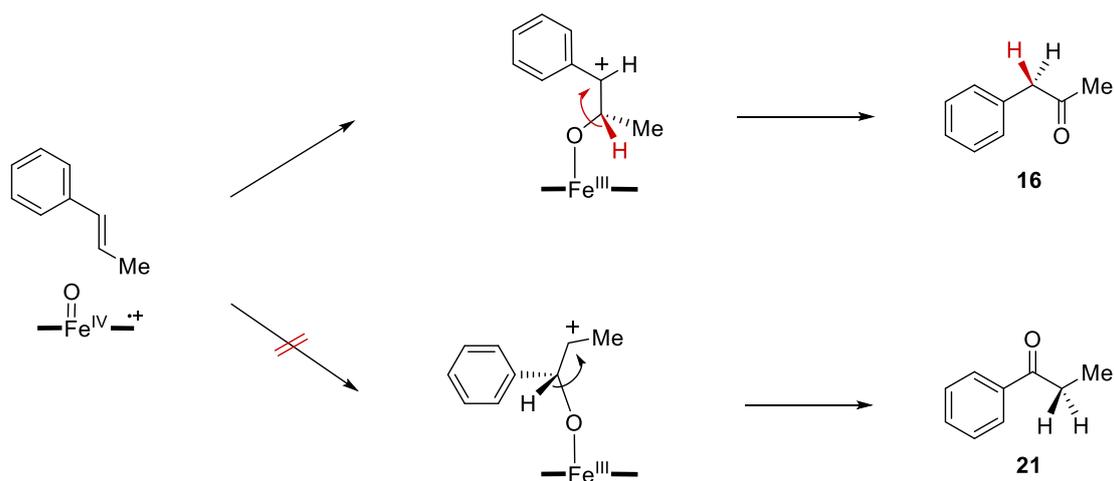


Abbildung 45 – Ausgehend von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) können theoretisch zwei regioisomere Ketone entstehen. In dieser schematischen Darstellung sind beide möglichen Reaktionswege gezeigt, wobei jeweils ein benzyllisches (oben) oder aliphatisches Carbokation (unten) als zentrales Intermediat auftritt. In Biotransformationen mit der evolvierten Ketonsynthase konnte jedoch bisher nur Phenylacetone (**16**) als Folgeprodukt einer Hydridmigration nachgewiesen werden. Propiophenon (**21**) wurde hingegen nicht detektiert, weswegen der untere Reaktionsweg ausgeschlossen werden konnte.

3.3. Anwendungsbreite der evolvierten Ketonsynthase und Limitierungen in der Synthese

Dieses Kapitel widmet sich der Anwendung der evolvierten Ketonsynthase in der Synthese und ist in drei Abschnitte unterteilt. Zunächst wurden Anstrengungen unternommen, um ein möglichst effizientes Reaktionssystem zu etablieren, das zu hohen Produktbildungen führt. Im nächsten Schritt wurde die Substratbreite der Ketonsynthase studiert und viele verschiedene interne Alkene als Substrate eingesetzt. Als Letztes wurde die Ketonsynthase in Kaskadenreaktionen mit weiteren Enzymen kombiniert, um formale regio- und enantioselektive Hydratisierungen und Hydroaminierungen von internen Alkenen im präparativen Maßstab durchzuführen.

3.3.1. Optimierung diverser Parameter zur Steigerung der Produktivität

3.3.1.1. Optimierung der Proteinexpression

Um große Mengen der aktiven Ketonsynthase herzustellen, wurde eine Expressionsstudie durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Variablen verändert, die potenziell positive Auswirkungen auf die Proteinexpression haben können. Einerseits wurde das Gen der Ketonsynthase in drei weitere Vektorsysteme kloniert. Neben dem bisher verwendeten pET-22b(+)-Vektorsystem, wurde ein *low copy* Plasmid (pACYC) sowie ein pBAD33-Konstrukt zur Expression eingesetzt. Letzteres führte für ein anderes P450-Enzym (CYP153A_{M.aq}) zu sehr guter Überexpression.²⁴⁶ Auch ein pCWori-Konstrukt wurde erstellt und getestet. Dieser Vektortyp wurde in der Vergangenheit sehr häufig zur Expression von P450-Enzymen eingesetzt und führte aufgrund seiner Architektur (insgesamt drei Promotoren) zu ebenfalls sehr guten Ergebnissen.²⁴⁷⁻²⁴⁹ Jedes der vier erstellten Vektorsysteme wurde in unterschiedliche kompatible Expressionsstämme transformiert. Die pET-, pACYC- und pCWori-Konstrukte wurden jeweils mit *E. cloni*[®] EXPRESS BL21(DE3), *E. coli* BLR pLysS und *E. coli* Arctic Express kombiniert. Während die Expression in allen Fällen unter Standardbedingungen erfolgte (18°C, 20 h), so wurde die Expression in *E. coli* Arctic Express bei einer niedrigen Temperatur von 12°C durchgeführt. Grund hierfür ist, dass in diesem System Chaperone co-exprimiert werden, die bei der Proteinfaltung helfen, indem sie eine hydrophile Umgebung schaffen.²⁵⁰ Gemeinsam sollten diese Faktoren dafür sorgen, dass P450-Enzyme richtig gefaltet werden (keine Bildung von *inclusion bodies*) und der Häm-Cofaktor korrekt eingebaut wird.^{247,251} Für die Expression mit pBAD33 wurde der Arabinose-defiziente Stamm BW25113 eingesetzt. Die Ergebnisse der Expressionsstudie sind in **Abbildung 46** qualitativ dargestellt.

Zur Evaluierung des Expressionssystems wurde die Enzymkonzentration des Lysats mittels CO-Differenzspektroskopie quantifiziert. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei für das bisher verwendete System (pET-22b in *E. cloni*®) und pET-22b in *E. coli* Arctic Express ermittelt. Der Einsatz in Biotransformationen zeigte, dass beide Enzyme dieselbe Aktivität aufweisen und die Qualität der Proteine damit in beiden Fällen vergleichbar ist. Aufgrund der niedrigen Expressionstemperatur wurde für *E. coli* Arctic Express jedoch eine deutlich geringere Zellmenge generiert, was die Proteinproduktion etwas ineffizienter ausfallen ließ. Eine etwas verringerte Überexpression wurde im Allgemeinen mit dem pACYC-Vektor beobachtet. Für *E. coli* BLR pLysS konnten nur sehr geringe Mengen der Ketonsynthase nachgewiesen werden. Die Vektoren pBAD33 und pCWori führten in keinem der erprobten Stämme zu einer Überexpression. Es ist anzumerken, dass alle getesteten Konstrukte zuvor durch Sequenzierung überprüft wurden und alle korrekt kloniert vorlagen. Aufgrund der erhaltenen Daten wurde daher das bisher verwendete Expressionssystem (pET-22b in *E. cloni*®) weiterhin eingesetzt.

Stamm \ Vektor	<i>E. cloni</i> ®	BLR pLysS	Arctic Express	BW25113
pET-22b(+)	Überexpression	Geringe Expression	Überexpression	Nicht kombiniert
pACYC	Überexpression	Geringe Expression	Geringe Expression	Nicht kombiniert
pCWori	Keine Expression	Keine Expression	Keine Expression	Nicht kombiniert
pBAD33	Nicht kombiniert	Nicht kombiniert	Nicht kombiniert	Keine Expression

Überexpression
 Geringe Expression
 Keine Expression
 Nicht kombiniert

Abbildung 46 – Übersicht der getesteten Bedingungen zur Expression der evolvierten Ketonsynthase mittels verschiedener Expressionsvektoren in unterschiedlichen Expressionsstämmen. Die Überexpression (Enzymkonzentration im Lysat) wurde durch CO-Differenzspektroskopie ermittelt und die Enzymaktivität in Biotransformationen unter Standardbedingungen verifiziert. Eine farbige Markierung gibt qualitative Auskunft über das Ausmaß der Proteinexpression.

Nachdem das beste Vektorsystem und der beste Expressionsstamm ermittelt werden konnte, wurde die Expressionsstudie fortgeführt. Dazu wurden diverse Parameter der Expression variiert, die bekanntermaßen zu Verbesserungen führen können (**Tabelle 5**).²⁴⁷ Eine *leaky* Expression, wobei auf die Induktion mit IPTG verzichtet wurde, führte zu keiner Überexpression. Auch die Supplementierung des Nährmediums mit Fe³⁺ führte zu keiner Verbesserung des Expressionslevels und die Aktivität des resultierenden Enzyms blieb auf demselben Niveau. Durch Verlängerung des Expressionszeitraums von 20 h auf 48 h oder 72 h konnte annähernd die doppelte Zellmenge generiert werden. Die Zellen zeigten eine deutliche Blaufärbung auf, was auf die Bildung von Indigo hindeutete. Dieser Farbstoff entsteht durch die Oxidation von Indol durch P450-Enzyme in *E. coli*.²⁵² Da Indol zu einer Überlagerung von Phenylacetone (**16**) in chromato-

graphischen Analysen von Biotransformationen führte, wurden längere Expressionszeiten ausgeschlossen. Stattdessen wurde untersucht, welchen Einfluss niedrige Temperaturen auf die Expression haben. Dazu wurde die Expressionstemperatur von 25°C auf 18°C verringert. Obwohl niedrige Temperaturen auch zu verbesserten Proteinfaltungen führen können,²⁵¹ konnte in Biotransformationen keine gesteigerte Enzymaktivität bestätigt werden. Aufgrund der höheren Sauerstoffsättigung im Nährmedium als Folge der verringerten Temperatur, wurde jedoch geringfügig mehr Zellmasse generiert.²⁵³ Daher wurde die Expression der Ketonsynthase zukünftig bei einer Temperatur von 18°C durchgeführt.

Tabelle 5 – Übersicht der getesteten Bedingungen zur Verbesserung der Proteinexpression und zur Aktivitätssteigerung der generierten Ketonsynthase. Der beobachtete Effekt auf die Überexpression (ermittelte Enzymkonzentration im Lysat), die erhaltene Zellmasse sowie die ermittelte Enzymaktivität in Biotransformationen unter Standardbedingungen (normiert auf die Enzymkonzentration) sind jedem veränderten Parameter zugeordnet.

Veränderter Parameter	Beobachteter Effekt
Expression ohne Induktion mit IPTG (<i>leaky expression</i>)	Keine Überexpression (keine Enzymaktivität)
Zugabe von FeCl ₃ (50 µM)	Keine Verbesserung des Expressionslevels sowie der Enzymaktivität
Expression für 48 h	Mehr Zellmasse, aber verstärkte Bildung von Indol (gleiche Enzymaktivität)
Expression für 72 h	Mehr Zellmasse, aber verstärkte Bildung von Indol (gleiche Enzymaktivität)
Expression bei einer Temperatur von 18°C	Geringfügig mehr Zellmasse (gleiche Enzymaktivität)

3.3.1.2. Optimierung von Reaktionsparametern

Zur Steigerung der Effizienz der Ketonsynthase in Biotransformationen wurden diverse Parameter variiert. Als Maß für die Enzymaktivität wurden *total turnover number* (TTN) nach 2 h Reaktionszeit unter Einsatz einer definierten Enzymmenge ermittelt und untereinander verglichen. Die getesteten Reaktionsparameter und der beobachtete Effekt auf die Enzymaktivität sind in **Tabelle 6** qualitativ angegeben.

Damit jedes Enzymmolekül mit dem benötigten Häm-Cofaktor beladen vorlag, wurde Hemin zur Lyse supplementiert. Resultate aus Biotransformationen zeigten jedoch, dass dadurch keine Verbesserung der Enzymaktivität erzielt werden konnte. Auch eine schrittweise Zugabe des Substrates *trans-14* oder der Ketonsynthase in regelmäßigen Zeitabständen führte zu keiner gesteigerten Produktbildung. Eine Substratinhibierung oder stetige Inaktivierung des Enzyms wurden daher auf Grundlage dieser Beobachtung als unwahrscheinlich erachtet. Auch die Vermutung, dass *in situ* gebildetes H₂O₂ zu einer stetigen Enzyminaktivierung führt, konnte nicht

bestätigt werden. Zum Ausschluss dieses Effekts wurden Biotransformationen unter Zugabe von Katalase durchgeführt, welche durch Entkopplung entstandenes H₂O₂ zu molekularem Sauerstoff und Wasser umsetzt. Beim Einsatz von gereinigtem Enzym in Biotransformationen wurde festgestellt, dass die Enzymaktivität durch den Reinigungsschritt vermindert wurde. Die Ursache hierfür kann jedoch nicht genau benannt werden. Es wird vermutet, dass eine oxidative Zersetzung des Eisen-Schwefel-Clusters unter den gewählten Bedingungen stattfinden kann, was folglich zur Inaktivierung des gereinigten Enzyms führt. Interessanterweise wurde *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) auch in Biotransformationen mit ganzen Zellen zu Phenylaceton (**16**) umgesetzt, wenn auch nur mit mäßiger Aktivität. Andererseits wurde deutlich weniger Epoxid **15** detektiert, welches möglicherweise durch *E. cloni*[®] verstoffwechselt wurde oder eine Nebenreaktion eingegangen war. Dies zeigt, dass mit der evolvierten Ketonsynthase Ganzzellkatalyse möglich ist und dieser Ansatz bei Bedarf weiterverfolgt werden könnte.

Tabelle 6 – Übersicht getesteter Reaktionsbedingungen und deren Einfluss auf die Enzymaktivität oder Produktbildung. Abgesehen von dem veränderten Parameter wurden die Biotransformationen unter Standardbedingungen (**Tabelle 22**) bei gleicher Katalysatorbeladung durchgeführt. Die relative Aktivität der Ketonsynthase unter veränderten Bedingungen im Vergleich zu Standardbedingungen wurde anhand der ermittelten TTN für Phenylaceton berechnet und sind in Klammern angegeben.

Reaktionsparameter	Beobachteter Effekt (relative Aktivität)
Zugabe von Hemin zur Zellyse	Keine verbesserte Enzymaktivität (103% rel. Akt.)
Schrittweise Zugabe des Substrats	Keine Steigerung der Produktbildung (94% rel. Akt.)
Schrittweise Zugabe von Lysat	Keine Steigerung der Produktbildung (92% rel. Akt.)
Zugabe von Katalase	Keine Steigerung der Produktbildung (97% rel. Akt.)
Biotransformation mit gereinigter Ketonsynthase	Drastischer Aktivitätsverlust des Enzyms (5% rel. Akt.)
Biotransformationen mit ganzen Zellen (unter Zugabe von Glucose)	Produktbildung in mäßigem Umfang beobachtet (deutlich weniger Epoxid detektiert; relative Aktivität konnte nicht bestimmt werden)

Der Faktor mit dem erwiesenermaßen größten Einfluss auf die Produktbildung ist die Reaktionszeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Ketonsynthase-katalysierte Reaktion auch nach 2 h Reaktionszeit immer noch abläuft. Um auch nach längeren Reaktionszeiten die Versorgung mit dem benötigten Cofaktor NADH zu gewährleisten, wurde ein Cofaktor-Regenerationssystem eingesetzt. Dies umfasste eine Glucosedehydrogenase (GDH), die unter Oxidation von D-Glucose je ein Molekül NAD⁺ zu NADH reduzierte. Erst nach ungefähr 48 h kam es unter diesen Bedingungen zu keiner weiteren Bildung von Phenylaceton (**16**) und der konkurrierenden Oxidationsprodukte **15** und **17** (**Abbildung 47**). Das bedeutet, dass das Protein gegenüber Alkylierung oder Inaktivierung durch Denaturierung deutlich resistenter ist als ursprünglich angenommen. Nach 20 h Reaktionszeit wurde eine stetige Abnahme des gebildeten Epoxids

beobachtet. Entweder unterläuft das Epoxid eine Nebenreaktion mit anderen Metaboliten des Lysats, beziehungsweise dem Protein selbst (nukleophile Ringöffnung) oder das Molekül wird P450-katalysiert umgesetzt (Anhang 7.2., **Abbildung 56**). Daher wurden alle im Rahmen dieser Arbeit angegebenen Keton-Selektivitäten nach 2 h berechnet, da sich die Produktbildung des Ketons **16** als auch des Epoxids **15** in einem linearen Bereich befinden. Erst nach längeren Reaktionszeiten (>2 h) verändert sich die berechnete Keton-Selektivität zeitabhängig und steigt stetig mit zunehmender Epoxid-Abnahme.

Durch Ausweitung der Reaktionszeit und Einsatz der GDH ließen sich nach 48 h bis zu 4750 TTN für Phenylacetone (**16**) erreichen. Die Aktivität der Ketonsynthase übersteigt damit die Produktivität chemischer Katalysatoren für dieselbe Reaktion um mehr als das 200-fache.^{15,207} Damit diese biokatalytische Oxidation auch im präparativen Maßstab angewendet werden konnte, wurden Parameter bestimmt, die zum Vollumsatz des eingesetzten Alkens führten. Dazu wurde die Substratbeladung in Biotransformationen ausgehend von 5 mM graduell verringert, bis ein vollständiger Umsatz nach 48 h beobachtet werden konnte. Dies war für eine Substratbeladung von 2 mM erreicht. All diese ermittelten Bedingungen in ihrer Gesamtheit wurden für spätere *Scale-Ups* übernommen.

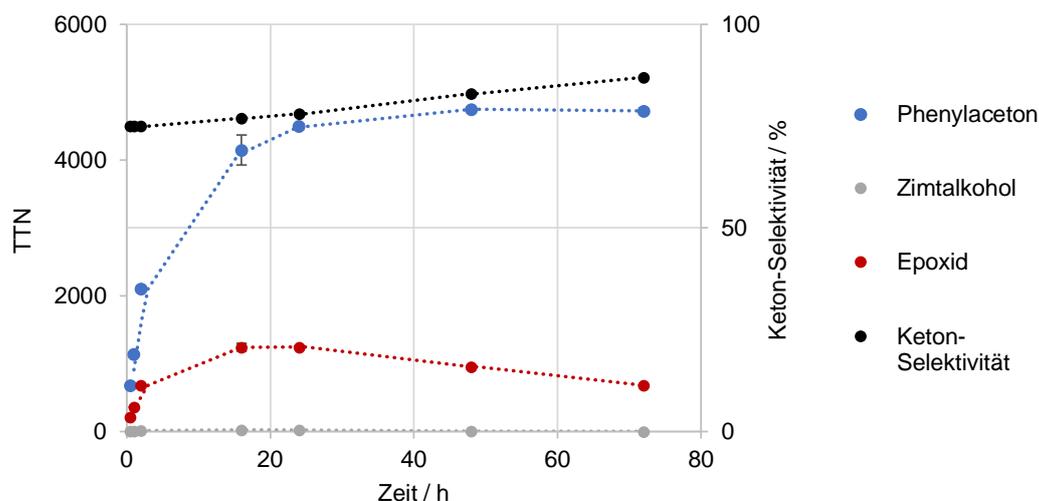


Abbildung 47 – Zeitlicher Verlauf der Produktbildung nach 30 min, 1 h, 2 h, 18 h, 24 h, 48 h und 72 h für Biotransformationen mit der evolvierten Ketonsynthase unter Einsatz eines Cofaktor-Regenerationssystems. Die ermittelten TTN für alle Oxidationsprodukte sowie die berechneten Keton-Selektivitäten zu jedem Zeitpunkt sind aufgetragen. Reaktionsparameter: 0.625 μ M Ketonsynthase, 5 mM *trans*- β -Methylstyren, 12.5 Vol% GDH-Lysat, 20 mM D-Glucose und 0.5 mM NAD.

3.3.2. Ergründung der Substratbreite

Um das Anwendungspotenzial und die Limitierungen der Ketonsynthase in der Synthese zu verstehen, wurde die Substratbreite (*substrate scope*) mit verschiedenen substituierten Alkylstyrenen untersucht. Da nicht alle getesteten internen Alkene kommerziell verfügbar waren,

wurden diese auf drei verschiedenen Synthesewegen synthetisiert (**Abbildung 48, A, B, C**). Zum Einen erfolgte die Darstellung von *trans*-Alkylstyrenen durch Dehydratisierung der entsprechenden 1-Phenyl-1-propanol-Derivate, die ihrerseits aus Benzaldehyd-Derivaten hergestellt wurden.^{254,255} Weitere Alkylsubstrate wurden durch Anwenden einer neuartigen *One-Pot*-Methode²⁵⁶ oder mittels Wittig-Olefinierung²⁵⁷ generiert. Zur Berechnung von Keton-Selektivitäten war es notwendig auch Produktbildungen der Epoxidierung und der allylischen Oxidation zu kennen. Da auch für diese Verbindungsklassen nicht alle Moleküle kommerziell bezogen werden konnten, wurden einige Epoxide durch Prilezhaev-Epoxidierung der jeweiligen internen Alkene synthetisiert (**Abbildung 48, D**).²⁵⁸ Reduktion der entsprechenden *trans*-Zimtaldehyd-Derivate mit Natriumborhydrid lieferte die benötigten *trans*-Zimtalkohole (**Abbildung 48, E**).²⁵⁹ Alle Verbindungen wurden in guten Ausbeuten mit exzellenter Reinheit erhalten und die Identität per ¹H-/¹³C-NMR sowie massenspektrometrisch bestätigt.

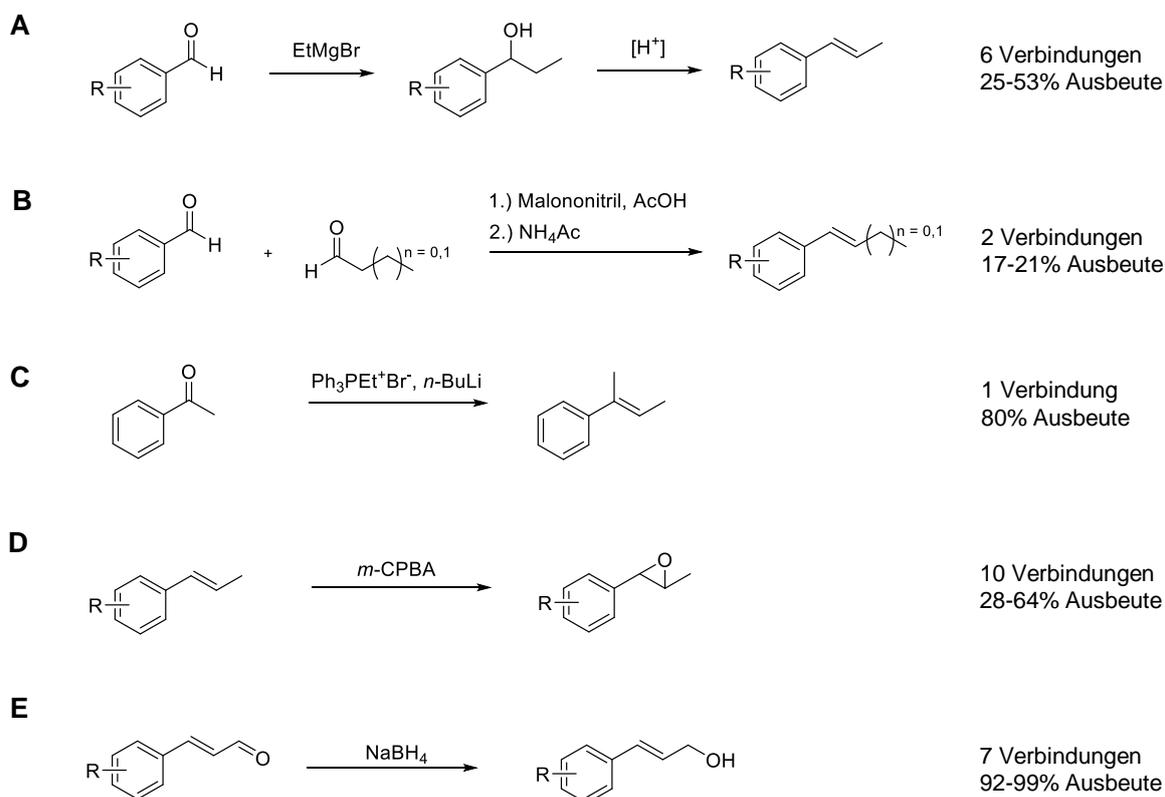


Abbildung 48 – (**A, B, C**) Synthesestrategien zur Darstellung von Alkylstyrenen, die als Substrate in Biotransformationen mit der evolvierten Keton synthase eingesetzt wurden. (**D**) Einige Epoxidstandards und (**E**) *trans*-Zimtalkohol-Derivate wurden ebenfalls synthetisiert, um die Berechnung von Keton-Selektivitäten zu ermöglichen. Die Anzahl der mit der jeweiligen Methode synthetisierten Derivate sowie die erzielten Ausbeuten sind angegeben.

Insgesamt neun weitere *trans*-Alkylstyren-Derivate konnten von der Keton synthase unter Bildung des entsprechenden Ketons umgesetzt werden (**Abbildung 49**). Mit diversen *para*-substituierten β -Alkylstyrenen wurden hohe bis mäßige Aktivitäten ermittelt. Für *para*-Bromo-

und *para*-Chloro-substituierte Derivate konnten sogar höhere Keton-Selektivitäten (Produkte **22** & **23**) als für das Mustersubstrat *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) bestimmt werden. Substitutionen in *ortho*-Stellung wurden ebenfalls toleriert, wobei die Selektivitäten und Aktivitäten etwas geringer ausfielen (Produkt **24**). Als weniger geeignete Substrate mit schlechten Selektivitäten und Aktivitäten sind dagegen *meta*- sowie Methoxy-substituierte Alkene einzuordnen (Produkte **25** & **28**). Auch für *trans*- β -Ethylstyren konnte gezeigt werden, dass moderate Umsätze und mittelmäßige Keton-Selektivitäten erreichbar sind und sterisch anspruchsvollere β -Substitutionen akzeptiert werden (Produkt **29**). Der Einsatz von *trans*- α,β -Dimethylstyren (*trans*-**37**) ermöglichte die Synthese des chiralen Ketons (*S*)-**30** mit guter Enantioselektivität, wenn auch mit geringer Aktivität. In allen Fällen wurde ohne Ausnahme dieselbe Regioselectivität für die Ketonbildung beobachtet.

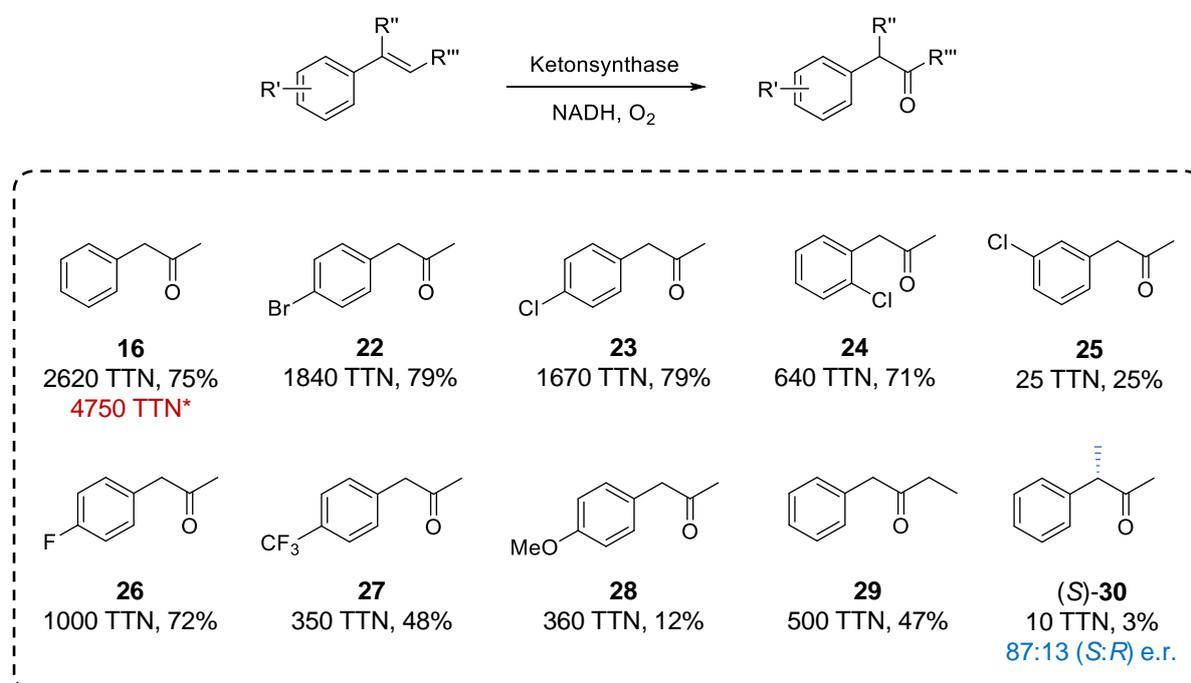


Abbildung 49 – Substratspektrum der Ketonsynthase. Die Reaktionen wurden mit 0.625 μ M Ketonsynthase, 5 mM des entsprechenden *trans*-Alkylstyren-Derivats und 5 mM NADH-Cofaktor durchgeführt. Die Gesamtumsatzzahlen pro Enzymmolekül (TTN) wurden nach 2 h Reaktionszeit bestimmt und die Keton-Selektivitäten wurden wie folgt bestimmt: Keton / (Keton + Epoxid + Zimtalkohol). Für chirale Moleküle wurde das Enantiomerenverhältnis (e.r.) angegeben. *Maximale TTN wurde nach 48 h Biotransformation in Kombination mit einem Cofaktor-Regenerationssystem ermittelt.

Alkylstyrene mit α -Substitution sind besonders interessante Substrate, da hierfür asymmetrische Keton-Oxidationen möglich sind. Es ist hervorzuheben, dass katalytische, asymmetrische Oxidationen von internen Alkenen zu chiralen Ketonen derzeit unbekannt sind. Die Stereoselektivität wird durch enantiofaciale Diskriminierung bei der 1,2-Hydridmigration erreicht. Analog zu der in Kapitel 3.1.1.2. untersuchten Deuteridmigration wird auch in diesem Fall von einer Migration des *cis*-Hydrids über die *re*-Seite des carbokationischen Intermediats ausgegangen (**Abbildung 50**). Die ermittelte Enantioselektivität von 87:13 (*S*:*R*) zu Gunsten des

(*S*)-Enantiomers reiht sich mit den Ergebnissen ein, die für *cis*-Styrol- β -*d* (**2**) und α -Methylstyren mit aMOx ermittelt wurden. Ebenso wird ein kleiner Anteil des enantiokomplementären Produkts detektiert (circa 10%), was auf eine partiell unselektive Hydridmigration oder Tautomerisierung des Intermediats hinweisen könnte. Auch wenn die evolvierte Ketonsynthase nur wenige Turnover (10 TTN) dieser asymmetrischen Oxidation ermöglicht, eröffnet diese neuartige Transformation Zugang zu chiralen Verbindungen in nur einem Reaktionsschritt. Eine Literaturrecherche zeigt, dass für die Synthese von (*S*)-3-Phenylbutan-2-on mit herkömmlichen Methoden mehrere Syntheseschritte sowie deutlich komplexere Ausgangsverbindungen benötigt wurden oder chromatographische Trennungen vorgenommen wurden.^{260–262} Eine weitere evolutive Anpassung der Ketonsynthase in Richtung dieser Substratklasse könnte daher einen Lösungsansatz für weitere schwierige Transformationen in der organischen Synthese darstellen.

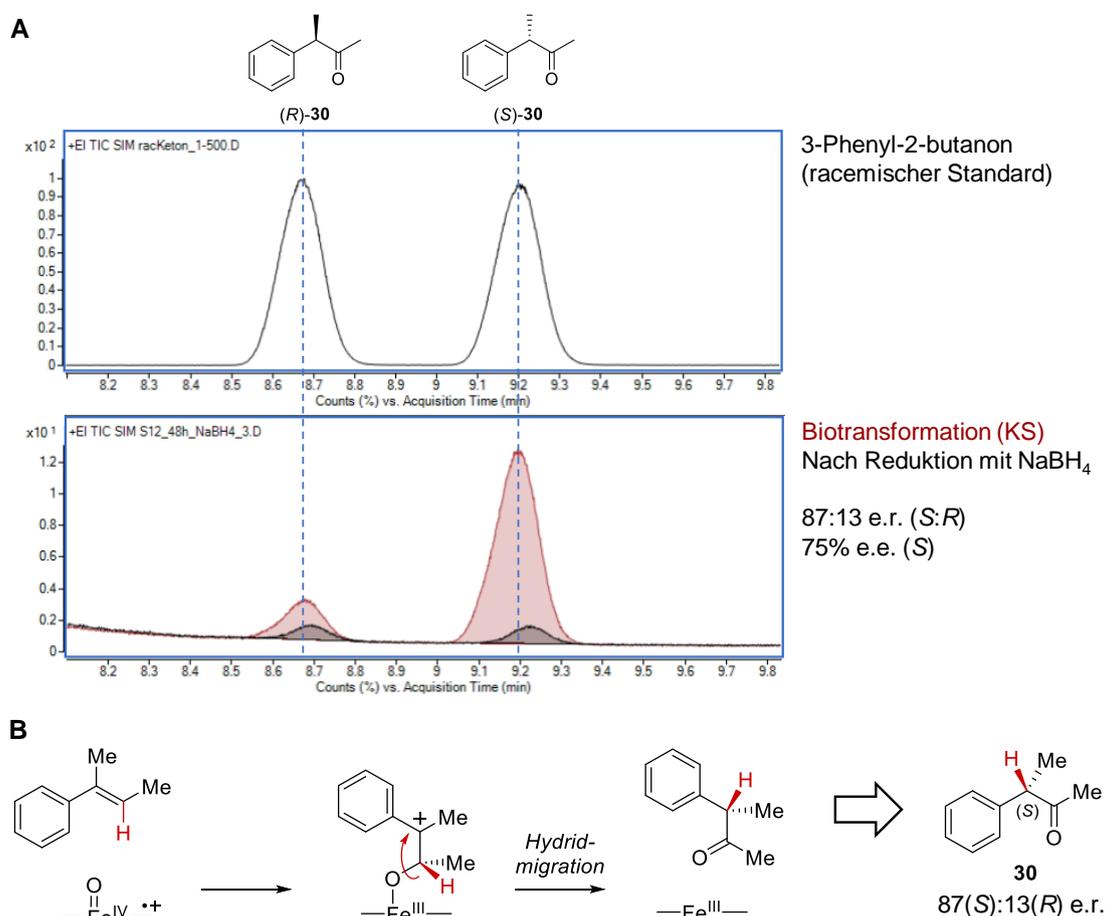


Abbildung 50 – (A) Chirale GC-Analyse eines racemischen Standards von 3-Phenylbutan-2-on (**30**, oben) sowie einer Biotransformation von *trans*- α,β -Dimethylstyren (*trans*-**37**) mit der evolvierten Ketonsynthase (KS, unten, rot) unter optimierten Reaktionsbedingungen (48 h, mit GDH). Um das Enantiomerenverhältnis aus dem Integralverhältnis zu bestimmen, wurde der Anteil des durch thermische Isomerisierung auf dem GC-Split-Liner gebildeten Ketons subtrahiert (unten, schwarz). Eine reale Bewertung des isomerisierenden Epoxids konnte vorgenommen werden, indem das in Biotransformationen gebildete Keton vor der Extraktion durch Zugabe von Natriumborhydrid (ca. 1 mg) reduziert wurde. Die Menge des gebildeten Epoxids bleibt durch diese Behandlung unverändert. Das berechnete Enantiomerenverhältnis (e.r.) und der Enantiomerenüberschuss (e.e.) sind gegeben. Die Zuordnung der beiden Enantiomere erfolgte wie in Anhang 7.3. (Abbildung 58) beschrieben. (B) Postulierter Mechanismus der asymmetrischen Keton-Oxidation. Es findet eine enantiofaciale Migration des *cis*-Hydrids statt, was zur hauptsächlichen Bildung des (*S*)-Enantiomers führt.

Das Substratspektrum der evolvierten Ketonsynthase ist nicht beliebig erweiterbar. So wurden unter anderem auch Substrate getestet, die überhaupt nicht umgesetzt wurden oder schlicht zu keiner Ketonbildung führten (**Abbildung 51**). Beispielsweise konnten Substrate mit sehr polaren oder sterisch anspruchsvollen Arylsubstitutionen (**31** & **32**) nicht umgesetzt werden. Der Einsatz von (*Z*)-(1-Chlorprop-1-en-1-yl)benzen (**33**) in Biotransformationen führte zwar zu einer Produktbildung, jedoch nicht zum erwarteten chiralen Keton. Stattdessen wurden Spuren von 1-Hydroxy-1-phenylpropan-2-on identifiziert (ermittelt mittels GC/MS und übereinstimmender Vergleich mit Massenspektren aus der NIST-Datenbank), was auf eine Hydrolyse des Oxidationsprodukts oder eines bestimmten Intermediats hinweist. Auch *cis*-konfigurierte interne Alkene wie *cis*-**14** ließen sich durch die evolvierte Ketonsynthase umsetzen. Bei den ermittelten Produkten handelte es sich jedoch nur um das allylische Oxidationsprodukt und die beiden *cis*- und *trans*-Epoxide (Anhang 7.3., **Abbildung 59**). Phenylaceton (**16**) wurde nicht gebildet. Das bedeutet, dass der ketonselektive Mechanismus für dieses Substrat nicht zugänglich ist. Wie aus mechanistischen Studien bekannt wurde, ist ein Hydridtransferprozess des *cis*- β -Hydrids zur Erzeugung von Ketonen notwendig. Da Hydrid-Gruppen im Vergleich zu anderen Gruppen eine deutlich höhere Migrationstendenz aufweisen, wird davon ausgegangen, dass eine Migration der *cis*-Methylgruppe nicht erfolgen kann.

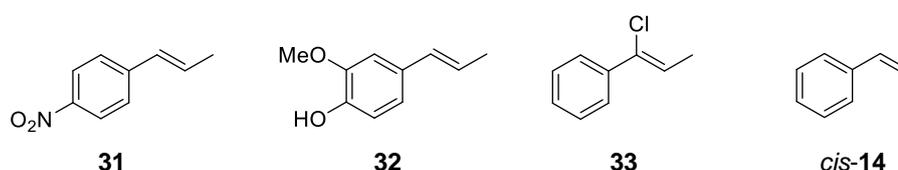


Abbildung 51 – Übersicht weiterer getesteter Substrate, die durch die Ketonsynthase nicht zum gewünschten Keton umgesetzt werden konnten.

Die gesammelten Erkenntnisse zeigen, dass die Anwendungsbreite der Ketonsynthase auch Limitierungen ausgesetzt ist. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten ausschließlich *trans*-Alkylstyren-Derivate zum gewünschten Keton mit absoluter Regiokontrolle umgesetzt werden. Ob aliphatische Substrate ohne Aromaten oder komplexere interne Alkene durch dieses Enzym umgesetzt werden können, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Nur zwei literaturbekannte chemische Katalysatorsysteme für die carbonylselektive Oxidation interner Alkene weisen ein größeres Substratspektrum auf, das auch zyklische, konjugierte sowie *cis*-Alkene umfasst.^{31,38} Dennoch ist erwähnenswert, dass die Ketonsynthase bezüglich der getesteten Derivate und der ermittelten TTN deutlich besser abschneidet als chemische Katalysatoren. Während beispielsweise viele Alkylstyren-Derivate mit einem dual-photokatalytischen Ansatz nur mit geringen katalytischen Produktivitäten (>30 TTN, siehe **Abbildung 3, D**) umgesetzt werden können, weist die hier gezeigte enzymatische Methode Werte auf, die um ein bis zwei

Größenordnungen höher sind.³⁸ Nachteil bleibt jedoch, dass mit der Ketonsynthase in jedem Fall weiterhin geringe Mengen der entsprechenden Epoxide und allylischen Oxidationsprodukte gebildet werden, was für chemisch-katalytische Methoden nicht beobachtet wird.

3.3.3. Anwendung in Kaskaden und im präparativen Maßstab

Um eine mögliche Anwendung der Ketonsynthase in der organischen Synthese zu demonstrieren, wurde zunächst die Oxidation des internen Alkens *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) im präparativen Maßstab (1.00 mmol) durchgeführt. Unter optimierten Bedingungen (siehe Kapitel 3.3.1.) und mit einer geringen Katalysatorbeladung von 0.025 mol% der Ketonsynthase konnte Phenylacetone (**16**) mit einer Ausbeute von 61% isoliert werden (**Abbildung 52**). Durch den Einsatz eines zweiten Enzyms, welches das entstandene prochirale Keton weiter umsetzt, war es möglich, unter den geschaffenen Bedingungen eine formale, regio- und enantioselektive Hydratisierung oder Hydroaminierung des eingesetzten Alkens durchzuführen. Wie bereits in Kapitel 1.6. beschrieben, ist die direkte Umsetzung interner Alkene zu chiralen Alkoholen und Aminen nach wie vor eine große Herausforderung in der organischen Synthese. Mit den hier gezeigten Kaskadenreaktionen konnte ein neuartiger biokatalytischer Ansatz implementiert werden, der neue Syntheserouten zu wertvollen chiralen Verbindungen eröffnet. In mehreren Beispielen konnte demonstriert werden, dass unaktivierte interne Alkene direkt zu chiralen Phenylethanol- und Phenylethylaminen im präparativen Maßstab (1.00 mmol) umgesetzt werden können.

Die Synthese des chiralen (*S*)-Alkohols ((*S*)-**34**) ausgehend von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**) erfolgte mit absoluter Regiokontrolle und exzellenter Enantioselektivität (>99:1 e.r.) unter Einsatz der Phenylacetaldehyd-Reduktase (PAR). Das Produkt wurde mit 66% Ausbeute isoliert. Für die Herstellung des enantiokomplementären (*R*)-Alkohols ((*R*)-**34**) kam eine NADH-abhängige Variante der *LBv*-ADH zum Einsatz. Das Produkt konnte wiederum mit hoher Enantioselektivität und einer guten Ausbeute von 69% isoliert werden. Ein wichtiges Merkmal der hier vorgestellten formalen, asymmetrischen Redox-Hydratisierungen ist, dass sie nur von simplen und preiswerten stöchiometrischen Reagenzien wie Isopropanol und Sauerstoff abhängen. Isopropanol wird in diesen Kaskadenreaktionen zur Regenerierung des Cofaktors eingesetzt. Die verwendeten Ketoreduktasen (PAR und *LBv*-ADH) sind in der Lage Isopropanol als Hydridüberträger auf NAD⁺ zu nutzen und liefern so die nötigen Reduktionsäquivalente für die Ketonsynthase-katalysierte Reaktion sowie die Carbonyl-Reduktion.

3. Ergebnisse und Diskussion

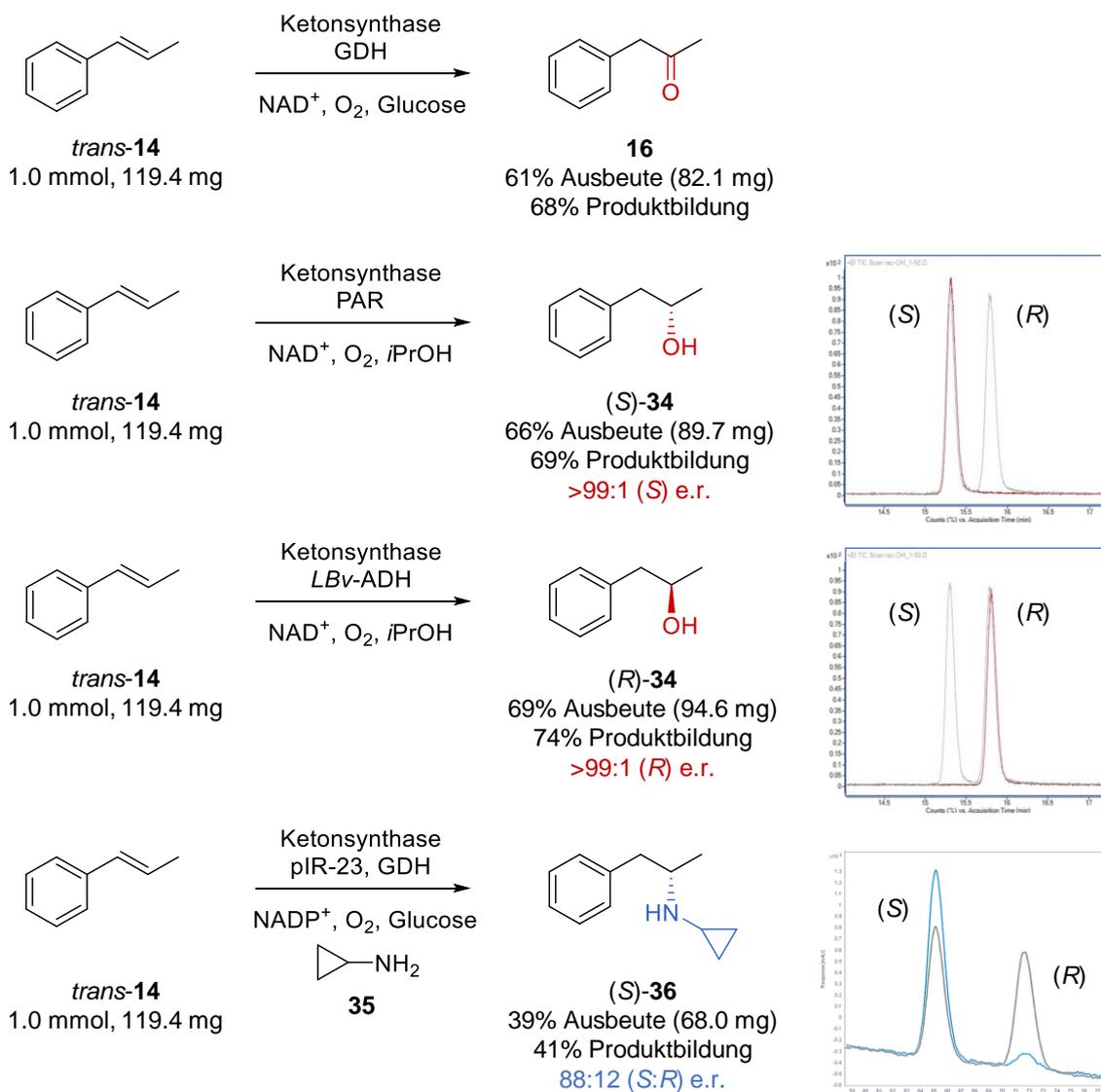


Abbildung 52 – Anwendung der evolvierten Ketonsynthese im präparativen Maßstab zur Synthese von Ketonen sowie für die formale asymmetrische Hydratisierung und Hydroaminierung von internen Alkenen in Enzymkaskaden. Quantifizierte Produktbildungen (UHPLC), isolierte Ausbeuten und Enantiomerenverhältnisse (e.r.) der generierten Verbindungen sind angegeben. Für chirale Verbindungen sind Chromatogramme der chiralen Analyse gezeigt (rot: GC/MS; blau: UHPLC; grau: Chromatogramm eines racemischen Standards).

Auch eine formale, asymmetrische Redox-Hydroaminierung konnte im präparativen Maßstab in einer Kaskadenreaktion demonstriert werden. Für die reduktive Aminierung im zweiten Reaktionsschritt wurde zunächst eine geeignete Iminreduktase (IREd) gesucht. Vier IREd-Vertreter, die bekanntermaßen zur Umsetzung von Phenylacetone-Derivaten mit dem Aminnukleophil Cyclopropylamin (**35**) fähig sind, wurden von Prof. Nicholas Turner und Mitarbeitern zur Verfügung gestellt (pIR-06, pIR-13, pIR-16, pIR-23).^{168,263} In Testreaktionen für das nicht-funktionalisierte Phenylacetone (**16**) und demselben Nukleophil konnte für pIR-23 die höchste Aktivität ermittelt werden. Anschließend wurde die Ketonsynthese und pIR-23 in einer sequenziellen Kaskade kombiniert, um Amin (**S**)-**36** mit einer Ausbeute von 39% direkt aus *trans*-

β -Methylstyren (*trans*-**14**) zu synthetisieren (**Abbildung 52**). Eine chirale Analyse des Produkts bestätigte die (*S*)-Selektivität der eingesetzten Iminreduktase. Aufgrund der Cofaktorspezifität der IRED wurde NADP⁺ als Kofaktor verwendet und zur Regeneration wurde eine Glucosedehydrogenase (GDH) eingesetzt. Wiederum ist anzumerken, dass für diese asymmetrische Hydroaminierung lediglich Sauerstoff und D-Glucose als stöchiometrische Reagenzien zum Einsatz kamen.

Die Umsetzung unaktivierter interner Alkene zu chiralen Alkoholen und Aminen ist eine besondere Herausforderung in der Katalyse, für die es nur begrenzte katalytische Lösungen gibt.^{139,143,146,152,264,265} Es gibt zwar natürliche Enzyme wie Ammoniak-Lyasen, die direkte Hydroaminierungen interner Alkene katalysieren, doch diese sind aufgrund ihres Mechanismus auf aktivierte interne Alkene wie α,β -ungesättigte Carbonsäuren angewiesen.^{140,141} Die Enzymfamilie der Hydratasen bietet andererseits eine Möglichkeit zur regioselektiven und asymmetrischen Hydratisierung interner Alkene, wobei anzumerken ist, dass ihr Anwendungsbereich bislang strikt auf ungesättigte Fettsäuren beschränkt ist.¹⁵¹ Aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten, chirale Alkohole und Amine ausgehend von Ketonen zu gewinnen, ist ein naheliegender Ansatz, diese prochiralen Vorstufen zunächst regioselektiv aus den entsprechenden Alkenen zu gewinnen. Dieses Konzept wurde bereits in diversen chemoenzymatischen Kaskaden verwirklicht und basiert im ersten Schritt auf der Palladiumkatalysierten Wacker-Tsuji-Oxidation unaktivierter terminaler Alkene.^{173,174,266,267} Ein ähnlicher Ansatz ausgehend von internen Alkenen wurde bisher noch nicht berichtet. Die Laborevolution nicht-natürlicher Enzymfunktionen wie die der Ketonsynthase eröffnet den Zugang zu solchen neuen Synthesewegen in kurzen Enzymkaskaden und kann dazu beitragen seit langem bestehende Herausforderungen in der Synthese zu lösen.^{78,87,268} Dieser hier vorgestellte Zwei-Enzym-One-Pot-Ansatz kann prinzipiell leicht auf andere interne Alkene oder andere ungeschützte Amine als Aminendonoren erweitert werden. Da Ketone Substrate in vielen chemischen Transformationen mit Enzymen^{269–274} oder niedermolekularen Katalysatoren^{130,275} sind, können viele neue Syntheserouten unter Verwendung der entwickelten Ketonsynthase direkt aus internen Alkenen ins Auge gefasst werden. Vor allem Ketoreduktasen^{75,269} oder Iminreduktasen^{270,276,277} sind für allerhand Ketone breit verfügbar und eignen sich besonders gut für die hier vorgestellten formalen, asymmetrischen Redox-Hydratisierungen und Hydroaminierungen. Dies ermöglicht die Synthese chiraler Verbindungen, die teilweise wichtige Struktur motive in umsatzstarken Pharmazeutika sind (siehe **Abbildung 11**).

Abschließend sind initiale Daten gezeigt, die verdeutlichen sollen, dass die Anwendung der Ketonsynthase über die Erzeugung eines einzigen Stereozentrums hinausgehen kann. Formale asymmetrische Redox-Hydratisierungen und Hydroaminierung von hochsubstituierten internen Alkenen können im Prinzip Zugang zu zwei Stereozentren bieten. Dafür wird vorausgesetzt, dass die Stereochemie sowohl durch die Ketonsynthase als auch durch das zweite Enzym der Kaskade

kontrolliert werden kann. Um die Machbarkeit zu demonstrieren, wurde das trisubstituierte interne Alken α,β -Dimethylstyren (*trans*-**37**) als Ausgangsmaterial für die formale, asymmetrische Hydratisierung eingesetzt (**Abbildung 53**). Der Alkohol (2*S*,3*S*)-**38** wurde mit ausgezeichneter Selektivität und geringer Aktivität als einzelnes Stereoisomer erhalten.

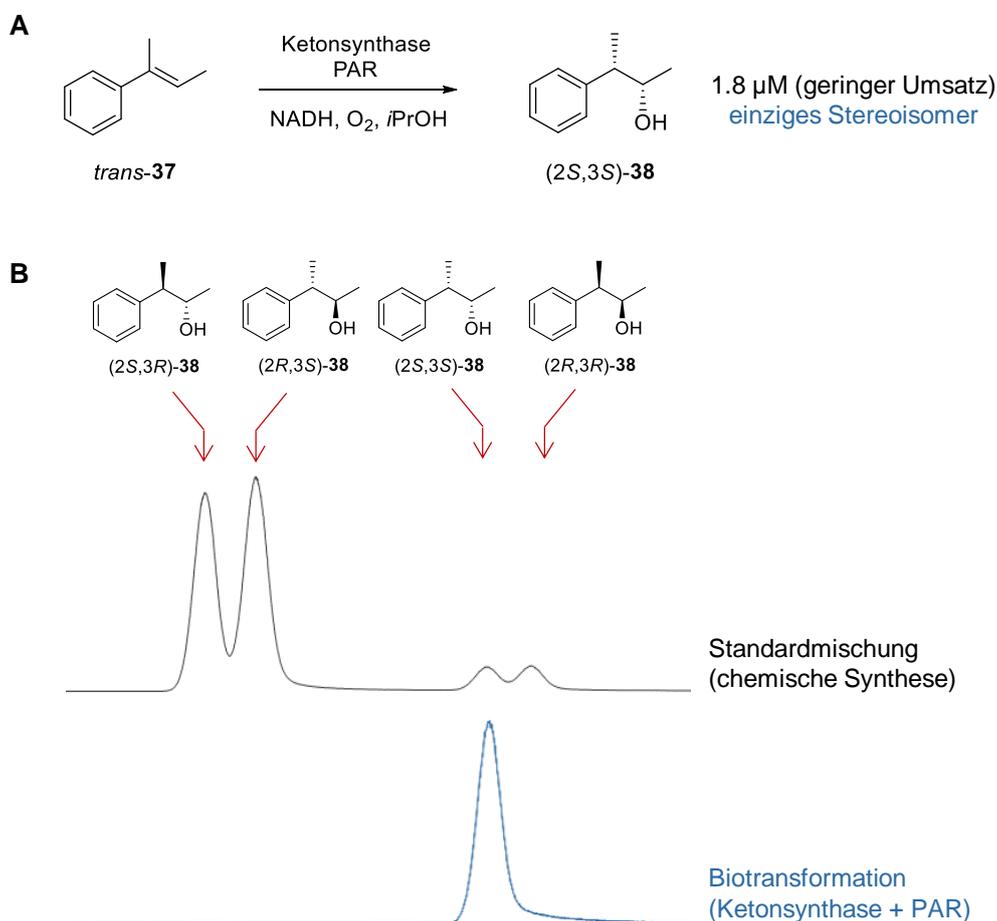


Abbildung 53 – (A) Biotransformation von α,β -Dimethylstyren (*trans*-**37**) mit der Ketonsynthase und PAR zur Durchführung einer formalen, asymmetrischen Redox-Hydratisierung. Neben dem hauptsächlich gebildeten Epoxidierungsprodukt wurden geringe Mengen (2*S*,3*S*)-3-Phenylbutan-2-ol (**38**) als einziges Stereoisomer detektiert. Die Biotransformation erfolgte unter Standardbedingungen (2 h Reaktionszeit, 0.625 μM Ketonsynthase, 5 mM Alken, 0.5 mM NADH, 12.5% v/v PAR-Lysat, 1% v/v Isopropanol). (B) Chirale GC-Analyse eines chemisch synthetisierten Standardgemischs (schwarz) und der enzymatischen Kaskadenreaktion (blau). Die Zuordnung der Stereoisomere erfolgte mithilfe von authentischen Standards.

Dieser Ansatz kombiniert die enantioselektive Alken-zu-Keton-Oxidation *via* asymmetrischer Hydridmigration, katalysiert durch die Ketonsynthase, mit der diastereofacialen Differenzierung der Ketoreduktase. Obwohl bekannt ist, dass der erste Reaktionsschritt zur Bildung des intermediären Ketons nur eine Enantioselektivität von 87:13 (*S*:*R*) aufweist, wird final nur (2*S*,3*S*)-3-Phenylbutan-2-ol (**38**) detektiert. Dies spricht für eine kinetische Resolution, die von der eingesetzten Ketoreduktase vollzogen wurde. Nur (*S*)-3-Phenylbutan-2-on (**30**) wurde von PAR als Substrat akzeptiert. Mit der *R*-selektiven *LBv*-ADH konnte keine Produktbildung

nachgewiesen werden. Aus einer Studie zur kinetischen Resolution mit Ketoreduktasen bestätigt sich, dass anti-Prelog Ketoreduktasen wie *LBv*-ADH das Enantiomer (*R*)-3-Phenylbutan-2-on (**30**) als Substrat bevorzugen.²⁷⁸ Dies schließt die Bildung von (*2R,3S*)-3-Phenylbutan-2-ol (**38**) in der Kaskade von vorne herein aus. Aufgrund der Stereopräferenz der Ketonsynthase-katalysierten Oxidation steht das benötigte (*R*)-Stereoisomer des Ketons **30** nur in vernachlässigbaren Mengen als Nebenprodukt zur Verfügung, sodass (*2R,3R*)-3-Phenylbutan-2-ol (**38**) mit dieser Strategie ebenfalls nicht zugänglich ist.

Anhand der hier gezeigten Beispiele wird auffällig, dass die Ketonsynthase viele wichtige, hochselektive Funktionalisierungen von internen Alkenen ermöglicht, die sich bisher einer effizienten und selektiven Katalyse weitgehend entzogen haben. Enzymatisch lassen sich chirale Produkte des 3-Phenylbutan-2-ols (**38**) zwar unter Ausnutzung des Konzepts der kinetischen Resolution synthetisieren,²⁷⁸ doch existieren aktuell annähernd keine asymmetrischen Synthesemethoden, mit denen beide Stereozentren simultan oder individuell kontrolliert werden können. Das einzige literaturbekannte Beispiel ist die Hydroborierung mit chiralen Boranen, was ebenfalls die Synthese des (*2S,3S*)-konfigurierten anti-Markovnikov-Alkohols **38** erlaubt.^{279,280} Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine katalytische Methode, da stöchiometrische Mengen des chiralen Reagenz benötigt werden. Der Einsatz verbesserter Ketonsynthasen mit weiteren Enzymen in Kaskaden kann daher in Zukunft einen katalytischen Lösungsansatz bieten, um diese oder weitere Verbindungsklassen enantioselektiv aus simplen Ausgangsmaterialien zu synthetisieren.

4. Ausblick

(A) Mechanistische Studien zum weiteren Verständnis von aMOx

Wie bekannt wurde, sind einige P450-Enzyme in der Lage eine anti-Markovnikov Oxidation terminaler Alkene zu katalysieren. Der Schlüssel zu dieser Transformation ist die dynamische Kontrolle über reaktive Zwischenprodukte infolge eines Oxo-Transfers sowie ein anschließender gekoppelter Elektronen-/Hydridtransferprozess ausgehend von einem radikalischen Intermediat. Für aMOx erfolgt die Migration des *cis*-Hydrids von Styren mit Enantioselektivität über die *re*-Seite des Intermediats. Diese Enzymfunktion kann als Ausgangspunkt dienen, um eine Bandbreite von Biokatalysatoren zu generieren, die auf neue Substrate zugeschnitten sind. Dies könnte den Zugang zu derzeit schwierigen chemischen Transformationen ermöglichen, für die es aktuell keine katalytischen Lösungsansätze gibt. **(i)** So könnte zum Beispiel erprobt werden, ob außer Hydriden auch andere Substituenten wie Alkylgruppen durch aMOx oder anderen P450-Enzymen zur kontrollierten Migration angeregt werden können (**Abbildung 54, A**). Durch den Einsatz von *cis*-substituierten Alkenen (z.B. *cis*- β -Methylstyren) könnte untersucht werden, ob Startaktivität für eine enantioselektive Methylgruppen-Migration beobachtet werden kann. Um selbst Spuren des Produkts detektieren zu können, ist die Etablierung einer robusten Analytik nötig. Sobald Startaktivität identifiziert worden ist, kann eine gerichtete Evolution zur Steigerung der Aktivität und Selektivität erfolgen. Ein solcher evolvierter Katalysator würde Zugang zu einer neuartigen Chemie verschaffen, welche auf diese Weise aktuell mit keinem anderen Katalysator erreicht werden kann. **(ii)** Außerdem könnten mit einem solchen Katalysator quaternäre Stereozentren aufgebaut werden, indem zum Beispiel α,β -disubstituierte interne Alkene wie **39** als Substrate eingesetzt werden (**Abbildung 54, B**). Die asymmetrische Synthese solcher quaternärer Kohlenstoff-Stereozentren ist präparativ nach wie vor ein sehr komplexes Unterfangen.^{281,282} **(iii)** Beim Einsatz zyklischer interner Alkene wie **41** wäre eine enantioselektive Umlagerung erdenklich, die zu einem verkleinerten Ringsystem führt und in der Bildung eines chiralen Aldehyds **42** resultiert (**Abbildung 54, C**).

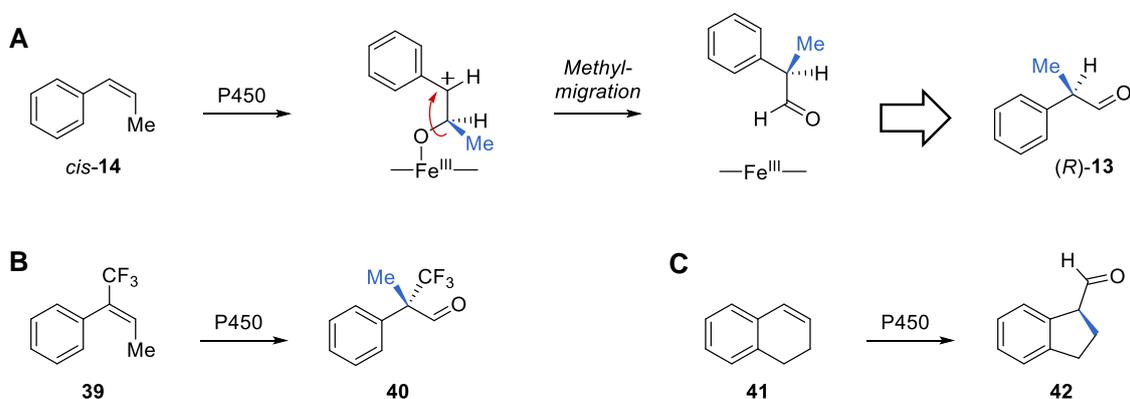


Abbildung 54 – Mögliche Reaktionen die von einer enantioselektiven Alkylgruppen-Migration profitieren können. **(A)** Enantioselektive Methylgruppen-Migration ausgehend von der *cis*-Position am Beispiel von *cis*- β -Methylstyren (**cis-14**). **(B)** Aufbau eines quaternären Stereozentrums durch enzymkatalysierte Alkylgruppen-Migration. **(C)** Asymmetrische Alkylgruppen-Umlagerung am Beispiel eines zyklischen Substrats.

(iv) Für P450_{BM3} V5 wurde ermittelt, dass vorzugsweise das *trans*-Hydrid migriert (siehe **Abbildung 29, C**). Falls sich für dieses besondere Szenario herausstellt, dass die Migration über die gegenüberliegende *si*-Seite verläuft, wäre es möglich, einen Katalysator mit umgekehrter Enantioselektivität zu evolvieren. Wie für alle genannten Beispiele ist lediglich das Identifizieren von Startaktivität nötig, um eine gerichtete Evolution anzuschließen, die zu einem Katalysator mit der gewünschten, neuartigen Funktion führt.

(B) Gerichtete Evolution einer Ketonsynthase

Die gerichtete Evolution der Ketonsynthase endete mit einer Variante, die eine Keton-Selektivität von 75% und unter optimierten Bedingungen eine Aktivität von 4750 TTN für Phenylacetone (**16**) aufzeigt. Zukünftig könnte die Evolution des Biokatalysators weiter fortgeführt werden, bis kein Epoxid **15** als Nebenprodukt auftritt und nur noch das Keton **16** mit absoluter Regiokontrolle gebildet wird. Dies könnte erreicht werden, indem weitere Aminosäurepositionen in der zweiten und dritten Schale um das aktive Zentrum durch Mutagenese adressiert werden, um weitere selektivitätssteigernde *Hit*-Varianten zu identifizieren. Auch durch Zufallsmutagenese (*random mutagenesis*) könnte der Sequenzraum weiter erkundet werden. Dabei werden auch Aminosäurepositionen adressiert, die aus rationaler Sicht nur mit geringer Wahrscheinlichkeit für die ortsgerichtete Mutagenese ausgewählt werden würden. Allgemein könnten durch Erhöhen des Screening-Durchsatzes auch größere kombinatorische Variantenbibliotheken untersucht werden, sodass weitere nicht-additive Effekte erschlossen werden können. Dazu ist es notwendig einen Hochdurchsatz-Assay mit einem guten Detektionsvermögen für Ketone zu entwickeln. Photometrische Assays, wie sie in Kapitel 3.2.1. beschrieben wurden, könnten bis zur Einsatzreife weiterentwickelt werden. Eine weitere Optimierung bezüglich Enzymaktivität und Selektivität durch *in silico* Enzymdesign ist ebenfalls denkbar. Varianten zu modellieren, die gezielt Übergangszustände bevorzugen oder diskriminieren ist jedoch aktuell weitestgehend unmöglich. Lediglich Zugewinne in der Aktivität könnten durch Steigerung der Enzymstabilität mithilfe solcher Tools gezielt erreicht werden.²⁸³

Für viele computerbasierten Evolutions- und Analysemethoden sind Strukturdaten vonnöten. Diese existieren für P450_{LA1} und Varianten bisher nur aus Homologiemodellen und entsprechen nur begrenzt der Realität. In Kollaboration mit Prof. Gideon Grogan (University of York) wurden bereits Versuche unternommen, die Häm-Domäne von P450_{LA1} und aMOx zu kristallisieren, was bisher noch nicht gelang. Daher können in Zukunft weitere Kristallisationsbedingungen getestet werden, um letztendlich doch Kristallstrukturdaten zu generieren. Dies könnte außerdem zum weiteren Verständnis des Mechanismus beitragen und auch eine weiterführende Evolution unterstützen, indem eine bessere Auswahl der zu adressierenden Aminosäurepositionen getroffen werden kann, z.B. unter Einsatz von Mutagenese-Tools.^{136,284}

(C) Anwendungsbreite der evolvierten Ketonsynthase und Limitierungen in der Synthese

Die evolvierte Ketonsynthase ermöglicht die Umsetzung einer Vielzahl interner Alkene mit mäßiger bis hoher Keton-Selektivität und lässt sich in Kaskadenreaktionen für formale regio- und enantioselektive Hydratisierungen und Hydroaminierungen im präparativen Maßstab einsetzen. Der Einsatz von Lysaten sorgt jedoch für ein anspruchsvolles Downstream-Processing von Biotransformationen. Daher wäre es von Vorteil, wenn gereinigtes oder immobilisiertes Protein in *Upscalings* eingesetzt werden könnte. Protokolle und Verfahren hierfür könnten in Zukunft erarbeitet werden, um eine effizientere Anwendung der Ketonsynthase zu ermöglichen. Ebenso könnten Reaktionsbedingungen (Puffersystem, Temperatur, Additive, pH-Wert, usw.) optimiert werden, um für eine höhere Produktivität des Katalysators zu sorgen. Auch ein weiteres Vorantreiben der Ganzzellkatalyse mit der Ketonsynthase könnte für eine synthetische Anwendung von Relevanz sein, da die beobachtete Metabolisierung des Epoxids und das einfache Abtrennen der Zellen ebenfalls zur Erleichterung des Downstream-Processings beitragen könnte.

Des Weiteren könnte das Substratspektrum der Ketonsynthase weiter ausgeweitet und ergründet werden. Von großem Interesse wären beispielsweise sterisch gehinderte, reich-substituierte Alkene, *cis*-Isomere und konjugierte Olefine. Da nicht für jedes der Substrate zu erwarten ist, dass ausreichend hohe Promiskuität vorhanden ist, könnten weitere Ketonsynthasen evolviert werden, die gezielt zur Umsetzung relevanter Substrate geeignet sind.

Auch in Kaskadenreaktionen könnten neben der Ketonsynthase weitere Enzyme zum Einsatz kommen, die zu einer Vielzahl interessanter chiraler Produkte führen könnten (siehe **Abbildung 12**). So könnten zum Beispiel Transaminasen^{173,285-287} und Amin-Dehydrogenasen^{166,170,274,288} zur asymmetrischen Synthese primärer Amine herangezogen werden. Für die reduktive Aminierung mit Iminreduktasen könnten neben dem in dieser Arbeit eingesetzten Cyclopropylamin auch weitere Aminnukleophile eingesetzt werden. Hierfür müsste aus dem großen Panel literaturbekannter IREDs ein geeignetes Enzym identifiziert werden, das sowohl mit dem gewünschten Carbonylelektrophil als auch mit dem Aminnukleophil kompatibel ist.^{168,277,289} Zur Synthese chiraler Isochinoline direkt aus internen Alkenen können zum Beispiel Pictet-Spenglerasen²⁹⁰ mit Ketonsynthasen kombiniert werden, während Hydroxynitril-Lyasen²⁹¹ zur Darstellung optisch aktiver Cyanhydrine herangezogen werden können. Für viele der hier genannten Kaskaden ist wenig Optimierungsaufwand vonnöten, da Biotransformationsbedingungen für alle Biokatalysatoren bereits ausreichend ergründet wurden.

5. Material und Methoden

5.1. Verwendete Materialien

5.1.1. Chemikalien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Pufferkomponenten und Lösungsmittel wurden von kommerziellen Anbietern (abcr, Acros Organics, Alfa Aesar, BLDpharm, Carl Roth, Enamine, Eurisotop, Fisher Scientific, Fluorochem, Merck, Sigma-Aldrich, TCI, Th. Geyer und VWR) bezogen.

5.1.2. Kits

Nachfolgend aufgelistete Kits wurden für molekularbiologische und proteinbiochemische Anwendungen eingesetzt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7 – Eingesetzte Kits und deren Anwendung im Rahmen dieser Arbeit.

Kit	Bezogen von	Anwendung
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>
DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research	Reinigung und Konzentration von DNA
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research	DNA-Extraktion aus Agarosegel
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Bestimmung von Proteinkonzentrationen

5.1.3. Plasmide

Zur Expression heterologer Gene wurden verschiedene Vektorsysteme verwendet, die im Folgenden gelistet sind (**Tabelle 8**).

Tabelle 8 – Eingesetzte Plasmide, deren Charakteristiken und deren Verwendungszweck.

Plasmid	Selektionsantibiotikum	Induktor	Exprimierte Enzyme
pET-22b(+)	Ampicillin (100 µg/mL)	IPTG	P450s, KREDs
pET-28a(+)	Kanamycin (50 µg/mL)	IPTG	P450s, IREDs
pCWori	Ampicillin (100 µg/mL)	IPTG	P450s
pACYC	Chloramphenicol (34 µg/mL)	IPTG	P450s, GDH
pBAD33	Chloramphenicol (34 µg/mL)	L(+)-Arabinose	P450s

5.1.4. *E. coli* Stämme

Expression rekombinanter Proteine erfolgte in vier verschiedenen *E. coli* Stämmen, welche im Folgenden aufgeführt sind (**Tabelle 9**).

Tabelle 9 – Eingesetzte *E. coli* Stämme für die Produktion rekombinanter Proteine.

Stamm	Bezogen von	Genotyp
<i>E. coli</i>® EXPRESS BL21(DE3)	Lucigen	F– ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lon λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	Agilent Technologies	<i>E. coli</i> B F– ompT hsdS(rB– mB–) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]
<i>E. coli</i> BLR(DE3)pLysS	Novagen	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 pLysS (CamR, TetR)
<i>E. coli</i> BW25113	National Institute of Genetics	F - Δ(araD-araB)567ΔlacZ4787 (::rrnB- 3) λ-rph-1, Δ(rhaDrhaB)568, hsdR514

5.1.5. Enzyme

Alle eingesetzten Enzyme aus kommerziellen Quellen sind im Folgenden aufgelistet (**Tabelle 10**).

Tabelle 10 – Eingesetzte Enzyme und deren Anwendung im Rahmen dieser Arbeit.

Enzym	Bezogen von	Anwendung
Lysozym (aus Hühnerei)	Carl Roth	Enzymatischer Zellaufschluss
DNaseI	GoldBio	Enzymatischer Zellaufschluss
Katalase (aus Rinderleber)	Sigma-Aldrich	Neutralisierung von H ₂ O ₂ in Biotransformationen
Phusion® HF DNA Polymerase	New England Biolabs	PCR, <i>Gibson assembly</i>
DpnI	New England Biolabs	Verdau von Templat-DNA
Taq DNA Ligase	New England Biolabs	<i>Gibson assembly</i>
T5-Exonuklease	New England Biolabs	<i>Gibson assembly</i>
NdeI	New England Biolabs	Restriktionsverdau/Klonieren
XhoI	New England Biolabs	Restriktionsverdau/Klonieren
EcoRI-HF	New England Biolabs	Restriktionsverdau/Klonieren

5.1.6. Mutagenese-Primer Design

Primer zur ortsgerichteten Mutagenese wurden nach einem allgemeingültigen Protokoll entworfen (**Abbildung 55**) und von den Firmen Metabion International oder Microsynth Seqlab synthetisiert und bezogen. Die exakten Sequenzen können auf Anfrage offengelegt werden.

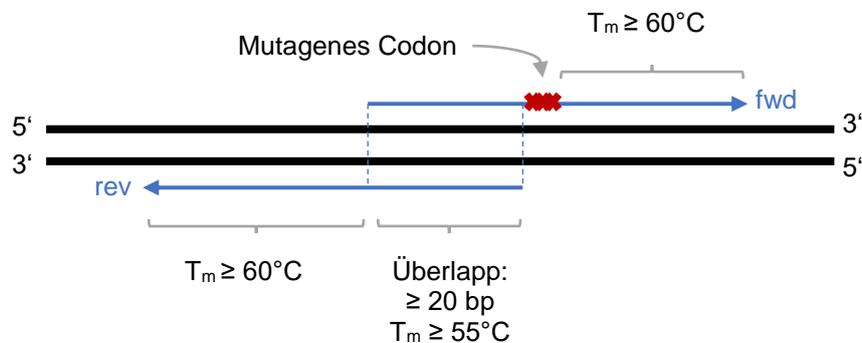


Abbildung 55 – Design von Primerpaaren für die ortsgerichtete Mutagenese. Die Länge der Überlappregion sowie der Überhänge wurden in Abhängigkeit der individuell ermittelten Schmelztemperaturen gewählt und sollten den angegebenen Werten entsprechen. Mutagene Codons oder degenerierte Codons wurden je nach gewünschter Anwendung frei gewählt.

5.1.7. Kulturmedien und Pufferlösungen

Die Zusammensetzung aller verwendeten Kulturmedien und Pufferlösungen sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 11 – Medien und Puffer für die Zellkultur.

LB-Medium		TB-Medium mit 2x Glycerin	
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	24 g
Trypton	10 g	Trypton	12 g
NaCl	10 g	Glycerin	10 g
dH ₂ O	Auf 1 L	10x TB-Salze	100 mL
*Für LB-Agar-Platten wurde zusätzlich 16 g/L Agar zugesetzt		dH ₂ O	Auf 1L
10x TB-Salze		Glycerin-Stock Puffer	
KH ₂ PO ₄	23.1 g	TRIS	0.25 M
K ₂ HPO ₄	125.5 g	Glycerin	65% (v/v)
dH ₂ O	Auf 1 L (pH = 7.4)	in ddH ₂ O	pH = 8

Medien und Puffer, die zur Kultivierung und Lagerung von Zellen eingesetzt wurden, wurden vor ihrer Verwendung bei 121°C und 2 bar für 20 min sterilisiert.

Tabelle 12 – Pufferlösungen für den Zellaufschluss und Biotransformationen

Lysepuffer		Biotransformationspuffer	
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0.10 M	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0.10 M
NaCl	0.15 M	NaCl	0.15 M
Glycerin	2% (m/v)	Glycerin	2% (m/v)
in ddH ₂ O	pH = 8	in ddH ₂ O	pH = 8
Vor Gebrauch frisch hinzugefügt:			
Lysozym	1.00 mg/mL		
DNaseI	0.20 mg/mL		

Tabelle 13 – Pufferlösungen für die Proteinreinigung.

Bindepuffer/Lysepuffer		Waschpuffer	
TRIS	0.05 M	TRIS	0.05 M
NaCl	0.05 M	NaCl	0.05 M
Imidazol	0.01 M	Imidazol	0.01 M
Glycerin	10% (m/v)	Glycerin	10% (m/v)
in ddH ₂ O	pH = 8	in ddH ₂ O	pH = 8
Vor Gebrauch frisch hinzugefügt:			
Lysozym	1.00 mg/mL		
DNaseI	0.20 mg/mL		

Elutionspuffer		Dialysepuffer	
TRIS	0.05 M	TRIS	0.05 M
NaCl	0.05 M	NaCl	0.05 M
Imidazol	0.25 M	Glycerin	10% (m/v)
Glycerin	10% (m/v)	in ddH ₂ O	pH = 8
in ddH ₂ O	pH = 8		

Tabelle 14 – Pufferlösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

50x TAE-Puffer		1%ige Agaroselösung	
TRIS	2.00 M	Agarose NEEO	1 g
Essigsäure	1.00 M	1x TAE-Puffer	100 mL
EDTA	0.05 M		
in ddH ₂ O			

Tabelle 15 – Pufferlösungen für die SDS-PAGE.

4x SDS-Ladepuffer		Entfärbelösung	
4x Laemmli Sample Buffer (BioRad)	900 µL	Methanol	20% (v/v)
β-Mercaptoethanol	100 µL	in ddH ₂ O	

Elektrophoresepuffer		Färbelösung	
TRIS	25 mM	5x Roti®-Blue	20% (v/v)
Glycin	192 mM	Methanol	20% (v/v)
SDS	0.1% (m/v)	in ddH ₂ O	
in ddH ₂ O	pH = 8.3		

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine molekularbiologische Methode zur gezielten Vervielfältigung linearer DNA-Fragmente.^{292,293} Dabei werden die Zielfragmente mittels einer DNA-Polymerase aus einzelnen Nukleotiden synthetisiert, indem repetitive Zyklen durchlaufen werden. Diese sind I) die Hitzedenaturierung der Templat-DNA bei 98°C und führt zur Trennung der komplementären DNA-Stränge. II) Durch anschließendes Abkühlen wird die Primerhybridisierung (*Annealing*) ermöglicht. Die Temperatur ist in jedem Einzelfall von der Schmelztemperatur des Primers abhängig. III) In der finalen Amplifikationsphase (*Elongation*) wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase erhöht, sodass der angelagerte Primer in 5'-3'-Richtung verlängert wird bis das DNA-Templat vollständig amplifiziert wurde und wieder doppelsträngig vorliegt. Die drei Zyklen werden in der Regel 30x wiederholt, um eine ausreichende DNA-Menge zu generieren. Die einzelnen Komponenten eines PCR-Ansatzes (**Tabelle 16**) und das zyklische Temperaturprogramm (**Tabelle 17**) sind im Folgenden dargestellt.

Tabelle 16 – Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes. Die Reihenfolge der Listung entspricht der Zugabereihenfolge.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O	33 µL	
HF-Puffer (5×)	10 µL	1×
dNTPs	1 µL	je 200 µM
Templat-DNA	1 µL	70 ng
Fwd-Primer	2 µL	0.4 µM
Rev-Primer	2 µL	0.4 µM
Phusion® HF DNA Polymerase	1 µL	2 U/50 µL PCR-Ansatz

Tabelle 17 – Repräsentatives Temperaturprogramm für einen PCR-Ansatz.

Vorgang	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Hitzedenaturierung	98°C	30 s	
Hitzedenaturierung	98°C	10 s	30×
Primerhybridisierung	55°C	30 s	30×
Elongation	72°C	30 s/kb	30×
Finale Elongation	72°C	10 min	

5.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dabei werden negativ geladene DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld zur Bewegung durch eine poröse Agarosegelmatrix in Richtung der Anode angeregt, wobei größere Fragmente eine verminderte Mobilität aufweisen.

Für die Elektrophorese wurden 1%iges Agarosegel in TAE-Puffer (45 mL) verwendet, welches vor dem Aushärten mit 4 µL MIDORI Green Xtra (Nippon Genetics) versetzt wurde. Die Proben wurden mit 6× Gel Loading Dye, Purple (New England Biolabs) vor dem Auftragen vermischt und es wurde 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs) als Referenzmarker eingesetzt. Nach Überschichten mit TAE-Puffer und anschließendem Beladen der Geltaschen erfolgte die elektrophoretische Trennung bei 110 V für 60 min. Zur Analyse der getrennten Fragmente wurde ein FastGene Blue LED Illuminator (Nippon Genetics) eingesetzt und die gewünschte Bande nach Bedarf mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.

5.2.3. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen aller verwendeter *E. coli* Stämme wurden eigens hergestellt und auf Vorrat gelagert. Für die Präparation wurden zunächst *E. coli* Zellen eines entsprechenden Stamms auf Agar-Platten kultiviert und eine Einzelkolonie wurde zur Inokulation einer Übernachtskultur in LB-Medium verwendet. Die Hauptkultur (je 250 mL LB-Medium) wurde mit 2% (v/v) Inokulum angeimpft und bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0.5-0.7$ inkubiert. Nach 30-minütigem Abkühlen auf Eiswasser wurden die Zellen in konischen Zentrifugenröhrchen (50 mL Aliquote) durch Zentrifugation (4°C, 4000×g, 10 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden je Röhrchen in sterilem, eiskaltem Wasser (3 mL) resuspendiert und gewaschen. Der Inhalt zweier Röhrchen wurde in einem vereinigt, in eiskaltem ddH₂O (40 mL, 4°C) aufgenommen, erneut zentrifugiert (4°C, 4000×g, 10 min) und der Überstand schließlich verworfen. Derselbe Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde jedes Pellet in einer sterilen, eiskalten 10%igen Glycerin-Lösung (3 mL) resuspendiert, in ein einziges Zentrifugenröhrchen überführt und dieses auf ein Endvolumen von 50 mL mit der eiskalten 10%igen Glycerin-Lösung aufgefüllt. Nach wiederholtem Zentrifugieren (4°C, 4000×g, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in der eiskalten 10%igen Glycerin-Lösung (2 mL) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 µL-Aliquoten portioniert, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

5.2.4. Elektrotransformation von *E. coli* Zellen

Um Plasmid-DNA in den Expressionswirt (*E. coli*) einzubringen, wurde die Methode der Elektroporation verwendet, da sie eine höhere Effizienz gegenüber der Hitzeschocktransformation aufweist. Dazu wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µL Plasmid-DNA (50-100 ng) vorsichtig vermengt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.4 cm Spalt, 450 µL, Carl Roth) überführt und zügig in den Halter eines MicroPulser™ Elektroporators (BioRad) eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte mit der vorprogrammierten Einstellung "Ec2" (für *E. coli*, 0.2 cm Küvette, 2.5 kV, 1 Puls). Die elektroporierten Zellen wurden vorsichtig in 1 mL vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37°C, 180 rpm regeneriert. Anschließend wurde eine adäquate Menge (z.B. 10 µL) der regenerierten Zellsuspension mit Glasperlen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Sequenzierung

Für jede Plasmidisolierung wurde je eine Übernachtskultur in 5 mL LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und das Zellpellet weiterverwendet. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) eingesetzt und es wurde entsprechend der mitgelieferten Betriebsanleitung vorgegangen. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA mit 30 µL ddH₂O eluiert und deren Konzentration sowie Qualität mit Hilfe eines NanoPhotometer® N50 (Implen) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt.

Zur Bestimmung und Verifizierung von DNA-Sequenzen wurde die Sequenzierungsmethode nach Sanger eingesetzt und bei den Firmen Eurofins Genomics und Microsynth SeqLab GmbH in Auftrag gegeben. Dazu wurden 12-20 µL Plasmid-Lösung (40-100 ng/µL) versendet und ein geeigneter Sequenzierungsprimer ausgewählt (**Tabelle 18**).

Tabelle 18 – Verwendete Sequenzierungsprimer.

Primer	Anwendung	Sequenz (5'-3')
T7	pET-Vektoren	TAATACGACTCACTATAGGG
T7term	pET-Vektoren	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
Ab160 (AS Position)	P450-Sequenzierungen	GTCAGGAGATGGTACGC
Ab260 (AS Position)	P450-Sequenzierungen	GTACCGGTTGGATGCACGAAACCATC
Ab360 (AS Position)	P450-Sequenzierungen	CGGAAGGTGCTAAACTGC
ACYC Duet UP	pACYC-Vektoren	GGATCTCGACGCTCTCCCT
pBAD-for	pBAD-Vektoren	ATGCCATAGCATTTCATCC
pBAD-rev	pBAD-Vektoren	GATTTAATCTGTATCAGG
pCWori-fwd	pCWori-Vektoren	CACAGGAAACAGGATCAG
pCWori-rev	pCWori-Vektoren	CTCATGTTTGACAGCTTATCATCG

5.2.6. Ortsgerichtete Mutagenese

Bei der ortsgerechten Mutagenese handelt es sich um eine Methode zur zielgerichteten Einführung von Mutationen in einer Gensequenz, um die Aminosäuresequenz des codierten Proteins zu verändern. Dabei können je nach Abwandlung des Protokolls eine Aminosäure gezielt durch eine andere oder mehrere Aminosäuren gleichzeitig ausgetauscht werden. Ebenso ist es möglich, mehr als eine Mutation an unterschiedlichen Stellen des Gens gleichzeitig einzuführen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mutagenesestrategien sind im Folgenden zunächst allgemein und anschließend individuell beschrieben.

Im ersten Schritt wird die Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation mittels PCR amplifiziert (Kapitel 5.2.1.). Hierzu werden mutagene Primer eingesetzt, die komplementär an die zu verändernde Gen-Sequenz binden und die gewünschte Mutation beinhalten (Kapitel 5.1.6.). Während der Elongation entstehen lineare DNA-Fragmente, die an beiden Seiten eine kurze, identische Sequenz aufweisen und die gewünschte Mutation tragen. Im nächsten Schritt wird die parentale Plasmid-DNA durch Zugabe des Restriktionsenzym DpnI verdaut, welches gezielt methylierte DNA-Sequenzen hydrolysiert. Dazu wurden 2 μL DpnI pro 50 μL PCR-Ansatz zugegeben und das Gemisch für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Steigerung der Effizienz wurden die linearen Fragmente im nächsten Vorgang elektrophoretisch von weiteren DNA-Fragmenten getrennt, aus dem Agarosegel geschnitten und unter Anwendung des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits (Zymo Research) aus der Matrix isoliert. Anschließend wurden 5 μL der DNA-Lösung mit 15 μL eines Gibson-Mastermix (**Tabelle 19**) gemischt und für 1 h bei 50°C inkubiert. Bei diesem als isothermalen Zusammenbau nach Gibson (*Gibson assembly*²⁹⁴) bekannten Vorgang wurden die linearen DNA-Fragmente zirkularisiert. Zur Reinigung der entstandenen Plasmid-DNA wurde das DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) angewendet. Abschließend wurden 5 μL der DNA-Lösung mittels Elektroporation in den gewünschten Expressionsstramm transformiert (Kapitel 5.2.4.). Nach der Kultivierung der erhaltenen Transformaten auf Agarplatten, wurden alle Kolonien in 2 mL Wasser gelöst und das Plasmid isoliert und sequenziert. Dies ermöglichte die Effizienz der Mutagenese final zu überprüfen (*quick quality control, QQC*).²²¹

Tabelle 19 – Zusammensetzung des Gibson-Mastermix für das *Gibson assembly*.²⁹⁴

Komponente	Endkonzentration
TRIS · HCl Puffer (pH = 7.5)	100 mM
MgCl ₂	10 mM
dNTPs	je 0.05 mM
DTT	10 mM
PEG-800	5% (m/v)
NAD ⁺	1 mM
T5-Exonuklease	10 U/ μL
Phusion® HF DNA Polymerase	2 U/ μL
Taq DNA ligase	40 U/ μL
in ddH ₂ O	

Ortsgerichtete Sättigungsmutagenese

Für den gezielten Austausch einer Aminosäure durch alle möglichen 20 Aminosäuren wurde die 22c-trick-Methode angewendet.²²¹ Dabei wurde eine Mischung mutagener Primer für die PCR verwendet, die jeweils für eine der 20 möglichen Aminosäuren codieren. Um die Redundanz der Codons so gering wie möglich zu halten, wurden drei verschiedene Primermischungen aus kommerzieller Quelle in einem optimalen Verhältnis gemischt (**Tabelle 20**). Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass weniger Stopp-Codons codiert werden als für Primergemische basierend auf dem NNK-Codon und sich damit der Screening-Aufwand verringert. Für den Fall, dass nur eine Auswahl einiger Aminosäurevariationen eingeführt wurde, wurden Primer mit speziellen reduzierten Codons in der PCR eingesetzt.

Tabelle 20 – Mischungsverhältnis der Primer zur Anwendung der 22c-trick-Methode.

Enthaltenes reduziertes Codon	Anteile im Gemisch
NDT	12
VHG	9
TGG	1

Mehrbereichs-Mutagenese

Zur Erstellung von kombinatorischen Variantenbibliotheken wurde die Mehrbereichs-Mutagenese angewendet. Im Speziellen wurde dafür auf die *multichange isothermal mutagenesis* (MISO) Strategie zurückgegriffen, die es ermöglichte, Mutationen an bis zu acht Positionen gleichzeitig einzufügen.²³³ Dazu wurden mittels PCR je ein großes DNA-Fragment (*Backbone*) und bis zu sieben kleine DNA-Fragmente (*Inserts*) amplifiziert, die in den Endregionen der Sequenz je eine Mutation aufwiesen. Das weitere Protokoll unterschied sich im Folgenden nur im Schritt des *Gibson assembly*. Dabei wurden die DNA-Fragmente zuvor in folgendem Verhältnis gemischt: 0.1 pmol *Backbone* und je 0.3 pmol *Insert* in 5 µL ddH₂O.

5.2.7. Klonierungsmethoden

Für das Klonieren von Genen in einen Vektor der Wahl wurden verschiedene Techniken angewendet. Eine der praktizierten Methoden basiert auf dem Restriktionsverdau des Vektors sowie des *Inserts* (Gen) mit Restriktionsenzymen und der anschließenden Ligation nach Hybridisierung beider Fragmente. Die jeweiligen Reaktionen wurden unter Befolgung der Herstellerangaben für die entsprechenden Restriktionsenzyme (New England Biolabs) durchgeführt. Des Weiteren wurden Klonierungsarbeiten mittels *Gibson assembly*²⁹⁴ und dem RF-Cloning Protokoll²⁹⁵ durchgeführt.

5.3. Bioinformatische Methoden

5.3.1. Erstellung und Visualisierung von Homologiemodellen

Homologiemodelle von Cytochrom P450 Monooxygenasen aus der CYP116B Familie wurden mithilfe des Online-Tools „Swiss-Model“ erstellt.²²² Dabei wurde die Aminosäuresequenz des gewünschten Proteins auf Basis einer stark verwandten Kristallstruktur zu einer 3D-Struktur modelliert. Als Templat für alle modellierten Strukturen wurde die Kristallstruktur von P450_{TR} gewählt.²²⁰ Zur Visualisierung aller Proteinstrukturen wurde die Software PyMOL verwendet.

5.3.2. Sequenzähnlichkeitsnetzwerk

Sequenzähnlichkeitsnetzwerke (*sequence similarity networks, SSN*) werden zur Charakterisierung und Visualisierung großer Mengen an Proteinsequenzen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein SSN für die Cytochrom P450 Monooxygenasen-Unterfamilie CYP116B erstellt. Dazu wurden die Sequenzen von 13 bereits in der Literatur beschriebenen Mitgliedern der CYP116B-Familie als Ausgangspunkt für die Erstellung eines Datensatzes verwendet. Zunächst wurde der Datensatz durch eine blastp-Suche (Matrix: BLOSUM-62, Gap Costs: 11.1, Datenbankversion vom 30.06.2020) für jede Sequenz vergrößert und die resultierenden Sequenzen wurden anschließend kombiniert. Nach der Erfassung des Datensatzes wurden Genfragmente mit Hilfe des webbasierten Tools Galaxy (www.usegalaxy.com) aussortiert. Redundanten Sequenzen und hochgradig ähnlichen Sequenzen (>97% Identität) wurden mit dem CD-Hit-Algorithmus zu einer repräsentativen Sequenz zusammengefasst, was in 483 eindeutigen Sequenzen resultierte.²⁹⁶ Für diese finalen Sequenzen wurde ein All-by-All-BLAST durchgeführt, um die Sequenzähnlichkeiten (Linien) für alle Sequenzpaare (Knoten) durch den auf <http://efi.igb.illinois.edu/efi-est> implementierten Algorithmus zu erhalten.¹⁹⁸ Schließlich wurde das resultierende SSN mit Cytoscape visualisiert und durch Anpassung der eingebauten Sequenzidentitätsschwelle verfeinert.¹⁰³

5.3.3. Weitere verwendete Onlinetools

Für diverse Anwendungen wurde eine Reihe von Onlinetools verwendet, die in der nachfolgenden **Tabelle 21** aufgelistet sind. Der Zweck deren Nutzung wird im Folgenden ebenfalls genannt.

Tabelle 21 – Verwendete Onlinetools und deren Anwendungsbereich.

Tool	Anwendung	Zugänglich unter
ClustalW	Multiple Sequenzalignements	https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw
OligoAnalyzer™ Tool	Schmelzpunktbestimmung von Primern	https://eu.idtdna.com/calc/analyzer
Reverse Complement	Revers-Komplementierung von DNA-Sequenzen	https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Translate	Translation von DNA-Sequenzen	https://web.expasy.org/translate/
AA-Calculator	Bestimmung degenerierter Codons	http://guinevere.otago.ac.nz/cgi-bin/aef/AA-Calculator.pl
BLAST	Sequenzabgleich gegen eine Sequenzdatenbank	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Swiss-Model	Erstellen von Homologiemodellen	https://swissmodel.expasy.org/
CASTER	Evolutionstool	https://www.kofo.mpg.de/259028/ISM_tools.zip (Download)

5.4. Proteinbiochemische Methoden

5.4.1. Proteinexpression

5.4.1.1 Expression von P450 Monooxygenasen in Schüttelkolben

Expression in kleinem Maßstab (50 mL) für Screening-Zwecke

Zunächst wurde eine Vorkultur (LB-Medium, 5 mL, 100 µg/mL Ampicillin) mit einer Einzelkolonie oder aus einer Dauerkultur (1-5 µL) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Expressionskultur wurde mit 500 µL Vorkultur in 50 mL TB-Medium mit 2× Glycerin (100 µg/mL Ampicillin) in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben beimpft und für 2-3 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ = 0.6-0.8 erreicht war. Der Kolben wurde 10 min auf Eiswasser gekühlt bevor die Expression durch Zugabe von IPTG (0.2 mM) induziert wurde und 5-Aminolävulinsäure (0.5 mM) supplementiert wurde. Die induzierten Zellen wurden für 20 h bei 18°C (oder 25°C) und 180 rpm inkubiert. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation geerntet wurden (4357×g, 10 min, 4°C), wurden die erhaltenen Zellpellets bei -20°C für mindestens einen Tag vor der Verwendung gelagert.

Expression in großem Maßstab (500 mL)

Analog zum vorhergehenden Expressionsprotokoll (kleiner Maßstab) wurde zunächst eine Vorkultur kultiviert. Zur Inokulation der Hauptkultur in 500 mL TB-Medium mit 2× Glycerin (100 µg/mL Ampicillin) in einem 2 L-Kolben mit Schikanen wurden 4 mL der Vorkultur zugegeben. Die Kultur wurde für 2-3 h bei 37°C und 100 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ im Bereich von 0.6 bis 0.8 inkubiert. Der Kolben wurde 10 min auf Eiswasser gekühlt bevor die Expression durch Zugabe von IPTG (0.2 mM) induziert wurde und 5-Aminolävulinsäure (0.5 mM) zugesetzt wurde. Die Expressionskultur wurde für 20 h bei 18°C (oder 25°C) und 100 rpm inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation geerntet wurden (4357×g, 10 min, 4°C). Die erhaltenen Zellpellets wurden vor jeder Verwendung für mindestens einen Tag bei -20°C gelagert.

5.4.1.2 Expression von P450 Monooxygenasen in Deep-Well-Platten

Expression in 96-Deep-Well-Platten

Für die Expression von P450-Varianten im 96-Deep-Well-Format wurde zunächst eine Übernachtskultur-Platte (96er Ritter riplate SW, 2 mL, Ritter GmbH) mit TB-Medium (2× Glycerin, 100 µg/mL Ampicillin, 500 µL/Well) befüllt, jede Kammer mit einer Einzelkolonie inokuliert und mit einem Verschlussfilm für biologische Kulturen beklebt. Die Platte wurde für 20 h bei 37°C und 250 rpm in mit Wasserdampf gesättigter Luft inkubiert. Die Expressionskultur-Platte wurde anschließend mit 50 µL/Well der Übernachtskultur in 610 µL/Well TB-Medium (2× Glycerin, 100 µg/mL Ampicillin) inokuliert und für 4 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nachdem die Platte für 10 min auf Eiswasser abgekühlt wurde, wurde die Expression mit 40 µL/Well Induktionsmix in TB-Medium (0.2 mM IPTG, 0.5 mM 5-Aminolävulinsäure, Endkonzentration) induziert und für weitere 20 h bei 25°C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (3220×g, 10 min, 4°C) und bei -20°C für mindestens einen Tag gelagert.

Expression in 24-Deep-Well-Platten

Die Expression von P450-Varianten wurde für höhere Zellausbeuten auch in 24-Deep-Well-Platten durchgeführt. Für die Übernachtskultur-Platte (24er Ritter riplate SW, 10 mL, Ritter GmbH) wurde jede Kammer mit TB-Medium (2× Glycerin, 100 µg/mL Ampicillin, 4 mL/Well) befüllt, mit einer Einzelkolonie inokuliert und mit einem Verschlussfilm für biologische Kulturen beklebt. Die Kultur wurde für 20 h bei 37°C und 250 rpm unter Feuchtigkeitskontrolle inkubiert. Expressionskulturen wurden anschließend mit 300 µL der Vorkultur in 3.6 mL/Well TB-Medium (2× Glycerin, 100 µg/mL Ampicillin) beimpft und für 4 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Platte wurde daraufhin 10 min auf Eiswasser gekühlt, bevor die Kultur mit 100 µL/Well eines

Induktionsmix (0.2 mM IPTG, 0.5 mM 5-Aminolävulinsäure, Endkonzentration) induziert wurde. Die induzierten Zellen wurden für 20 h bei 25°C und 250 rpm in mit Wasserdampf gesättigter Luft inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (3220×g, 10 min, 4°C) und bei -20 °C für mindestens einen Tag gelagert.

5.4.1.3 Expression weiterer Enzyme in Schüttelkolben

Das nachfolgende Protokoll beschreibt die Expression von KREDs (PAR und *LBv*-ADH, jeweils pET-22b), IREDs (pIR-23, pET-28b) und der Glucosedehydrogenase (GDH, pACYC): Eine mit entsprechendem Selektionsantibiotika versetzte Vorkultur (LB-Medium, 5 mL) wurde mit einer Einzelkolonie oder aus einer Dauerkultur (1-5 µL) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Expressionskultur wurde mit 4 mL Vorkultur in 500 mL TB-Medium (2× Glycerin, mit entsprechendem Selektionsantibiotika versetzt) in einem 2 L-Kolben mit Schikanen beimpft und für 2-3 h bei 37°C und 100 rpm inkubiert bis eine $OD_{600} = 0.6-0.8$ erreicht war. Der Kolben wurde anschließend 10 min auf Eiswasser gekühlt bevor die Expression durch Zugabe von IPTG (0.2 mM) induziert wurde. Die Expressionskultur wurde für 20 h bei 18°C (oder 25°C) und 100 rpm inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation geerntet wurden (4357×g, 10 min, 4°C). Die erhaltenen Zellpellets wurden vor jeder Verwendung für mindestens einen Tag bei -20°C gelagert.

5.4.2. Zellaufschluss

Die pelletierten und eingefrorenen Zellen wurden durch Zugabe von Lysepuffer (3 mL je 1 g Zell-Nassgewicht, 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, 2% (m/v) Glycerin, 1 mg/ml Lysozym, 0.2 mg/ml DNaseI, pH = 8) enzymatisch lysiert. Der Zellaufschluss erfolgte für 4 h bei 4°C unter gelegentlichem Homogenisieren der Suspension. Zelltrümmer und Schwebstoffe wurden anschließend durch Zentrifugation (20238×g in 2 mL Reaktionsröhrchen, 3220×g in Deep-Well-Platten, 4°C, 10 min) abgetrennt. Das überstehende Zelllysate mit dem in Lösung befindlichen Zielprotein wurde abgenommen und bis zur Verwendung kurzfristig bei 4°C gelagert.

5.4.3. Proteinreinigung

Die Isolierung von Cytochrom P450 Monooxygenasen erfolgte über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung eines ÄKTA-Reinigers. Dazu wurden alle zu reinigenden Enzyme mit einem C-terminalen Poly-His₆-Tag exprimiert, welches eine Interaktion mit Metallionen wie Co^{2+} oder Ni^{2+} ermöglicht, sodass die Zielproteine selektiv an das

Säulenmaterial binden. Für die Proteinreinigung wurde im Speziellen eine Nickel-NTA-Säule (5 mL HisTrap HP, GE Healthcare) verwendet, welche vor der Benutzung zunächst mit 25 mL Waschpuffer (0.05 M TRIS, 0.05 M NaCl, 0.01 M Imidazol, 10% m/v Glycerin, pH =8) äquilibriert wurde. Daraufhin wurde die Säule mit Lysat beladen, welches zuvor mittels Spritzenvorsatzfilter (0.45 µm Porengröße, PES) von Schwebstoffen befreit wurde. Verunreinigungen sowie weitere Proteine mit geringer Affinität wurden in einem Waschschrift mit fünf Säulenvolumina Waschpuffer von der Säule gewaschen. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 100% Waschpuffer zu 100% Elutionspuffer (0.05 M TRIS, 0.05 M NaCl, 0.25 M Imidazol, 10% m/v Glycerin, pH =8) über 7.5 Säulenvolumina eluiert. Schließlich wurde die Säule mit Waschpuffer (25 mL), dH₂O (25 mL) und wässriger Ethanol-Lösung (20% v/v, 25 mL) gespült und bis zur nächsten Nutzung bei 4°C gelagert. Die Reinheit der gesammelten Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE Analyse evaluiert und die gewünschten Fraktionen kombiniert. Diese wurden im Folgenden in einen Dialyseschlauch überführt (Spectra/Por® 1, MWCO = 6-8 kDa, Spectrum Laboratories) und in 2 L Dialysepuffer über Nacht und in weiteren 2 L Dialysepuffer für 4 h dialysiert, um das enthaltene Imidazol zu entfernen. Die hochkonzentrierte Proteinlösung wurde aliquotiert (200 µL), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

5.4.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels CO-Differenzspektroskopie

Die CO-Differenzspektroskopie ist eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Häm-Proteinen wie Cytochrom P450 Monooxygenasen in Lösung.^{48,297} Das Prinzip basiert auf der Differenzbildung der Absorption bei 450 nm von reduziertem Häm-Eisen und reduziertem Häm-Eisen, das von dem starken Ligand Kohlenmonoxid koordiniert wird (Soret-Bande). Zur Reduktion des Häm-Eisens wurde Lysat (900 µL) mit einer Lösung von Natriumdithionit in Lysepuffer (100 µL, 300 mM) versetzt und die Absorption bei 420, 450 und 490 nm spektralphotometrisch bestimmt (GENESYS™ 50 UV-Vis Photometer, Thermo Fisher Scientific). Eine gleich präparierte Lösung wurde für 45 s mit CO begast (1 Gasblase/s). Nach einminütiger Inkubation bei 4°C wurde ebenfalls die Absorption bei denselben Wellenlängen wie zuvor bestimmt. Die P450-Konzentration wurde aus dem Differenzverhältnis zwischen den ermittelten Absorptionswerten bei 450 nm und 490 nm unter Anwendung der folgenden Formel berechnet:

$$c(\text{P450}) = \frac{\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}(\Delta\text{Abs.}(450 \text{ nm} - 490 \text{ nm})) - \text{Fe}^{\text{II}}(\Delta\text{Abs.}(450 \text{ nm} - 490 \text{ nm}))}{l \cdot \varepsilon} \cdot \text{VF}$$

c(P450):	P450-Konzentration [µM]
ΔAbs. (450 nm – 490 nm):	Differenz der Absorptionsmaxima bei 450 nm und 490 nm
VF:	Verdünnungsfaktor
ε:	Extinktionskoeffizient [91000 M ⁻¹ cm ⁻¹]
l:	Schichtdicke der Küvette [1 cm]

5.4.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteingemischen gemäß ihrem Molekulargewicht und zur anschließenden qualitativen Analyse wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Hierzu wurden Mini-ProteanTGX Gele (BioRad) in TRIS/Glycin/SDS-Puffer für die Elektrophorese verwendet (**Tabelle 15**). Die zu analysierenden Proben (0.75-1.00 µL Lysat) wurden mit 4× SDS-Ladepuffer (6 µL) und ddH₂O (17 µL) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Im Folgenden wurden 20 µL der jeweiligen Probe sowie ein Größenstandard (5 µL, Color Prestained Protein Standard, Broad Range, 10-250 kDa, New England Biolabs) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit einem Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad) für 30 min bei einer Spannung von 200 V. Nach abgeschlossener Trennung wurde das Gel entnommen und für 2 h mit Färbelösung angefärbt. Abschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch eine Behandlung mit Entfärbelösung über Nacht entfernt.

5.5. Biotransformationen und Probenaufbereitung

5.5.1. High-Throughput-Screening im 96-Deep-Well-Format

Zu den pelletierten und gefrorenen Zellen wurden 300 µL/Well Lysepuffer (0.1 M NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, 2% m/v Glycerin, pH = 8, 1 mg/mL Lysozym, 0.2 mg/mL DNaseI) für den Zellaufschluss zugegeben und die Platte für 4 h bei 4°C und unter gelegentlichem Schütteln (sonst 400 rpm) inkubiert. Daraufhin wurde die Platte zentrifugiert (3220×g, 10 min, 4°C) und es wurden 150 µL/Well des Lysats in eine andere 96-Deep-Well-Platte überführt, die bereits mit 10 µL/Well Substratlösung (*trans*-β-Methylstyren gelöst in einem 1:1:0.55 Gemisch aus DMSO, Isopropanol und Wasser, 15 mM Endkonzentration) und 240 µL/Well NADH-Pufferlösung (5 mM Endkonzentration) befüllt war. Die Platte wurde mit selbstklebender Polystyrolfolie verschlossen und für 2 h bei 25°C und 400 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 600 µL/Well Acetonitril und sorgfältiger Durchmischung wurde die Mischung 30 min ruhend inkubiert. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation (3220×g, 10 min, 25°C) pelletiert und 150 µL/Well des Überstands wurden durch Zentrifugalfiltration (AcroPrep™ Advance 96 Filterplatte, 0.2 µm PTFE, Pall Corporation) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (*round bottom*, Polypropylen, Corning) übertragen. Die Mikrotiterplatte wurde mit Aluminiumfolie heiß versiegelt (*heat sealing*) und die Proben wurden schließlich mittels UHPLC analysiert.

5.5.2. *In vitro* Biotransformationen mit P450 Monooxygenasen

Für *in vitro* Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen wurde ein definiertes Volumen an Lysat (0.625 μ M Enzym-Endkonzentration) eingesetzt. Das Lysat, 80 μ L NADH-Pufferlösung (5 mM Endkonzentration) und 16 μ L Substratlösung (*trans*- β -Methylstyren oder ein anderes internes Alken in Isopropanol, 5 mM Endkonzentration) in Biotransformationspuffer (0.1 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, 2% m/v Glycerin, pH = 8, 800 μ L Endvolumen) wurden in einem 2 mL-Schraubfläschchen gemischt und dieses dicht verschlossen. Die Mischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur und 400 rpm (Tischschüttler, 8 mm Orbital) inkubiert. Ein zusätzliches Volumen Acetonitril (800 μ L) wurde zugegeben und die Probe durch kräftiges Schütteln auf einem Vortexmischer homogenisiert. Nach 30-minütiger ruhender Inkubation wurde das entstandene Präzipitat durch Zentrifugation (20238 \times g, 24°C, 10 min) pelletiert und der Überstand wurde für die anschließende UHPLC-Analyse in ein Glasvial überführt. Die absolute Umsatzzahl (TTN nach 2 h Reaktionszeit) wurden als Verhältnis zwischen gebildeter Keton-Konzentration und P450-Konzentration berechnet. Die Selektivität für das Keton wurde gemäß folgender Formel berechnet: Konz. Keton / (Konz. Keton + Konz. Epoxid + Konz. Zimtalkohol). Die Reaktionen wurden in technischen Triplikaten aus biologischen Duplikaten durchgeführt. Dieses Standardprotokoll (**Tabelle 22**) wurde zum Erreichen hoher Umsätze optimiert, indem ein Cofaktor-Regenerationssystem eingesetzt und die Reaktionszeit verlängert wurde (**Tabelle 23**).

Tabelle 22 – Komponenten einer *in vitro* Biotransformation nach Standardprotokoll, wie es zur Quantifizierung oder für *substrate scope* Studien angewendet wurde.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NADH	80 μ L	5 mM
Substratlösung (in <i>i</i> PrOH)	16 μ L	5 mM (1% v/v)
P450-Lysat	je Konz. im Lysat	0.625 μ M
Biotransformationspuffer	auf 800 μ L Endvolumen füllen	
Reaktionsbedingungen: 2 h, 400 rpm, 25°C		

Tabelle 23 – Optimiertes Biotransformations-Protokoll für maximale Umsätze unter Einsatz eines Cofaktor-Regenerationssystems.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NAD ⁺ /Glucose	80 μ L	0.5 mM/20 mM
Substratlösung (in <i>i</i> PrOH)	16 μ L	2 mM (1% v/v)
P450-Lysat	je Konz. im Lysat	0.625 μ M
GDH-Lysat	100 μ L	n.b.
Biotransformationspuffer	auf 800 μ L Endvolumen füllen	
Reaktionsbedingungen: 48 h, 400 rpm, 25°C		

5.5.3. Probenaufbereitung für GC/MS-Analysen

Für gaschromatographische Analysen wurde die Biotransformationslösung nicht in Acetonitril aufgenommen, sondern mit 800 μL MTBE durch kräftiges Schütteln auf einem Vortexmixer extrahiert. Zur Quantifizierung von Produktbildungen und Substratumsätzen wurde dem Extraktionsmittel zuvor ein interner Standard zugesetzt (0.5 mM 3-Phenyl-1-propanol). Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (20238 \times g, 24°C, 10 min) induziert und der Überstand wurde für die anschließende Analyse in ein Glasvial überführt.

5.5.4. *In vitro* Biotransformationen in Kombination mit Ketoreduktasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen und Ketoreduktasen wurden in einer Kaskadenreaktion kombiniert, um die Synthese chiraler Alkohole aus internen Alkenen zu ermöglichen. Dabei wurden die im ersten Katalyseschritt gebildeten prochiralen Carbonyle durch Ketoreduktasen selektiv reduziert. Außerdem konnten die eingesetzten Ketoreduktasen zur kontinuierlichen Rezyklisierung des Cofaktors beitragen, indem NAD^+ durch Oxidation von zugesetzten Isopropanol wieder reduziert wurde. Die Reaktionsbedingung ähneln dem Standardprotokoll (**Tabelle 22**) und sind je nach Abwandlung in den nachfolgenden Tabellen (**Tabelle 24** bis **Tabelle 26**) dargestellt. Die Analyse erfolgte entweder mittels UHPLC oder GC/MS.

Tabelle 24 – Kaskadenreaktion zur direkten Bildung chiraler Alkohole aus internen Alkenen unter Einsatz von P450-Enzymen in Kombination mit Ketoreduktasen.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NAD⁺	80 μL	0.5 mM
Substratlösung (in <i>i</i>PrOH)	16 μL	5 mM (1% v/v)
P450-Lysat	je Konz. im Lysat	0.625 μM
KRED-Lysat	100 μL	n.b.
Biotransformationspuffer	auf 800 μL Endvolumen füllen	
Reaktionsbedingungen: 2 bis 48 h, 400 rpm, 25°C		

Tabelle 25 – Screening verschiedener P450-Enzyme zur Entdeckung promiskuitiver Reaktionen.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NAD⁺/NADP⁺	80 μL	0.25 mM/0.25 mM
Substratlösung (in <i>i</i>PrOH)	16 μL	5 mM (1% v/v)
P450-Lysat	150 μL	n.b.
KRED-Lysat	100 μL	n.b.
Biotransformationspuffer	auf 800 μL Endvolumen füllen	
Reaktionsbedingungen: 2 h, 400 rpm, 25°C		

Tabelle 26 – *In vitro* Biotransformationen mit gereinigten P450s in Kombination mit PAR für die Umsetzung von Deuterium-markierten Styrenen.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NADH	80 µL	5 mM
Substratlösung (in <i>i</i> PrOH)	16 µL	5 mM (1% v/v)
Gereinigtes P450	Je ermittelter Konz.	2 - 5 µM
PAR-Lysat	100 µL	n.b.
Biotransformationspuffer	auf 800 µL Endvolumen füllen	
Reaktionsbedingungen: 2 h, 400 rpm, 25°C		

5.5.5. *In vitro* Biotransformationen in Kombination mit Iminreduktasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen und Iminreduktasen wurden in einer sequenziellen Kaskadenreaktion kombiniert, um die selektive Synthese chiraler Amine aus internen Alkenen zu ermöglichen. Dazu wurden im ersten Schritt zunächst Biotransformationen unter Einsatz der evolvierten Ketonsynthase nach optimiertem Standardprotokoll (**Tabelle 23**) durchgeführt. Anschließend wurden Iminreduktase und das gewünschte Aminnukleophil zugegeben, um eine reduktive Aminierung des zuvor gebildeten Carbonyls zu erreichen. Die Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 27** dokumentiert. Die Analyse erfolgte entweder mittels UHPLC oder GC/MS.

Tabelle 27 – Sequenzielle Kaskadenreaktion zur direkten Bildung chiraler Amine aus internen Alkenen unter Einsatz der evolvierten Ketonsynthase in Kombination mit Iminreduktasen (hier pIR-23).

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NADP ⁺ /Glucose	80 µL	0.5 mM/20 mM
Substratlösung (in <i>i</i> PrOH)	16 µL	2 mM (1% v/v)
P450-Lysat	je Konz. im Lysat	0.5 µM
GDH-Lysat	40 µL	n.b.
Biotransformationspuffer	auf 800 µL Endvolumen füllen	
1. Reaktionsschritt: 48 h, 400 rpm (Tischschüttler), 25°C		
NADP ⁺ /Glucose	80 µL	0.5 mM/20 mM
Aminnukleophil in Puffer	Je Konz. der Stammlösung	100 mM (pH ≈ 8)
pIR-23-Lysat	80/160 µL	n.b.
GDH-Lysat	40 µL	n.b.
Biotransformationspuffer	auf 1600 µL Endvolumen füllen	
2. Reaktionsschritt: 24 h, 180 rpm (Schüttelinkubator), 30°C		

5.5.6. Probenaufbereitung für die chirale HPLC-Analyse

Das zu analysierende Amin (1 mg) wurde in wässriger NaOH-Lösung (1 M, 500 μ L) aufgenommen und mit Derivatisierungsmix (1 mL, 1 M Essigsäureanhydrid in Dichlormethan) unter kräftigem Schütteln auf einem Vortexmixer für 2 min derivatisiert. Die organische Phase wurde abgenommen, mit Wasser (1 mL) gewaschen und anschließend mittels chiraler HPLC analysiert.

5.5.7. Kalibriergeraden zur Quantifizierung von Produktbildungen und Umsätzen

Zur quantitativen Bestimmung von Produktbildungen und Substratumsätzen wurden Kalibriergeraden erstellt. Während für GC/MS-Analysen Standardlösungen mit internem Standard (0.5 mM 3-Phenyl-1-propanol) angefertigt wurden, wurden für UHPLC-Analysen eine Kalibrierung mit externen Standards durchgeführt. Dazu wurden Substrat-Stammlösungen in Isopropanol (250 mM) angefertigt und entsprechend verdünnt (125, 50, 25, 10 und 5 mM, ggf. auch 2.5, 1.0 und 0.5 mM). Anschließend wurden 16 μ L der Substrat Stammlösungen zu 784 μ L Biotransformationspuffer gegeben und entweder mit 800 μ L Acetonitril gemischt (UHPLC-Analyse) oder mit 800 μ L MTBE versetzt mit internem Standard extrahiert. Die Messdaten wurden in Triplikaten erhoben und mit einer Kalibriergerade (lineare Regression) mithilfe von Excel angepasst.

5.6. Analytische Methoden

5.6.1. Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS)

Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurde mit einem Agilent GC 8860-Gerät mit Agilent 7693A-Autosampler durchgeführt, welches mit einem massenselektiven Detektor (MSD) der Serie Agilent 5977B gekoppelt war. Die Ionisierung der Analyten erfolgte durch Elektronenstoßionisation (EI) mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV. Massenspektrometrische Daten wurden entweder im Scan-Modus (50 – 300 m/z) oder im SIM-Modus (für die Masse eines molekülspezifischen und häufig vorkommenden Fragments) gemessen. Als stationäre Phase wurden verschiedene Säulen eingesetzt (**Tabelle 28**), die je nach zu analysierendem Analyt-Gemisch gewählt wurden. Helium wurde als Trägergas verwendet. Weitere Parameter und die entsprechenden Temperaturprofile sind im Folgenden je nach Anwendung angegeben (**Tabelle 29**). Falls erforderlich wurde zur Quantifizierung von Produktbildungen 3-Phenyl-1-propanol als interner Standard eingesetzt.

Tabelle 28 – Verwendete Chromatographiesäulen und deren Spezifikationen.

Säulenbezeichnung	Länge/Querschnitt/Filmdicke	Material
Agilent J&W HP-5MS UI	30 m/250 µm/0.25 µm	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxan
Agilent J&W DB-WAXetr	25 m/200 µm/0.40 µm	Polyethylenglycol (PEG)
Agilent J&W DB-HeavyWax	25 m/250 µm/0.20 µm	Polyethylenglycol (PEG)
Agilent J&W HP-CHIRAL-20β	30 m/250 µm/0.25 µm	20% β-Cyclodextrin in (35%-Phenyl)-methylpolysiloxan
Agilent J&W CP-Chirasil-Dex CB	25 m/250 µm/0.25 µm	An Dimethylpolysiloxan gebundenes Cyclodextrin

Tabelle 29 – Je nach Trennproblem wurden unterschiedliche Säulen, Temperaturprofile und Geräteparameter verwendet, welche im Folgenden aufgelistet sind. Für Messungen im SIM-Modus sind zudem die detektierten spezifischen Massen angegeben.

Anwendung	Säule, Parameter, Temperaturprofil und Analysemodus
Biotransformationen mit Styren, <i>cis</i>- oder <i>trans</i>-Styren-β-d	Agilent J&W HP-5MS UI; Injektor: 250°C, Split: 1/50, 1 µL, Flussrate: 40 cm/s; 90°C für 2 min, 5°C/min bis 100°C, 10°C/min bis 130°C, 50°C/min bis 200 min, 0.5 min halten; Scan-Modus
	Agilent J&W DB-HeavyWax; Injektor: 250°C, Split: 1/15, 1 µL, Flussrate: 60 cm/s; 115°C für 1 min, 30°C/min bis 250°C, 1 min halten; Scan- und SIM-Modus (120.1 m/z für Styroloxid und Phenylacetaldehyd, 122.1 m/z für 2-Phenylethanol, 136.1 m/z für 3-Phenyl-1-propanol)
Biotransformationen mit α- oder β-Methylstyren	Agilent J&W DB-HeavyWax; Injektor: 250°C, Split: 1/15, 1 µL, Flussrate: 60 cm/s; 115°C für 2 min, 15°C/min bis 150°C, 30°C/min bis 250°C, 0.33 min halten; Scan und SIM-Modus (117.1 m/z für 2-Methyl-3-phenyloxirane, 105.1 m/z 2-Phenylpropionaldehyd, 134.1 m/z für Propiophenon und Phenylacetone, 92.1 m/z für 1-Phenyl-2-propanol, 136.1 m/z für 1-Phenyl-1-propanol, 105.1 m/z für 2-Phenyl-1-propanol, 136.1 m/z für 3-Phenyl-1-propanol, 134.1 m/z für Zimtalkohol)
	Agilent J&W DB-WAXetr; Injektor: 250°C, Split: 1/15, 1 µL, Flussrate: 45 cm/s; 130°C für 1 min, 40°C/min bis 175°C, 30°C/min bis 250°C, 1.5 min halten; Scan- und SIM-Modus (siehe oben)

Anwendung	Säule, Parameter, Temperaturprofil und Analysemodus
Biotransformationen mit α,β-Dimethylstyren	Agilent J&W DB-HeavyWax; Injektor: 200°C, Split: 1/15, 1 μ L, Flussrate: 60 cm/s; 115°C für 2 min, 15°C/min bis 150°C, 30°C/min bis 250°C, 0.33 min halten; Scan und SIM-Modus (147.1 m/z für 2,3-Dimethyl-2-phenyloxiran, 148.1 m/z für 3-Phenylbutan-2-on, 106.1 m/z für 3-Phenylbutan-2-ol, 136.1 m/z für 3-Phenyl-1-propanol)
Universelle Screening-Methode (<i>substrate scope</i>)	Agilent J&W DB-HeavyWax; Injektor: 250°C, Split: 1/15, 1 μ L, Flussrate: 60 cm/s; 100°C für 1 min, 30°C/min bis 280°C, 4 min halten; Scan-Modus
Screening-Methode für reduktive Aminierungen	Agilent J&W DB-HeavyWax; Injektor: 250°C, Split: 1/10, 1 μ L, Flussrate: 58 cm/s; 50°C für 0.4 min, 25°C/min bis 280°C, 2.4 min halten; Scan-Modus
Chirale Analyse von Biotransformationen mit α- oder β-Methylstyren	Agilent J&W HP-CHIRAL-20 β ; Injektor: 250°C, Split: 1/15, 1 μ L, Flussrate: 45 cm/s; 105°C zu Beginn, 0.15°C/min bis 110°C, 30°C/min bis 240°C, 1 min halten; Scan-Modus
Chirale Analyse von 1-Phenylpropan-2-ol	Agilent J&W CP-Chirasil-Dex CB; Injektor: 250°C, Split: 1/15, 1 μ L, Flussrate: 45 cm/s; 110°C zu Beginn, 0.2°C/min bis 114°C, 40°C/min bis 200°C, 1.85 min halten; Scan-Modus
Chirale Analyse von Biotransformationen mit α,β-Dimethylstyren	Agilent J&W CP-Chirasil-Dex CB; Injektor: 200°C, Split: 1/5, 1 μ L, Flussrate: 45 cm/s; 110°C zu Beginn, 0.5°C/min bis 120°C, 40°C/min bis 200°C, 2 min halten; Scan- und SIM-Modus (147.1 m/z für 2,3-Dimethyl-2-phenyloxiran, 148.1 m/z für 3-Phenylbutan-2-on, 106.1 m/z für 3-Phenylbutan-2-ol, 136.1 m/z für 3-Phenyl-1-propanol)

5.6.2. Chirale Gaschromatographie

Gaschromatographische Analysen chiraler Verbindungen wurden an einem Gaschromatographen des Typs Shimadzu GC-2010 mit Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt.

Die chirale Trennung und Analyse von Styrenoxid wurde unter Verwendung einer Agilent CP-Chirasil-Dex CB-Säule (30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, CP7502) mit Wasserstoff als Trägergas

(40 cm/s Lineargeschwindigkeit) durchgeführt. Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 1/20 und 1 μ L Injektionsvolumen. Injektortemperatur: 220°C. Detektor-Temperatur: 250°C. Temperaturprofil: 70°C für 2 min, 4°C/min bis 102°C, 10°C/min bis 140°C, 30°C/min bis 190 min, 4 min halten.

Die chirale Separation und Analyse von 2-Methyl-3-phenyloxiran erfolgte unter Verwendung einer BGB-174 Säule (30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, SN 18919) mit Wasserstoff als Trägergas (47 cm/s Lineargeschwindigkeit). Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 1/10 und 1 μ L Injektionsvolumen. Injektortemperatur: 220°C. Detektor-Temperatur: 220°C. Temperaturprofil: 85°C zu Beginn, 0.2°C/min auf 90°C, 30°C/min auf 210°C, 1 min halten.

5.6.3. Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)

UHPLC-Analysen wurden mit einem Agilent 1290 Infinity II Gerät durchgeführt, das mit einem Agilent 1290 Infinity II-Diodenarraydetektor (DAD) ausgestattet war.

Das Screening von Variantenbibliotheken wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm unter Verwendung einer InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule (Agilent, 4.6 \times 50 mm, 2.7 μ M) mit einer entsprechenden Vorsäule (Poroshell 120 EC-C18, Agilent, 4.6 \times 5 mm, 2.7 μ M) durchgeführt. Für die chromatographische Trennung wurde ein binäres Laufmittelgemisch mit einem Fluss von 1 mL/min und alternierendem Gradient verwendet: Beginn mit 40% Acetonitril in reinem Wasser, linearer Gradient auf 60% Acetonitril nach 1.0 min, linearer Gradient auf 100% Acetonitril nach 1.7 min, zurück auf 40% Acetonitril nach 2.0 min, halten für 1.0 min (3.0 min Gesamtdauer pro Lauf).

Für die Quantifizierung der Produktbildung und des Substratumsatzes wurde eine Zorbax SB-C18-Säule (Agilent, RRHD, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μ m) mit einer entsprechenden Vorsäule (Zorbax SB-C18, Agilent, 2.1 \times 5 mm, 1.8 μ m) verwendet. Ein binäres Laufmittelgemisch mit alternierendem Gradient wurde bei einem Fluss von 0.6 mL/min zur Trennung der Analyten eingesetzt: Start mit 40% Methanol in reinem Wasser, linearer Gradient auf 50% Methanol nach 1.8 min, linearer Gradient auf 70% Methanol nach 2.8 min, linearer Gradient auf 100% Methanol nach 3.3 min, halten für 0.5 min, zurück auf 40% Methanol von 3.5 bis 4.0 min, halten für 0.5 min (4.5 min Gesamtdauer pro Lauf). Die Detektion der Analyten erfolgte bei 210 nm.

5.6.4. Chirale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Chirale HPLC-Analysen wurden mit einem Agilent 1290 Infinity II System unter Einsatz einer Daicel Chiralpak IC-Säule (250 × 4.6 mm, 5 µm) bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Analyten wurden mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 214 nm nachgewiesen. Ein binäres Lösungsmittelgemisch aus *n*-Hexan und 2-Propanol (0.1 % v/v Diethylamin zugesetzt) mit einem Fluss von 1 mL/min und alternierendem Gradient wurde wie folgt verwendet: Zu Beginn 98% *n*-Hexan für 80 min, linearer Gradient zu 75% *n*-Hexan nach 81 min, halten für 9 min, linearer Gradient zurück zu 98% *n*-Hexan bis 91 min, halten für 9 min (100 min Gesamtdauer pro Lauf).

5.6.5. Polarimetrie

Die Bestimmung des spezifischen Drehwertes einer chiralen Verbindung wurde mit einem Perkin Elmer (Modell 341) Polarimeter unter Verwendung einer Natriumlampe ($\lambda = 589 \text{ nm}$) durchgeführt.

5.6.6. Hochauflösende Massenspektrometrie

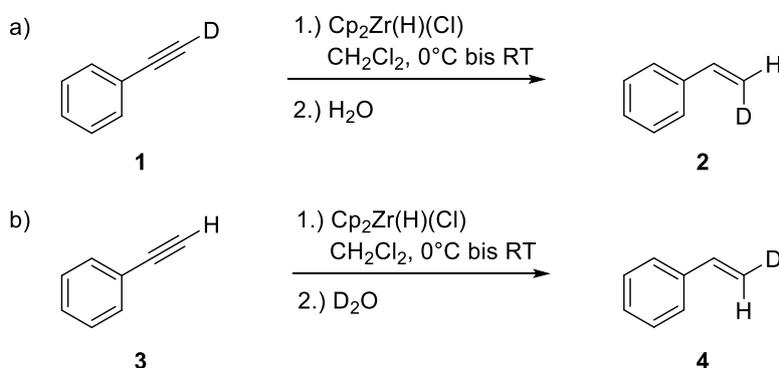
Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde mit einem Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS durchgeführt, welches mit einer Luna® 3 µm C18(2) 100 Å LC-Säule (100 × 2 mm) ausgestattet war. Ein binäres Lösungsmittelgemisch aus 75% Acetonitril und 25% Wasser (0.1% v/v Ameisensäure zugesetzt) wurde für die isokratische Elution innerhalb von 4 min verwendet. Massenspektrometrische Parameter: positive Ionenpolarität; duale ESI-Ionenquelle. Die HRMS-Daten werden wie folgt angegeben: berechnete exakte Masse; gefundene exakte Masse in (*m/z*).

5.6.7. NMR-Spektroskopie

¹H-, ¹³C-, ¹⁹F-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance III HD 700, 500 oder 400 Spektrometer bei einer Frequenz von 700, 500 oder 400 MHz (Protonen) aufgenommen. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in CDCl₃ durchgeführt. Chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben und sind auf das Signal des Lösemittels oder Tetramethylsilan (TMS) referenziert. Kopplungskonstanten (*J*) sind als Frequenzen in Hertz (Hz) angegeben. Signalmultiplizitäten sind in der üblichen Form wie folgt vermerkt: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, dt = Dublett von Tripletts, t = Triplet, q = Quartett, dq = Dublett von Quartetts, quin = Quintett, sex = Sextett, seq = Septett, m = Multiplet.

5.7. Chemische Synthesen

5.7.1. Synthese von Deuterium-markierten Styrenen



Unter Stickstoffatmosphäre wurde Zirkonocenhydrochlorid (2.09 g, 7.70 mmol) in zwei Portionen in wasserfreiem Dichlormethan (20.0 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von a) Phenylacetylen- d_1 (**1**, 784 μL , 7.00 mmol) oder b) Phenylacetylen (**3**, 784 μL , 7.00 mmol) wurden die Reaktionsgemische im Dunkeln gehalten, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h lang gerührt. Anschließend wurde entweder a) H_2O (1.00 mL) oder b) D_2O (1.0 mL) zugegeben und die Reaktionsgemische weitere 2 h gerührt. Die entstandenen Gemische wurden mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum auf jeweils ca. 5 mL konzentriert (Rotationsverdampfer ohne Heizung). Pentan (10 mL) wurde zugegeben und die entstandenen Suspensionen wurden mit Pentan als Eluent über eine Schicht aus Kieselgel filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum aufkonzentriert (Rotationsverdampfer ohne Heizung) und mittels Kugelrohr-Destillation fraktioniert. Produktfraktionen sowohl für a) *cis*-Styren- β - d (**2**) als auch für b) *trans*-Styren- β - d (**4**) wurden als farblose Flüssigkeit isoliert (jeweils ca. 200 μL), die >95% d -Inkorporation und 2-3% verbleibendes Pentan als Resultat der NMR-Analyse zeigten. NMR-Spektren sind in Kapitel 7.4. angehängt.

a) *cis*-Styren- β - d (**2**)

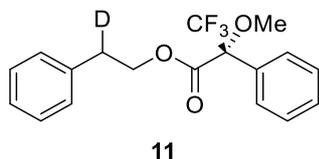
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.42 – 7.40 (m, 2H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 7.26 – 7.24 (m, 1H), 6.72 (dt, J = 10.8 Hz, 2.6 Hz, 1H), 5.22 (d, J = 11.0 Hz, 1H) ppm; ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 137.6, 136.8, 128.5, 127.8, 126.2, 113.5 (t, J = 23.6 Hz) ppm; GC/MS (m/z): 105, 104, 79, 78.

b) *trans*-Styren- β - d (**4**)

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.42 – 7.40 (m, 2H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 7.26 – 7.24 (m, 1H), 6.71 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 17.6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 137.6, 136.8, 128.5, 127.8, 126.2, 113.5 (t, J = 24.6 Hz) ppm; GC/MS (m/z): 105, 104, 79, 78.

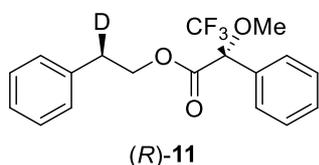
erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.45 - 7.43$ (m, 2H), $7.42 - 7.35$ (m, 3H), $7.31 - 7.28$ (m, 2H), $7.26 - 7.24$ (m, 1H), $7.21 - 7.19$ (m, 2H), 4.56 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), $3.07 - 2.99$ (m, 2H) ppm.

(rac)-2-Phenylethyl-2-d (2R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat (11)

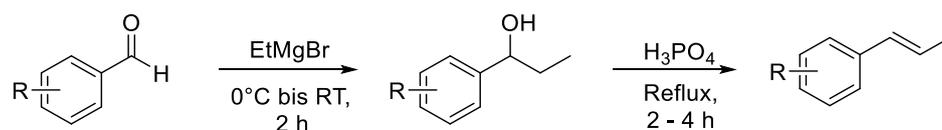


(*S*)-(+)-MTPA-Cl (**43**, 28.8 μL , 0.15 mmol, 1.9 eq.) wurde zu einer Lösung von (*rac*)-2-Phenylethan-2-*d*-1-ol (**8**, 10.0 mg, 0.08 mmol, 1 eq.) und Pyridin (20.3 μL , 25.1 mmol, 3.1 eq.) in Dichlormethan (1 mL) gegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde direkt durch präparative DC an Kieselgel (9:1 Cyclohexan/Ethylacetat) gereinigt. Die Analytbande mit dem höchsten Retentionsfaktor wurde durch Abkratzen gesammelt, mit Dichlormethan extrahiert, filtriert und im Vakuum konzentriert. Der (*rac*)-*d*-Mosher-Ester **11** (89%, 24.4 mg, 0.07 mmol) wurde als gelbes Öl isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.45 - 7.43$ (m, 2H), $7.42 - 7.35$ (m, 3H), $7.31 - 7.28$ (m, 2H), $7.26 - 7.24$ (m, 1H), $7.21 - 7.19$ (m, 2H), 4.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), $3.05 - 2.98$ (m, 1H) ppm.

(R)-2-Phenylethyl-2-d (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((R)-11)

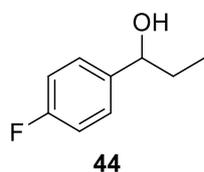


(*S*)-(+)-MTPA-Cl (**43**, 27.9 μL , 0.15 mmol, 1.9 eq.) wurde zu einer Mischung aus (*R*)-2-Phenylethan-2-*d*-1-ol ((*R*)-**8**, 9.66 mg, 0.08 mmol, 1 eq.) und Pyridin (19.6 μL , 24.3 mmol, 3.1 eq.) in Dichlormethan (1 mL) gegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde direkt mittels präparative DC (9:1 Cyclohexan/Ethylacetat) gereinigt. Die Analytbande mit dem höchsten Retentionsfaktor wurde durch Abkratzen gesammelt. Extraktion des Produkts mit Dichlormethan, Filtrieren und Konzentrieren im Vakuum ergaben den (*R*)-*d*-Mosher-Ester (*R*)-**11** (94%, 25.2 mg, 0.07 mmol) als gelbes Öl. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.45 - 7.43$ (m, 2H), $7.42 - 7.35$ (m, 3H), $7.31 - 7.28$ (m, 2H), $7.26 - 7.24$ (m, 1H), $7.21 - 7.19$ (m, 2H), 4.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H) ppm.

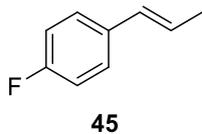
5.7.4. Synthese von substituierten *trans*- β -Methylstyren-Derivaten

Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Lösung eines substituierten Benzaldehyds (30.0 mmol, 1 eq.) in Diethylether (50 mL) zu einer Lösung von Ethylmagnesiumbromid (14.5 mL, 3 M in Diethylether, 43.5 mmol, 1.45 eq.) unter Eiskühlung über einen Zeitraum von 1 h zugetropft. Nach abgeschlossener Zugabe wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf Eis gegossen und mit 2 M Salzsäure angesäuert, bis der gebildete Niederschlag vollständig verschwand. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (2×50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO_3 -Lösung (10% w/v, 50 mL), dH_2O (50 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (50 mL) gewaschen und anschließend über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde das 1-Phenylpropanol-Derivat als ölige Flüssigkeit erhalten.

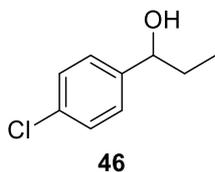
Ohne weitere Reinigung wurden das Rohprodukt (14.7 mmol, 1 eq.) und Phosphorsäure (0.43 mL, 7.35 mmol, 85% w/v, 0.5 eq.) für 2-4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts (ermittelt mittels DC) wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung (50 mL) neutralisiert. Nach Extraktion mit Ethylacetat (2×50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit dH_2O (50 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (50 mL) gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet, filtriert, eingengt und durch Säulenchromatographie an Kieselgel (100% Cyclohexan) gereinigt. Das gewünschte *trans*- β -Methylstyren-Derivat wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Das *E/Z*-Verhältnis wurde für jede Verbindung mittels NMR-Analyse individuell bestimmt.

1-(4-Fluorophenyl)propan-1-ol (**44**)

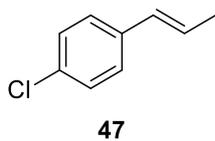
Synthese aus 4-Fluorbenzaldehyd (3.72 g, 30.0 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁴ Das Produkt 1-(4-Fluorphenyl)-propan-1-ol (**44**) wurde als ölige Flüssigkeit isoliert (4.62 g, 29.4 mmol, 99%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁹⁸ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.25 - 7.22$ (m, 2H), 6.97 - 6.94 (m, 2H), 4.51 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 1.77 (bs, 1H), 1.74 - 1.61 (m, 2H), 0.83 (t, $J = 8.2$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.2$ (d, $J = 245.2$ Hz), 140.3 (d, $J = 2.7$ Hz), 127.6 (d, $J = 8.2$ Hz), 115.2 (d, $J = 21.4$ Hz), 75.4, 32.0, 10.1 ppm.

(E)-1-Fluoro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (45)

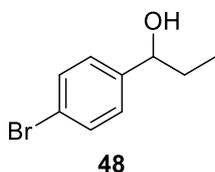
Synthese durch Eliminierung von 1-(4-Fluorphenyl)propan-1-ol (**44**, 2.27 g, 14.7 mmol) gemäß Literaturprotokoll.²⁵⁵ Die gewünschte Verbindung (*E*)-1-Fluor-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**45**, 0.76 g, 5.48 mmol, 37%) wurde als farblose Flüssigkeit mit einem *E/Z*-Verhältnis von 95/5 erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁹⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.29 (m, 2H), 7.01 – 6.98 (m, 2H), 6.39 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.18 (dq, *J* = 15.8, 6.5 Hz, 0.95H, (*E*)), 5.80 (dq, *J* = 11.6, 7.2 Hz, 0.05H, (*Z*)), 1.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 161.8 (d, *J* = 245.2 Hz), 134.1 (d, *J* = 2.9 Hz), 129.9, 127.2, 127.1, 125.4 (d, *J* = 2.4 Hz), 115.3 (d, *J* = 21.7 Hz), 18.4 ppm.

1-(4-Chlorophenyl)propan-1-ol (46)

Synthese aus 4-Chlorobenzaldehyd (4.22 g, 30.0 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁴ Das Produkt 1-(4-Chlorophenyl)-propan-1-ol (**46**) wurde als ölige Flüssigkeit isoliert (4.91 g, 28.8 mmol, 96%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁰ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.26 (m, 4H), 4.58 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 1.88 (s, 1H), 1.74 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 143.0, 133.1, 128.5, 127.3, 75.3, 31.9, 9.9 ppm.

(E)-1-Chloro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (47)

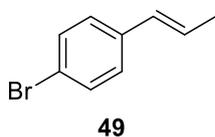
Synthese durch Eliminierung von 1-(4-Chlorophenyl)propan-1-ol (**46**, 2.50 g, 14.7 mmol) gemäß Literaturprotokoll.²⁵⁵ Die gewünschte Verbindung (*E*)-1-Chloro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**47**, 1.11 g, 7.30 mmol, 50%) wurde als farblose Flüssigkeit mit einem *E/Z*-Verhältnis von 94/6 erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁹⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.31 – 7.20 (m, 4H), 6.35 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.21 (dq, *J* = 15.8, 6.5 Hz, 0.94H, (*E*)), 5.80 (dq, *J* = 11.6, 7.2 Hz, 0.06H, (*Z*)), 1.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 136.4, 132.3, 129.9, 128.6, 127.0, 126.5, 18.4 ppm.

1-(4-Bromophenyl)propan-1-ol (48)

Synthese aus 4-Bromobenzaldehyd (5.55 g, 30.0 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁴ Das Produkt 1-(4-Bromophenyl)-propan-1-ol (**48**) wurde als ölige Flüssigkeit isoliert (6.21 g, 28.9 mmol, 96%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁹⁸ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.46 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 4.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H),

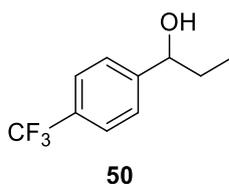
1.92 (s, 1H), 1.74 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 143.5, 131.5, 127.7, 121.2, 75.3, 31.9, 9.9$ ppm.

(*E*)-1-Bromo-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (49)



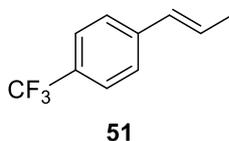
Synthese durch Eliminierung von 1-(4-Bromophenyl)propan-1-ol (**48**, 3.15 g, 14.7 mmol) gemäß Literaturprotokoll.²⁵⁵ Die gewünschte Verbindung (*E*)-1-Bromo-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**49**, 1.52 g, 7.75 mmol, 53%) wurde als farbloser Feststoff mit einem *E/Z*-Verhältnis von 95/5 erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁹⁹ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.44$ (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 6.37 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.26 (dq, $J = 15.8, 6.6$ Hz, 0.95H, (*E*)), 5.86 (dq, $J = 11.7, 7.2$ Hz, 0.05H, (*Z*)), 1.90 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.9, 131.5, 129.9, 127.4, 126.6, 120.4, 18.5$ ppm.

1-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)propan-1-ol (50)

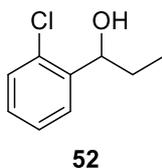


Synthese aus 4-(Trifluoromethyl)benzaldehyd (5.22 g, 30.0 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁴ Das Produkt 1-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)propan-1-ol (**50**) wurde als ölige Flüssigkeit isoliert (6.12 g, 29.9 mmol, 99%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰¹ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.53$ (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 4.61 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 1.86 (bs, 1H), 1.78 – 1.65 (m, 2H), 0.86 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 148.5, 129.6$ (q, $J = 32.0$ Hz), 126.2, 125.3 (q, $J = 3.7$ Hz), 124.3 (q, $J = 271.9$ Hz), 75.3, 32.1, 9.9 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (471 MHz, CDCl_3): $\delta = -62.4$ (s) ppm.

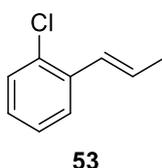
(*E*)-1-(Prop-1-en-1-yl)-4-(trifluoromethyl)benzen (51)



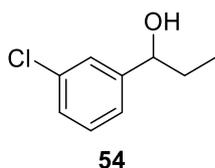
Synthese durch Eliminierung von 1-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)propan-1-ol (**50**, 3.00 g, 14.7 mmol) gemäß Literaturprotokoll.²⁵⁵ Die gewünschte Verbindung (*E*)-1-(Prop-1-en-1-yl)-4-(trifluoromethyl)benzen (**51**, 1.31 g, 7.06 mmol, 48%) wurde als farbloser Feststoff mit einem *E/Z*-Verhältnis von 90/10 erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰² $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.55$ (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 6.45 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.37 (dq, $J = 15.7, 6.3$ Hz, 0.90H, (*E*)), 5.93 (dq, $J = 11.7, 7.2$ Hz, 0.10H, (*Z*)), 1.94 (dd, $J = 6.4, 1.3$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 141.4, 129.9, 129.0, 128.6, 125.9, 125.4$ (q, $J = 3.5$ Hz), 123.4, 18.6 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (471 MHz, CDCl_3): $\delta = -62.4$ (s) ppm.

1-(2-Chlorophenyl)propan-1-ol (52)

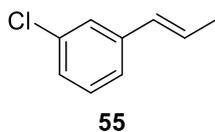
Synthese aus 2-Chlorobenzaldehyd (4.22 g, 30.0 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁴ Das Produkt 1-(2-Chlorophenyl)-propan-1-ol (**52**) wurde als ölige Flüssigkeit isoliert (4.86 g, 28.5 mmol, 95%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰³ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.57 (m, 1H), 7.36 – 7.30 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 5.1 (m, 1H), 1.99 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 1.89 – 1.73 (m, 2H), 1.02 (t, J = 7.5 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 141.9, 131.9, 129.4, 128.4, 127.2, 127.0, 71.9, 30.5, 10.1 ppm.

(E)-1-Chloro-2-(prop-1-en-1-yl)benzen (53)

Synthese durch Eliminierung von 1-(2-Chlorophenyl)propan-1-ol (**52**, 2.50 g, 14.7 mmol) gemäß Literaturprotokoll.²⁵⁵ Die gewünschte Verbindung (*E*)-1-Chloro-2-(prop-1-en-1-yl)benzen (**53**, 0.56 g, 3.64 mmol, 25%) wurde als farblose Flüssigkeit mit einem *E/Z*-Verhältnis von 96/4 erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁴ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.51 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.24 – 7.14 (m, 2H), 6.81 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.26 (dq, J = 15.8, 6.7 Hz, 0.96H, (*E*)), 5.95 (dq, J = 11.6, 7.1 Hz, 0.04H, (*Z*)), 1.96 (dd, J = 6.8, 1.6 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 135.9, 132.4, 129.6, 128.7, 127.8, 127.3, 126.7, 126.6, 18.8 ppm.

1-(3-Chlorophenyl)propan-1-ol (54)

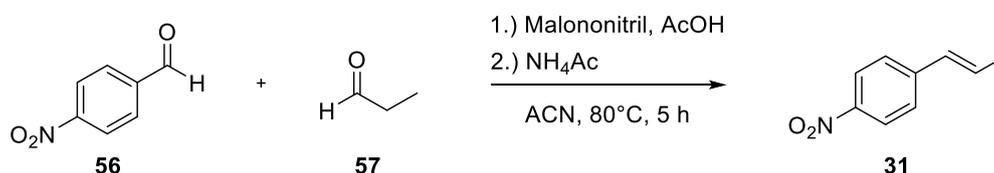
Synthese aus 3-Chlorobenzaldehyd (4.22 g, 30.0 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁴ Das Produkt 1-(3-Chlorophenyl)-propan-1-ol (**54**) wurde als ölige Flüssigkeit isoliert (4.81 g, 28.2 mmol, 94%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰³ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.28 (m, 1H), 7.21 – 7.13 (m, 3H), 4.51 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 1.82 (bs, 1H), 1.76 – 1.63 (m, 2H), 0.85 (t, J = 7.5 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 146.7, 134.3, 129.7, 127.6, 126.2, 124.1, 75.3, 31.9, 10.0 ppm.

(E)-1-Chloro-3-(prop-1-en-1-yl)benzen (55)

Synthese durch Eliminierung von 1-(3-Chlorophenyl)propan-1-ol (**54**, 2.50 g, 14.7 mmol) gemäß Literaturprotokoll.²⁵⁵ Die gewünschte Verbindung (*E*)-1-Chloro-3-(prop-1-en-1-yl)benzen (**55**, 1.13 g, 7.42 mmol, 50%) wurde als farblose Flüssigkeit mit einem *E/Z*-Verhältnis von 94/6 erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁵ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.34 (m, 1H), 7.25 – 7.17 (m, 3H), 6.37 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 6.28 (dq, J = 15.9, 6.5 Hz, 0.94H, (*E*)), 5.87 (dq, J = 11.7, 7.3 Hz, 0.06H, (*Z*)),

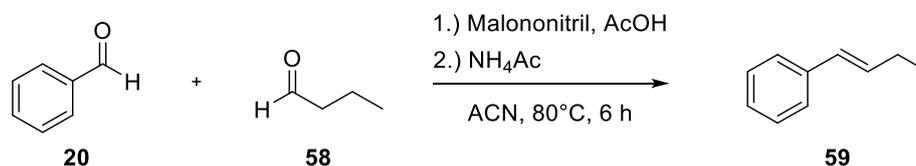
1.91 (dd, $J = 6.6, 1.3$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 139.8, 134.4, 129.8, 129.7, 127.4, 126.7, 125.8, 124.0, 18.4$ ppm.

(*E*)-1-Nitro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**31**)



Gemäß Literaturprotokoll²⁵⁶ wurde Malononitril (1.09 g, 16.5 mmol, 2.5 eq.) in Acetonitril (40 ml) gelöst, bevor 4-Nitrobenzaldehyd (**56**, 1.00 g, 6.62 mmol, 1 eq.), Propanal (**57**, 0.48 g, 8.27 mmol, 1.25 eq.) und Essigsäure (0.75 g, 12.4 mmol, 1.88 eq.) unter Rühren zugegeben wurden. Nach 10 min wurde Ammoniumacetat (0.64 g, 8.27 mmol, 1.25 eq.) zur Reaktionslösung gegeben und die Mischung weitere 5 h bei 80°C gerührt. Die Produktlösung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 ml) aufgenommen und mit Ethylacetat (3 × 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (10% Ethylacetat in Petrolether) gereinigt und (*E*)-1-Nitro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**31**) wurde als gelber Feststoff erhalten (0.19 g, 1.15 mmol, 17%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁶ ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.15$ (m, 2H), 7.44 (d, 2H), 6.46 (m, 2H), 2.23 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 146.6, 144.4, 131.2, 129.5, 126.2, 124.0, 18.8$ ppm.

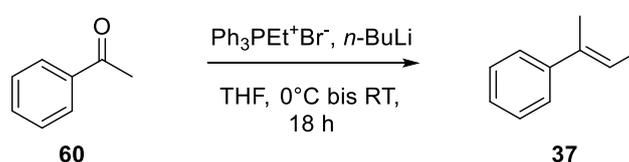
(*E*)-But-1-en-1-ylbenzen (**59**)



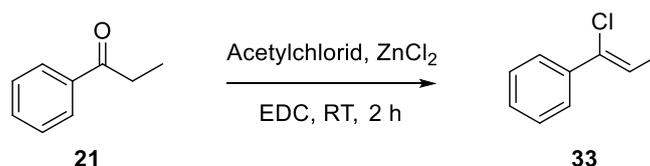
Malononitril (1.56 g, 23.6 mmol, 2.5 eq.) wurde in Acetonitril (40 ml) gelöst, bevor Benzaldehyd (**20**, 1.00 g, 9.42 mmol, 1 eq.), Butanal (**58**, 0.85 g, 11.8 mmol, 1.25 eq.) und Essigsäure (1.06 g, 17.7 mmol, 1.88 eq.) unter Rühren zugegeben wurden. Nach 10 min wurde Ammoniumacetat (0.91 g, 11.8 mmol, 1.25 eq.) zur Reaktionslösung gegeben und die Mischung für 6 h bei 80°C gerührt. Die Produktlösung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 ml) aufgenommen und mit Ethylacetat (4 × 50 ml)

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel erneut unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (3% Ethylacetat in Petrolether) gereinigt und (*E*)-But-1-en-1-ylbenzen (**59**) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten (0.27 g, 2.00 mmol, 21%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁹⁹ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.34$ (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 6.38 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.27 (dt, $J = 16.0, 6.6$ Hz, 1H), 2.23 (m, 2H), 1.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 137.9, 132.6, 128.8, 128.5, 126.7, 125.9, 26.1, 13.6$ ppm.

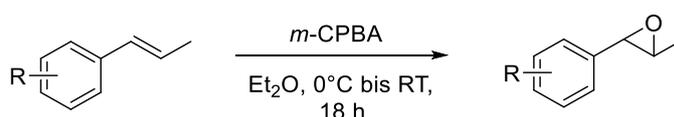
(*E*)-But-1-en-1-ylbenzen (*trans*-**37**)



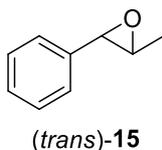
Die Synthese einer Mischung von (*E/Z*)-But-2-en-2-ylbenzen (**37**) wurde nach einem Protokoll von Pratsch und Overman durchgeführt.²⁵⁷ Dazu wurde ein Gemisch aus Ethyltriphenylphosphoniumbromid (5.40 g, 30.0 mmol, 1.5 eq.) in trockenem THF (40 mL) unter Argon-Atmosphäre auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurde *n*-Butyllithium (2.5 M Lösung in Hexan, 12.0 mL, 30.0 mmol, 1.5 eq.) tropfenweise über 10 min unter Rühren zugegeben. Das Gemisch wurde für eine weitere Stunde bei 0°C gerührt. Eine Lösung von Acetophenon (**60**, 2.40 g, 20.0 mmol, 1.0 eq.) in trockenem THF (15 mL) wurde über 10 min bei 0°C zugetropft, bevor das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Nach Rühren über Nacht wurde die Reaktion schließlich mit einer gesättigten Kochsalzlösung (100 mL) gequenchet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Pentan (3×100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (100% Pentan) lieferte eine 1.7:1-Mischung von (*E/Z*)-But-2-en-2-ylbenzen (**37**, 2.10 g, 15.9 mmol, 80%) als farblose Flüssigkeit. Das Isomerengemisch wurde mittels Säulenchromatographie (100% Pentan) gereinigt, um (*E*)-But-2-en-2-ylbenzen (*trans*-**37**) in kleinen Mengen zu erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^{257,307} $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.39$ (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 5.89 (dq, $J = 6.8, 1.5$ Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.83 (d, $J = 7.0$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 144.1, 135.5, 128.1, 126.4, 125.5, 122.5, 15.5, 14.3$ ppm.

(Z)-(1-Chlorprop-1-en-1-yl)benzen (33)

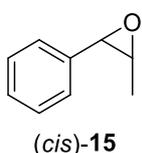
Nach einem Literaturprotokoll³⁰⁸ wurden Acetylchlorid (17.1 mL, 240 mmol, 8.0 eq.) und Propiophenon (**21**, 3.99 mL, 30.0 mmol, 1.0 eq.) in wasserfreiem 1,2-Dichlorethan (30 mL) gelöst. Pulverförmiges ZnCl₂ (2.04 g, 15.0 mmol, 0.5 eq.) wurde portionsweise unter Rühren zu der Lösung gegeben. Nach 1 h wurde die Lösung filtriert und mit wässriger NaHCO₃-Lösung (10% w/v, 3 × 50 mL) gewaschen. Die wässrige Lösung wurde mit Dichlormethan (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (0.5% Diethylether in Pentan) gereinigt und (Z)-(1-Chlorprop-1-en-1-yl)benzen (**33**) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten (3.51 g, 23.0 mmol, 77%). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁸ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.59 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 3H), 6.23 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 138.4, 133.8, 128.3, 128.2, 126.3, 122.4, 15.1 ppm.

5.7.5. Synthese von substituierten 2-Methyl-3-phenyloxiran-Derivaten

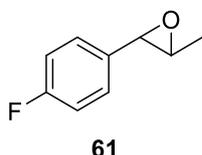
Eine Lösung eines β-Alkylstyren-Derivats (1.31 mmol, 1.0 eq.) in Diethylether (10 mL) wurde langsam zu einer Lösung von *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA, 0.23 g, 1.32 mmol, 1.01 eq.) in Diethylether (5 mL) unter Rühren bei 0°C zugegeben. Nach Vervollständigung der Reaktion über Nacht (ermittelt mittels DC-Analyse) wurde gesättigte NaHCO₃-Lösung (10 ml) zugegeben und die Mischung mit Ethylacetat (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das gewünschte Epoxidprodukt wurde nach Säulenchromatographie an Kieselgel (4% Ethylacetat in Petrolether) als farblose Flüssigkeit isoliert.

(*R,R/S,S*)-2-Methyl-3-phenyloxiran ((*trans*)-15)

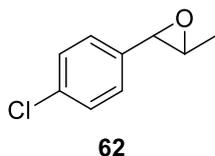
Epoxidierung von *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**, 310 mg, 2.62 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung (*R,R/S,S*)-2-Methyl-3-phenyloxiran ((*trans*)-**15**, 227 mg, 1.69 mmol, 64%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^{258,309} ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.28 – 7.18 (m, 5H), 3.50 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 2.96 (dq, J = 5.1, 2.0 Hz, 1H), 1.38 (d, J = 5.2 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 137.8, 128.4, 128.0, 125.6, 59.5, 59.0, 17.9 ppm.

(*R,S/S,R*)-2-Methyl-3-phenyloxiran ((*cis*)-15)

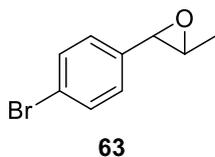
Epoxidierung von *cis*- β -Methylstyren (*cis*-**14**, 310 mg, 2.62 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung (*R,S/S,R*)-2-Methyl-3-phenyloxiran ((*cis*)-**15**, 217 mg, 1.62 mmol, 62%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.40 – 7.32 (m, 5H), 4.09 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 3.37 (dq, J = 5.1, 4.2 Hz, 1H), 1.12 (d, J = 5.5 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 135.5, 128.0, 127.5, 126.6, 57.6, 55.1, 12.5 ppm.

2-(4-Fluorophenyl)-3-methyloxiran (61**)**

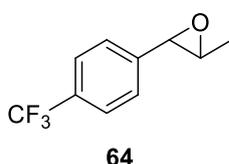
Epoxidierung von (*E*)-1-Fluoro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**45**, 178 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-(4-Fluorophenyl)-3-methyloxiran (**61**, 80.3 mg, 0.53 mmol, 40%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.25 (m, 2H), 7.05 (m, 2H), 3.58 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 3.02 (dq, J = 5.2, 2.2 Hz, 1H), 1.91 (d, J = 5.2 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 162.6 (d, J = 246.1 Hz), 133.5 (d, J = 3.0 Hz), 127.2, 127.1, 115.5, 115.3, 59.0, 58.9, 17.8 ppm; ¹⁹F-NMR (471 MHz, CDCl₃): δ = -114.2 (s) ppm; HRMS (m/z): [M+H]⁺ berechnet für C₉H₉FOH⁺, 153.07102; gefunden, 153.07175.

2-(4-Chlorophenyl)-3-methyloxiran (62**)**

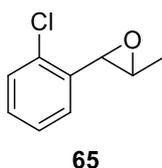
Epoxidierung von (*E*)-1-Chloro-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**47**, 200 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-(4-Chlorophenyl)-3-methyloxiran (**62**, 112 mg, 0.66 mmol, 51%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 3.57 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.01 (dq, J = 5.2, 2.1 Hz, 1H), 1.48 (d, J = 5.2 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 136.4, 133.8, 128.6, 126.9, 59.1, 58.8, 17.8 ppm.

2-(4-Bromophenyl)-3-methyloxiran (63)

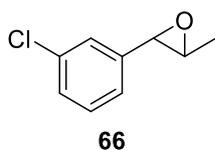
Epoxidierung von (*E*)-1-Bromo-4-(prop-1-en-1-yl)benzen (**49**, 258 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-(4-Bromophenyl)-3-methyloxiran (**63**, 150 mg, 0.70 mmol, 54%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.48 (m, 2H), 7.16 (m, 2H), 3.56 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.00 (dq, *J* = 5.1, 2.1 Hz, 1H), 1.47 (d, *J* = 5.3 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 136.9, 131.6, 127.2, 121.8, 59.1, 58.9, 17.8 ppm.

2-Methyl-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxiran (64)

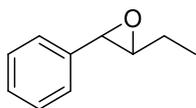
Epoxidierung von (*E*)-1-(prop-1-en-1-yl)-4-(trifluoromethyl)benzen (**51**, 244 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-Methyl-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxiran (**64**, 131 mg, 0.65 mmol, 49%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁰ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.62 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 3.66 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 3.03 (dq, *J* = 5.2, 2.0 Hz, 1H), 1.50 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 141.9, 130.2 (q, *J* = 30.0 Hz), 125.8, 125.4 (q, *J* = 3.7 Hz), 124.1 (q, *J* = 272.4 Hz), 59.4, 58.7, 17.8 ppm; ¹⁹F-NMR (471 MHz, CDCl₃): δ = -62.6 (s) ppm.

2-(2-Chlorophenyl)-3-methyloxiran (65)

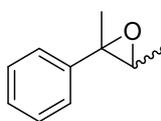
Epoxidierung von (*E*)-1-Chloro-2-(prop-1-en-1-yl)benzen (**53**, 200 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-(2-Chlorophenyl)-3-methyloxiran (**65**, 142 mg, 0.84 mmol, 64%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.27 (m, 1H), 7.17 – 7.13 (m, 3H), 3.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.83 (dq, *J* = 5.2, 2.0 Hz, 1H), 1.43 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 135.7, 133.0, 129.0, 128.7, 127.0, 125.9, 58.6, 57.0, 17.8; HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₉H₉ClOH⁺, 169.04147; gefunden, 169.04077.

2-(3-Chlorophenyl)-3-methyloxiran (66)

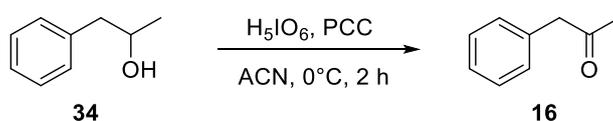
Epoxidierung von (*E*)-1-Chloro-3-(prop-1-en-1-yl)benzen (**55**, 200 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-(3-Chlorophenyl)-3-methyloxiran (**66**, 72.5 mg, 0.43 mmol, 33%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.19 – 7.17 (m, 3H), 7.07 (m, 1H), 3.47 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 2.92 (dq, *J* = 5.2, 2.1 Hz, 1H), 1.38 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 140.0, 134.5, 129.7, 128.1, 125.6, 123.8, 59.2, 58.8, 17.8 ppm.

2-Ethyl-3-phenyloxiran (67)**67**

Epoxidierung von (*E*)-But-1-en-1-ylbenzen (**59**, 43.3 mg, 0.33 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2-Ethyl-3-phenyloxiran (**67**, 13.6 mg, 0.09 mmol, 28%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³⁰⁹ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.28 – 7.18 (m, 5H), 3.54 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.87 (dt, *J* = 5.5, 2.1 Hz, 1H), 1.65 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 137.9, 128.4, 128.0, 125.5, 64.2, 58.3, 25.4, 9.9 ppm.

2,3-Dimethyl-2-phenyloxiran (68)**68**

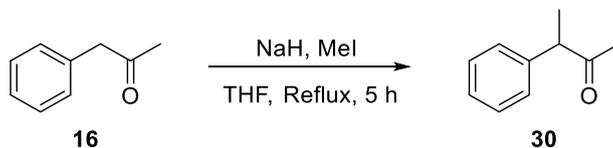
Epoxidierung von (*E/Z*)-But-2-en-2-ylbenzen (**37**, 173 mg, 1.31 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁸ Die gewünschte Verbindung 2,3-Dimethyl-2-phenyloxiran (**68**, 103 mg, 0.69 mmol, 53%) wurde als farblose Flüssigkeit in einem Diastereomerenverhältnis von 1.6:1 (*trans*-/*cis*-Epoxid) erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^{309,311} ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.28 – 7.17 (m, 5H), 3.10 (q, *J* = 5.4 Hz, 0.37H, (*cis*)), 2.87 (q, *J* = 5.4 Hz, 1H, 0.58H, (*trans*)), 1.58 (s, 1.81H, (*trans*)), 1.57 (s, 1.19H, (*cis*)), 1.35 (d, *J* = 5.4 Hz, 1.85H, (*trans*)), 0.91 (d, *J* = 5.4 Hz, 1.17H, (*cis*)) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 143.1 (*trans*), 139.7 (*cis*), 128.3 (*trans*), 128.0 (*cis*), 127.2 (*trans*), 127.1 (*cis*), 126.5 (*cis*), 125.0 (*trans*), 62.7 (*cis*), 62.5 (*trans*), 61.3 (*cis*), 60.4 (*trans*), 24.5 (*cis*), 17.4 (*trans*), 14.5 (*cis*), 14.4 (*trans*) ppm.

5.7.6. Synthese von Phenylaceton-Derivaten**Phenylaceton (16)**

Eine Lösung von Periodsäure (1.72 g, 7.56 mmol) in Acetonitril (40 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre hergestellt. Anschließend wurden 1-Phenyl-2-propanol (**34**, 1.00 g, 7.34 mmol) und eine Lösung von Pyridiniumchlorochromat (15.5 mg, 1 mol%) in Acetonitril (10 mL) unter Eiskühlung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (50 mL) wurde die organische Phase mit einer Mischung aus Wasser und gesättigter Kochsalzlösung (60 mL, 1:1 v/v), gesättigter NaSO₃-Lösung (60 mL), gesättigter Kochsalzlösung (60 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das verbleibende Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (10% Ethylacetat in Petrolether) gereinigt, um Phenylaceton (**16**,

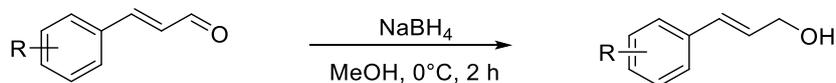
0.87 g, 7.34 mmol, 89%) als farblose Flüssigkeit zu erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^{312,313} $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.35 - 7.20$ (m, 5H), 3.69 (s, 2H), 2.15 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 206.4, 134.3, 129.4, 128.8, 127.1, 51.0, 29.3$ ppm.

3-Phenyl-2-butanon (**30**)

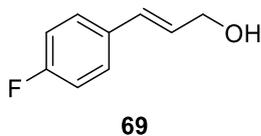


Nach einem Literaturprotokoll³¹⁴ wurden NaH (Dispersion in Mineralöl, 180 mg, 7.50 mmol, 2.0 eq.), Phenylacetone (**16**, 500 mg, 3.73 mmol, 1.0 eq.) und Methyljodid (0.38 mL, 6.10 mmol, 1.6 eq.) in THF (15 mL) unter Argon-Atmosphäre gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch mit wässriger 1 M HCl (15 mL), wässriger NaHCO_3 -Lösung (10% w/v, 20 mL) gewaschen und mit Ethylacetat (3×15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das verbleibende Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (10% Diethylether in Petrolether) gereinigt, um 3-Phenyl-2-butanon (**30**, 169 mg, 1.14 mmol, 31%) als leicht gelbe Flüssigkeit zu erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁴ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.38 - 7.24$ (m, 5H), 3.77 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.42 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 208.8, 140.6, 128.9, 127.8, 127.2, 53.8, 28.4, 17.2$ ppm.

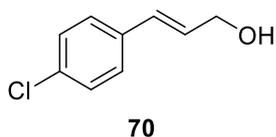
5.7.7. Synthese von *trans*-Zimtalkohol-Derivaten



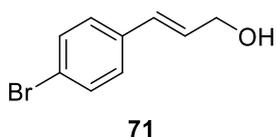
Unter einer Argon-Atmosphäre wurde NaBH_4 (134 mg, 3.54 mmol, 1.15 eq.) zu einer Lösung eines *trans*-Zimtaldehyd-Derivats (3.08 mmol, 1 eq.) in Methanol (10 mL) unter Rühren bei 0°C zugegeben. Nachdem die Reaktion nach 2 h abgeschlossen war, wurde Wasser zugegeben und die Mischung mit Dichlormethan (3×15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das gewünschte *trans*-Zimtalkohol Produkt wurde als Feststoff oder Öl ohne weitere Reinigung isoliert.

(E)-3-(4-Fluorophenyl)prop-2-en-1-ol (69)

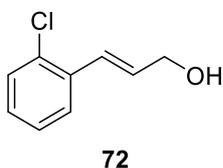
Reduktion von (*E*)-3-(4-Fluorophenyl)acrylaldehyd (500 mg, 3.33 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-3-(4-Fluorophenyl)prop-2-en-1-ol (**69**, 464 mg, 3.05 mmol, 92%) wurde als farbloser Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁵ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.39 – 7.36 (m, 2H), 7.06 – 7.02 (m, 2H), 6.61 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.31 (dt, *J* = 16.1, 5.7 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 1.47 (s, 1H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 162.7 (d, *J* = 247.1 Hz), 132.9 (d, *J* = 3.3 Hz), 130.0, 128.2 (d, *J* = 2.2 Hz), 128.0 (d, *J* = 8.1 Hz), 115.6 (d, *J* = 21.8 Hz), 63.7 ppm; ¹⁹F-NMR (471 MHz, CDCl₃): δ = -114.4 (s) ppm.

(E)-3-(4-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (70)

Reduktion von (*E*)-3-(4-Chlorophenyl)acrylaldehyd (500 mg, 3.00 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-3-(4-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (**70**, 496 mg, 2.94 mmol, 98%) wurde als farbloser Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁵ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 (m, 4H), 6.60 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.37 (dt, *J* = 15.9, 5.7 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.47 (t, *J* = 5.7 Hz) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 135.2, 133.3, 129.8, 129.2, 128.8, 127.7, 63.6 ppm.

(E)-3-(4-Bromophenyl)prop-2-en-1-ol (71)

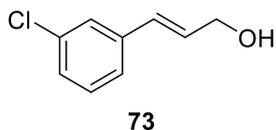
Reduktion von (*E*)-3-(4-Bromophenyl)acrylaldehyd (500 mg, 2.37 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-3-(4-Bromophenyl)prop-2-en-1-ol (**71**, 488 mg, 2.29 mmol, 97%) wurde als leicht gelber Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁶ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.47 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 6.59 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.38 (dt, *J* = 15.9, 5.7 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 1.48 (t, *J* = 5.7 Hz) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 135.6, 131.7, 129.8, 129.3, 128.0, 121.5, 63.5 ppm.

(E)-3-(2-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (72)

Reduktion von (*E*)-3-(2-Chlorophenyl)acrylaldehyd (194 mg, 1.16 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-3-(2-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (**72**, 193 mg, 1.14 mmol, 99%) wurde als leicht gelber Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁷ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.57 (m, 1H),

7.28 (m, 1H), 7.14 (m, 2H), 6.94 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.29 (dt, $J = 15.9, 5.7$ Hz, 1H), 4.30 (s, 2H), 1.46 (bs, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 134.9, 133.1, 131.5, 129.7, 128.7, 127.2, 126.9, 126.8, 63.7$ ppm.

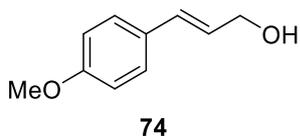
(*E*)-3-(3-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (**73**)



Reduktion von (*E*)-3-(3-Chlorophenyl)acrylaldehyd (204 mg, 1.22 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-3-(3-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (**73**, 202 mg, 1.20 mmol, 98%) wurde als leicht gelber Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁸ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.39$ (m, 1H), 7.29 – 7.22 (m, 3H), 6.59 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.40 (dt, $J = 15.9, 5.5$ Hz, 1H), 4.36 (m, 2H), 1.59 (bs, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.6, 130.1, 129.8, 129.5, 127.6, 126.4, 124.7, 63.4$ ppm.

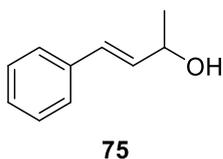
(*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol (**74**)



Reduktion von (*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)acrylaldehyde (500 mg, 3.08 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol (**74**, 487 mg, 2.97 mmol, 96%) wurde als leicht gelber Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁶ $^1\text{H-NMR}$

(500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36$ (m, 2H), 6.89 (m, 2H), 6.59 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.27 (dt, $J = 15.9, 6.0$ Hz, 1H), 4.33 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.40 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.3, 131.0, 129.4, 127.7, 126.2, 114.0, 64.0, 55.3$ ppm.

(*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**75**)

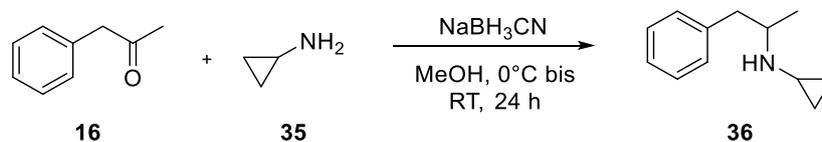


Reduktion von (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-one (500 mg, 3.42 mmol) nach Literaturprotokoll.²⁵⁹ Die gewünschte Verbindung (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ol (**75**, 485 mg, 3.27 mmol, 96%) wurde als leicht gelber Feststoff erhalten. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.²⁵⁹ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.41$ (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.27

(m, 1H), 6.60 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.27 (dd, $J = 16.0, 6.6$ Hz, 1H), 4.52 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.64 (s, 1H), 1.41 (d, $J = 6.4$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.7, 133.6, 129.4, 128.6, 127.7, 126.5, 69.0, 23.4$ ppm.

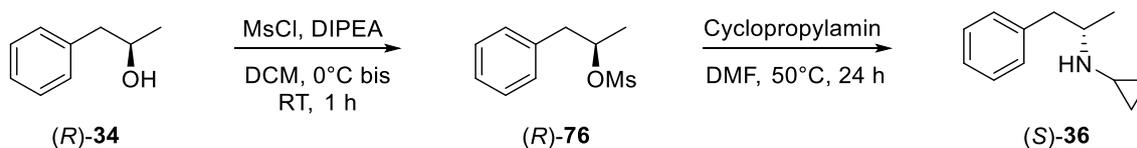
5.7.8. Synthese von *N*-(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin

(*rac*)-*N*-(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin (**36**)



Eine Lösung von Phenylacetone (**16**, 150 mg, 1.12 mmol, 1.0 eq.) und Cyclopropylamin (**35**, 319 mg, 5.59 mmol, 5.0 eq.) in Methanol (10 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre hergestellt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt.³¹⁹ Anschließend wurde Natriumcyanoborhydrid (70.2 mg, 1.12 mmol, 1.0 eq.) unter Eiskühlung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 24 h gerührt. Nach Zugabe von wässriger NaOH (10 M, 5 mL) wurde die wässrige Phase mit MTBE (3 × 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (10% Methanol in Dichlormethan) ergab *N*-(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin (**36**, 109 mg, 0.62 mmol, 55%) als farblose Flüssigkeit. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.23 – 7.21 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 3H), 2.98 (sex, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.73 (dd, *J* = 13.4, 6.9 Hz, 1H), 2.52 (dd, *J* = 13.4, 6.9 Hz, 1H), 2.00 (sep, *J* = 3.6 Hz, 1H), 1.03 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.45 – 0.39 (m, 1H), 0.37 – 0.32 (m, 1H), 0.31 – 0.21 (m, 2H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 139.6, 129.3, 128.4, 126.1, 55.5, 43.7, 28.7, 20.5, 7.1, 5.8 ppm; HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₇NH⁺, 176.14338; gefunden, 176.14271.

(*S*)-*N*-(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin ((*S*)-**36**)

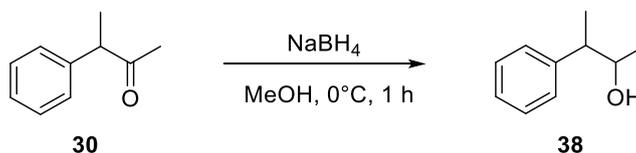


Eine Lösung von (*R*)-1-Phenyl-2-propanol ((*R*)-**34**, 100 mg, 0.73 mmol, 1.0 eq.) und *N,N*-Diisopropylethylamin (372 μL, 2.19 mmol, 3.0 eq.) in trockenem Dichlormethan (5 mL) wurde auf 0°C gekühlt. Methansulfonylchlorid (84.8 μL, 1.10 mmol, 1.5 eq.) wurde langsam zugegeben und die Reaktionsmischung 1 h lang gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer gesättigten, wässrigen Lösung von NaHCO₃ (20 mL) gestoppt und die Mischung mit Diethylether (3 × 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (25% Ethylacetat in Cyclohexan) ergab (*R*)-1-Phenylpropan-2-yl-methansulfonat ((*R*)-**76**, 138 mg, 0.64 mmol, 88%) als farblose Flüssigkeit.

Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³²⁰ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.36 – 7.33 (m, 2H), 7.29 – 7.25 (m, 3H), 4.94 – 4.89 (m, 1H), 3.00 (dd, J = 14.0, 8.2 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 14.0, 5.1 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 1.50 (d, J = 6.3 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 136.8, 129.6, 128.7, 127.1, 81.5, 43.0, 37.7, 21.6 ppm.

(*R*)-1-Phenylpropan-2-yl-methansulfonat ((*R*)-**76**, 100 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq.) und Cyclopropylamin (**35**, 1.23 mL, 18.7 mmol, 40 eq.) wurden in Dimethylformamid (1 mL) gelöst und für 20 h bei 50°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Diethylether (10 mL) und Wasser (10 mL) aufgenommen, bevor die wässrige Phase mit Diethylether (3 × 15 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (10% Methanol in Dichlormethan) lieferte (*S*)-*N*-(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin ((*S*)-**36**, 20.3 mg, 0.12 mmol, 25%) als leicht gelbe Flüssigkeit. $[\alpha]_D^{26} = +16.1$ (0.56 mM in Methanol); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.23 – 7.21 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 3H), 2.98 (sex, J = 6.5 Hz, 1H), 2.73 (dd, J = 13.4, 6.9 Hz, 1H), 2.52 (dd, J = 13.4, 6.9 Hz, 1H), 2.00 (sep, J = 3.6 Hz, 1H), 1.03 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.45 – 0.39 (m, 1H), 0.37 – 0.32 (m, 1H), 0.31 – 0.21 (m, 2H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 139.6, 129.3, 128.4, 126.1, 55.5, 43.7, 28.7, 20.5, 7.1, 5.8 ppm.

5.7.9. Synthese von 3-Phenylbutan-2-ol



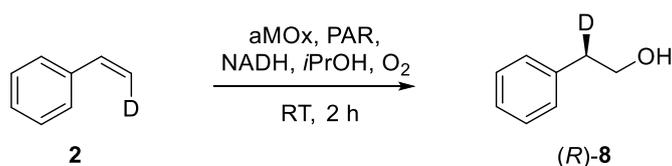
Eine Lösung von 3-Phenylbutan-2-on (**30**, 49.9 mg, 0.34 mmol) in Methanol (5 mL) wurde auf 0°C gekühlt, bevor NaBH₄ (14.6 mg, 0.39 mmol, 1.15 eq.) zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h lang gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (5 mL) gequench und mit Dichlormethan (3 × 15 mL) extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Das Produkt (**38**, 48.0 mg, 0.32 mmol, 94%) wurde als farbloses Öl isoliert. Die ¹H-NMR-Analyse ergab ein Gemisch aus zwei Diastereomeren, wobei *threo*-3-Phenylbutan-2-ol (2*S*,3*R* und 2*R*,3*S*) als Hauptdiastereomer und *erythro*-3-Phenylbutan-2-ol (2*S*,3*S* und 2*R*,3*R*) als Nebendiastereomer entstanden ist. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.³¹⁴

threo-3-Phenylbutan-2-ol: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 – 7.22 (m, 2H), 7.18 – 7.10 (m, 3H), 3.78 (m, 1H), 2.60 (quin, J = 7.1 Hz, 1H), 1.20 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.16 (d, J = 6.3 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 143.6, 128.6, 128.1, 126.8, 72.4, 47.9, 20.6, 17.9 ppm.

erythro-3-Phenylbutan-2-ol: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.33 - 7.22$ (m, 2H), 7.18 – 7.10 (m, 3H), 3.81 (m, 1H), 2.67 (quin, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.26 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 144.3, 128.4, 127.8, 126.5, 72.4, 47.2, 21.1, 15.9$ ppm.

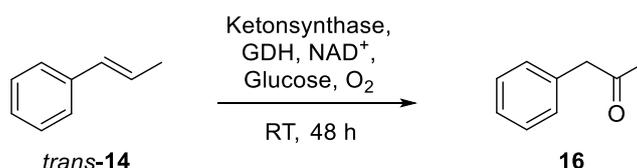
5.8. Enzymatische Synthesen

5.8.1. Enzymatische Synthese von 2-Phenylethan-2-*d*-1-ol



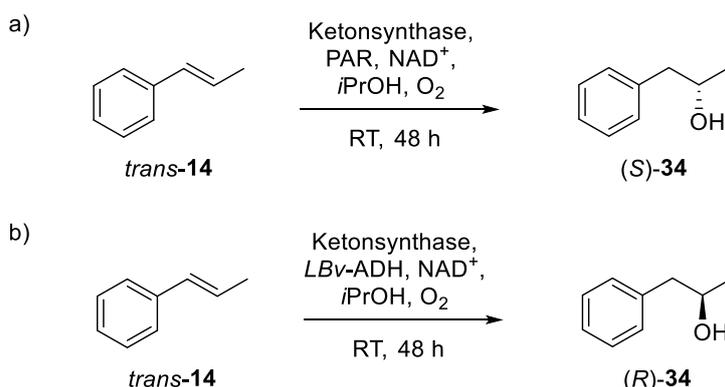
Zellfreies Lysat mit aMOx (37 mL, 2.5 μM Endkonzentration, 0.125 mol% Katalysator) und zellfreies Lysat mit PAR (25 mL) wurden in einer Gewindeflasche (500 mL Volumen) zusammen mit NADH (2 mM Endkonzentration, 20 mL einer 200 mM Stammlösung) und *cis*-Styren- β -*d* (**2**, 0.4 mmol, 2 mM Endkonzentration, 2 mL einer 200 mM Stammlösung in Isopropanol) in Biotransformationspuffer (116 mL, 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, 2% m/v Glycerin, pH = 8.0) gemischt. Die Gewindeflasche wurde verschlossen und das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (Schüttelinkubator, 180 rpm). Nach Extraktion mit MTBE (3×100 mL) wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Wasser (100 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (100 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet, filtriert, konzentriert und durch Säulenchromatographie an Kieselgel (10% – 20% Ethylacetat in Cyclohexan) gereinigt. Es wurde (*R*)-2-Phenylethan-2-*d*-1-ol ((*R*)-**8**, 20.0 mg, 40.7%) als farblose Flüssigkeit isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.32 - 7.29$ (m, 2H), 7.24 – 7.21 (m, 3H), 3.85 (br d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.86 (m, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.4, 129.0, 128.6, 126.5, 63.6, 38.8$ (t, $J = 19.5$ Hz) ppm.

5.8.2. Enzymatische Synthese von Phenylaceton



Lysate mit Ketonsynthase (0.5 μ M Endkonzentration, 0.025 mol% Katalysator) und Glucosedehydrogenase (25 mL, 5 Vol%) wurden in einer Gewindeflasche (1 L Volumen) gemischt, welche bereits NAD⁺ (0.5 mM Endkonzentration) und Glucose (20 mM Endkonzentration) gelöst in Biotransformationspuffer (0.1 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, 2% m/v Glycerin, pH = 8.0) enthält. Das Substrat *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**, 1.00 mmol, 2 mM Endkonz.) gelöst in Isopropanol (5 mL, 1 Vol%) wurde langsam unter leichtem Schütteln zugegeben. Nach Verschließen des Reaktionsgefäßes wurde die Reaktion bei 400 rpm (Tischschüttler, 8 mm Orbital) und Raumtemperatur für 48 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit einem 1:1-Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1 \times 200 mL, 4 \times 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (10% Ethylacetat in Cyclohexan) gereinigt und Phenylacetone (**16**) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten (82.1 mg, 0.61 mmol, 61% isolierte Ausbeute, 1220 TTN). Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^{312,313} ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.38 – 7.23 (m, 5H), 3.72 (s, 2H), 2.18 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 206.4, 134.3, 129.4, 128.8, 127.1, 51.1, 29.3 ppm.

Eine UHPLC-Analyse der Reaktionsmischung zeigte folgende Produktbildungen: 68% Phenylacetone, >1% *trans*-Zimtalkohol, 14% Epoxid und 4% nicht umgesetztes *trans*- β -Methylstyren.

5.8.3. Enzymatische Synthese von (*R*)- und (*S*)-1-Phenylpropan-2-ol

In einer Gewindeflasche (1 L Volumen) wurde eine Lösung von NAD^+ (0.5 mM Endkonzentration) in Biotransformationspuffer (0.1 M Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, 2% m/v Glycerin, pH = 8.0) mit einer a) (*S*)-selektiven Ketoreduktase (PAR, 50 mL Lysat, 10 Vol%) oder b) einer (*R*)-selektiven Ketoreduktase (*LBv*-ADH, 50 mL Lysat, 10 Vol%) sowie Ketonsynthase enthaltendem Lysat (0.5 μM Endkonzentration, 0.025 mol% Katalysator) gemischt. Das Substrat *trans*- β -Methylstyren (*trans*-**14**, 1.00 mmol, 2 mM Endkonzentration), gelöst in Isopropanol (5 mL, 1 Vol%), wurde langsam unter leichtem Schütteln zugegeben. Nach Verschließen des Reaktionsgefäßes wurde die Reaktion bei 400 rpm (Tischschüttler, 8 mm Orbital) und Raumtemperatur für 48 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit einem 1:1-Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1 \times 200 mL, 4 \times 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Rohprodukte wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (10% Ethylacetat in Cyclohexan) gereinigt, wobei entweder a) (*S*)- oder b) (*R*)-1-Phenylpropan-2-ol (**34**) als farblose Flüssigkeit erhalten wurde. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.⁷²

a) **(S)-1-Phenylpropan-2-ol** ((*S*)-**34**, 89.7 mg, 0.66 mmol, 66% isolierte Ausbeute, 1320 TTN); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.36 – 7.23 (m, 5H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 2.82 (dd, J = 13.4, 4.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, J = 13.5, 8.0 Hz, 1H), 1.61 (bs, 1H), 1.28 (d, J = 6.3 Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 138.5, 129.4, 128.6, 126.5, 68.9, 45.8, 22.8 ppm.

Eine UHPLC-Analyse der Reaktionsmischung zeigte folgende Produktbildungen: 7% Phenylacetone, >1% *trans*-Zimtalkohol, 69% (*S*)-1-Phenylpropan-2-ol, 18% Epoxid und 5% verbleibendes *trans*- β -Methylstyren.

b) **(R)-1-Phenylpropan-2-ol** ((*R*)-**34**, 94.6 mg, 0.69 mmol, 69% isolierte Ausbeute, 1390 TTN); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.36 – 7.24 (m, 5H), 4.09 – 4.03 (m, 1H), 2.82 (dd, J = 13.5, 4.8 Hz, 1H), 2.73 (dd, J = 13.5, 7.8 Hz, 1H), 1.63 (bs, 1H), 1.28 (d, J = 6.3 Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 138.5, 129.4, 128.6, 126.5, 68.9, 45.8, 22.8 ppm

Eine UHPLC-Analyse der Reaktionsmischung zeigte folgende Produktbildungen: 20% Phenylacetone, >1% Zimtalkohol, 41% (*S*)-*N*-(1-Phenylpropan-2-yl)cyclopropanamin, 8% Epoxid und 1% verbliebenes *trans*- β -Methylstyren.

6. Literaturverzeichnis

1. Grubbs, R. H., Wenzel, A. G., O'Leary, D. J. & Khosravi, E. *Handbook of Metathesis*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015). doi:10.1002/9783527674107.
2. Takeda, T. *Modern Carbonyl Olefination*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527601880.
3. Beller, M., Seayad, J., Tillack, A. & Jiao, H. Catalytic Markovnikov and anti-Markovnikov functionalization of alkenes and alkynes: Recent developments and trends. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 3368–3398 (2004).
4. Brückner, R. *Reaktionsmechanismen*. (Springer, 2004). doi:10.1007/978-3-662-45684-2.
5. Markownikoff, W. Ueber die Abhängigkeit der verschiedenen Vertretbarkeit des Radicalwasserstoffs in den isomeren Buttersäuren. *Ann. der Chemie und Pharm.* **153**, 228–259 (1870).
6. Bäckvall, J.-E. *Modern Oxidation Methods*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010). doi:10.1002/9783527632039.
7. Centi, G. & Trifiró, F. *New Developments in Selective Oxidation, Volume 55*. (Elsevier Science, 1990).
8. Jacobsen, E. N., Marko, I., Mungall, W. S., Schroeder, G. & Sharpless, K. B. Asymmetric dihydroxylation via ligand-accelerated catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1968–1970 (2002).
9. Kolb, H. C., VanNieuwenhze, M. S. & Sharpless, K. B. Catalytic asymmetric dihydroxylation. *Chem. Rev.* **94**, 2483–2547 (1994).
10. Zhang, W., Loebach, J. L., Wilson, S. R. & Jacobsen, E. N. Enantioselective epoxidation of unfunctionalized olefins catalyzed by salen manganese complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2801–2803 (1990).
11. Tsuji, J. Synthetic applications of the palladium-catalyzed oxidation of olefins to ketones. *Synthesis* **1984**, 369–384 (1984).
12. Smidt, J. *et al.* Katalytische Umsetzungen von Olefinen an Platinmetall-Verbindungen, Das Consortium-Verfahren zur Herstellung von Acetaldehyd. *Angew. Chem.* **71**, 176–182 (1959).
13. Jira, R. Acetaldehyde from ethylene - a retrospective on the discovery of the Wacker process. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 9034–9037 (2009).
14. Teo, P., Wickens, Z. K., Dong, G. & Grubbs, R. H. Efficient and highly aldehyde selective Wacker oxidation. *Org. Lett.* **14**, 3237–3239 (2012).
15. Morandi, B., Wickens, Z. K. & Grubbs, R. H. Practical and general palladium-catalyzed synthesis of ketones from internal olefins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2944–2948 (2013).
16. Tsuji, J. *Palladium Reagents and Catalysts*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2004). doi:10.1002/0470021209.
17. Wickens, Z. K., Morandi, B. & Grubbs, R. H. Aldehyde-selective Wacker-type oxidation of unbiased alkenes enabled by a nitrite co-catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 11257–11260 (2013).
18. Wickens, Z. K., Skakuj, K., Morandi, B. & Grubbs, R. H. Catalyst-controlled Wacker-type oxidation: Facile access to functionalized aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 890–893 (2014).

19. Chu, C. K., Ziegler, D. T., Carr, B., Wickens, Z. K. & Grubbs, R. H. Direct access to β -fluorinated aldehydes by nitrite-modified Wacker oxidation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 8435–8439 (2016).
20. Kim, K. E., Li, J., Grubbs, R. H. & Stoltz, B. M. Catalytic anti-Markovnikov transformations of hindered terminal alkenes enabled by aldehyde-selective Wacker-type oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 13179–13182 (2016).
21. Nakaoka, S., Murakami, Y., Kataoka, Y. & Ura, Y. Maleimide-assisted anti-Markovnikov Wacker-type oxidation of vinylarenes using molecular oxygen as a terminal oxidant. *Chem. Commun.* **52**, 335–338 (2015).
22. Dong, J. J., Harvey, E. C., Fañanás-Mastral, M., Browne, W. R. & Feringa, B. L. Palladium-catalyzed anti-Markovnikov oxidation of allylic amides to protected β -amino aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17302–17307 (2014).
23. Dong, J. J., Fañanás-Mastral, M., Alsters, P. L., Browne, W. R. & Feringa, B. L. Palladium-catalyzed selective anti-Markovnikov oxidation of allylic esters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 5561–5565 (2013).
24. Weiner, B., Baeza, A., Jerphagnon, T. & Feringa, B. L. Aldehyde selective Wacker oxidations of phthalimide protected allylic amines: A new catalytic route to β 3-amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9473–9474 (2009).
25. Muzart, J. Aldehydes from Pd-catalysed oxidation of terminal olefins. *Tetrahedron* **63**, 7505–7521 (2007).
26. Chen, J. & Che, C.-M. A practical and mild method for the highly selective conversion of terminal alkenes into aldehydes through epoxidation–isomerization with ruthenium(IV)–porphyrin catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 4950–4954 (2004).
27. Jiang, G. *et al.* Ruthenium porphyrin-catalyzed aerobic oxidation of terminal aryl alkenes to aldehydes by a tandem epoxidation-isomerization pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 6638–6642 (2008).
28. Fraile, J. M., García, N., Mayoral, J. A., Santomauro, F. G. & Guidotti, M. Multifunctional catalysis promoted by solvent effects: Ti-MCM41 for a one-pot, four-step, epoxidation–rearrangement–oxidation–decarboxylation reaction sequence on stilbenes and styrenes. *ACS Catal.* **5**, 3552–3561 (2015).
29. Chen, G.-Q., Xu, Z.-J., Zhou, C.-Y. & Che, C.-M. Selective oxidation of terminal aryl and aliphatic alkenes to aldehydes catalyzed by iron(III) porphyrins with triflate as a counter anion. *Chem. Commun.* **47**, 10963–10965 (2011).
30. Smith, M. B. & March, J. *March's Advanced Organic Chemistry*. (John Wiley & Sons, Inc., 2006). doi:10.1002/0470084960.
31. Puls, F., Linke, P., Kataeva, O. & Knölker, H.-J. Iron-catalyzed Wacker-type oxidation of olefins at room temperature with 1,3-diketones or neocuproine as ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 14083–14090 (2021).
32. Morandi, B., Wickens, Z. K. & Grubbs, R. H. Regioselective Wacker oxidation of internal alkenes: rapid access to functionalized ketones facilitated by cross-metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9751–9754 (2013).
33. DeLuca, R. J. *et al.* Wacker-type oxidation of internal alkenes using Pd(Quinox) and TBHP. *J. Org. Chem.* **78**, 1682–1686 (2013).
34. Mitsudome, T., Mizumoto, K., Mizugaki, T., Jitsukawa, K. & Kaneda, K. Wacker-type oxidation of internal olefins using a PdCl₂/N,N-dimethylacetamide catalyst system under copper-free reaction conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1238–1240 (2009).

35. Atkins, W. J., Burkhardt, E. R. & Matos, K. Safe handling of boranes at scale. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 1292–1295 (2006).
36. Burkhardt, E. R. & Matos, K. Boron reagents in process chemistry: Excellent tools for selective reductions. *Chem. Rev.* **106**, 2617–2650 (2006).
37. Puls, F. & Knölker, H.-J. Conversion of olefins into ketones by an iron-catalyzed Wacker-type oxidation using oxygen as the sole oxidant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 1222–1226 (2018).
38. Zhang, G. *et al.* Anti-Markovnikov oxidation of β -alkyl styrenes with H₂O as the terminal oxidant. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 12037–12040 (2016).
39. Guengerich, F. P. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations. *ACS Catal.* **8**, 10964–10976 (2018).
40. Ortiz De Montellano, P. R. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry* (Springer US, 2005). doi:10.1007/b139087.
41. Wang, Y., Lan, D., Durrani, R. & Hollmann, F. Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **37**, 1–9 (2017).
42. O'Reilly, E., Köhler, V., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Cytochromes P450 as useful biocatalysts: addressing the limitations. *Chem. Commun.* **47**, 2490–2501 (2011).
43. Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G. & Wong, L.-L. P450BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1218–1260 (2012).
44. Guengerich, F. P., Wu, Z. L. & Bartleson, C. J. Function of human cytochrome P450s: Characterization of the orphans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 465–469 (2005).
45. Takeyama, K. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* **277**, 1827–1830 (1997).
46. Gibbons, G. F. The role of cytochrome P450 in the regulation of cholesterol biosynthesis. *Lipids* **37**, 1163–1170 (2002).
47. Nomura, T. & Bishop, G. J. Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. *Phytochem. Rev.* **2006** *52* **5**, 421–432 (2006).
48. Omura, T. & Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–2378 (1964).
49. Omura, T. & Sato, R. Isolation of cytochromes P-450 and P-420. *Methods Enzymol.* **10**, 556–561 (1967).
50. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. & Schlichting, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* **105**, 2253–2278 (2005).
51. Ortiz De Montellano, P. R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **110**, 932–948 (2009).
52. Ortiz De Montellano, P. R. & Nelson, S. D. Rearrangement reactions catalyzed by cytochrome P450s. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 95–110 (2011).
53. Munro, A. W., Girvan, H. M., Mason, A. E., Dunford, A. J. & McLean, K. J. What makes a P450 tick? *Trends Biochem. Sci.* **38**, 140–150 (2013).
54. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. & Dawson, J. H. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2841–2888 (1996).

55. McIntosh, J. A., Farwell, C. C. & Arnold, F. H. Expanding P450 catalytic reaction space through evolution and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 126–134 (2014).
56. Chooi, Y.-H., Hong, Y. J., Cacho, R. A., Tantillo, D. J. & Tang, Y. A cytochrome P450 serves as an unexpected terpene cyclase during fungal meroterpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16805–16808 (2013).
57. Guengerich, F. P. & Munro, A. W. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *J. Biol. Chem.* **288**, 17065–17073 (2013).
58. Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**, 1–9 (2000).
59. Li, H. & Poulos, T. L. The structure of the cytochrome P450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 140–146 (1997).
60. Leys, D. *et al.* Atomic structure of Mycobacterium tuberculosis CYP121 to 1.06 Å reveals novel features of cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **278**, 5141–5147 (2003).
61. Dodani, S. C. *et al.* Structural, functional, and spectroscopic characterization of the substrate scope of the novel nitrating cytochrome P450 TxtE. *Chembiochem* **15**, 2259–2267 (2014).
62. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. & Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**, 330–344 (2007).
63. Munro, A. W., Girvan, H. M. & McLean, K. J. Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**, 345–359 (2007).
64. Finnigan, J. D., Young, C., Cook, D. J., Charnock, S. J. & Black, G. W. Cytochromes P450 (P450s): A review of the class system with a focus on prokaryotic P450s. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 289–320 (2020). doi:10.1016/bs.apcsb.2020.06.005.
65. Nelson, D. R. Cytochrome P450 Nomenclature. *Methods Mol. Biol.* **320**, 1–10 (2006).
66. De Mot, R. & Parret, A. H. A. A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **10**, 502–508 (2002).
67. Tavanti, M., Porter, J. L., Sabatini, S., Turner, N. J. & Flitsch, S. L. Panel of new thermostable CYP116B self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases that catalyze C–H activation with a diverse substrate scope. *ChemCatChem* **10**, 1042–1051 (2018).
68. Yin, Y.-C. *et al.* Unusually broad substrate profile of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase CYP116B4 from *Labrenzia aggregata*. *ChemBioChem* **15**, 2443–2449 (2014).
69. Zhang, L. *et al.* Structural insight into the electron transfer pathway of a self-sufficient P450 monooxygenase. *Nat. Commun.* **11**, 2676 (2020).
70. Li, R.-J. *et al.* Engineering P450 LaMO stereospecificity and product selectivity for selective C–H oxidation of tetralin-like alkylbenzenes. *Catal. Sci. Technol.* **8**, 4638–4644 (2018).
71. Klenk, J. M. *et al.* The self-sufficient P450 RhF expressed in a whole cell system selectively catalyses the 5-hydroxylation of diclofenac. *Biotechnol. J.* **12**, 1600520 (2017).
72. Hammer, S. C. *et al.* Anti-Markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis. *Science* **358**, 215–218 (2017).
73. Bornscheuer, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194

- (2012).
74. Wohlgemuth, R. Biocatalysis – Key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis. *N. Biotechnol.* **60**, 113–123 (2021).
 75. Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A. & Hauer, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 3070–3095 (2014).
 76. Wallace, S. & Balskus, E. P. Opportunities for merging chemical and biological synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 1–8 (2014).
 77. Chen, K. & Arnold, F. H. Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nat. Catal.* **3**, 203–213 (2020).
 78. Hammer, S. C., Knight, A. M. & Arnold, F. H. Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **7**, 23–30 (2017).
 79. Kazlauskas, R. J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 195–201 (2005).
 80. Toscano, M. D., Woycechowsky, K. J. & Hilvert, D. Minimalist active-site redesign: Teaching old enzymes new tricks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 3212–3236 (2007).
 81. Leveson-Gower, R. B., Mayer, C. & Roelfes, G. The importance of catalytic promiscuity for enzyme design and evolution. *Nat. Rev. Chem.* **3**, 687–705 (2019).
 82. Busto, E., Gotor-Fernández, V. & Gotor, V. Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 4504–4523 (2010).
 83. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 6032–6040 (2004).
 84. Breuer, M. *et al.* Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 788–824 (2004).
 85. Hammer, S. C., Marjanovic, A., Dominicus, J. M., Nestl, B. M. & Hauer, B. Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 121–126 (2015).
 86. Arnold, F. H. Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* **31**, 125–131 (1998).
 87. Arnold, F. H. Directed evolution: Bringing new chemistry to life. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 4143–4148 (2018).
 88. Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science* **339**, 307–310 (2013).
 89. Renata, H., Wang, Z. J. & Arnold, F. H. Expanding the enzyme universe: Accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 3351–3367 (2015).
 90. Wang, Z. J. *et al.* Improved cyclopropanation activity of histidine-ligated cytochrome P450 enables the enantioselective formal synthesis of Levomilnacipran. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6810–6813 (2014).
 91. Tinoco, A., Steck, V., Tyagi, V. & Fasan, R. Highly diastereo- and enantioselective synthesis of trifluoromethyl-substituted cyclopropanes via myoglobin-catalyzed transfer of trifluoromethylcarbene. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 5293–5296 (2017).

92. Chen, K., Huang, X., Kan, S. B. J., Zhang, R. K. & Arnold, F. H. Enzymatic construction of highly strained carbocycles. *Science* **360**, 71–75 (2018).
93. Bordeaux, M., Tyagi, V. & Fasan, R. Highly diastereoselective and enantioselective olefin cyclopropanation using engineered myoglobin-based catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 1744–1748 (2015).
94. Zhang, R. K. *et al.* Enzymatic assembly of carbon–carbon bonds via iron-catalysed sp³ C–H functionalization. *Nature* **565**, 67–72 (2019).
95. Prier, C. K., Zhang, R. K., Buller, A. R., Brinkmann-Chen, S. & Arnold, F. H. Enantioselective, intermolecular benzylic C–H amination catalysed by an engineered iron-haem enzyme. *Nat. Chem.* **9**, 629–634 (2017).
96. Kan, S. B. J., Lewis, R. D., Chen, K. & Arnold, F. H. Directed evolution of cytochrome c for carbon–silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science* **354**, 1048–1051 (2016).
97. Farwell, C. C., Zhang, R. K., McIntosh, J. A., Hyster, T. K. & Arnold, F. H. Enantioselective enzyme-catalyzed aziridination enabled by active-site evolution of a cytochrome P450. *ACS Cent. Sci.* **1**, 89–93 (2015).
98. Hyster, T. K., Farwell, C. C., Buller, A. R., McIntosh, J. A. & Arnold, F. H. Enzyme-controlled nitrogen-atom transfer enables regiodivergent C–H amination. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15505–15508 (2014).
99. McIntosh, J. A. *et al.* Enantioselective intramolecular C–H amination catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes in vitro and in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9309–9312 (2013).
100. Bajaj, P., Sreenilayam, G., Tyagi, V. & Fasan, R. Gram-scale synthesis of chiral cyclopropane-containing drugs and drug precursors with engineered myoglobin catalysts featuring complementary stereoselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 16110–16114 (2016).
101. Hernandez, K. E. *et al.* Highly stereoselective biocatalytic synthesis of key cyclopropane intermediate to Ticagrelor. *ACS Catal.* **6**, 7810–7813 (2016).
102. Schwizer, F. *et al.* Artificial metalloenzymes: Reaction scope and optimization strategies. *Chem. Rev.* **118**, 142–231 (2018).
103. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
104. Yu, Y., Hu, C., Xia, L. & Wang, J. Artificial metalloenzyme design with unnatural amino acids and non-native cofactors. *ACS Catal.* **8**, 1851–1863 (2018).
105. Bell, E. L. *et al.* Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Prim.* **1**, 46 (2021).
106. Dydio, P., Key, H. M., Hayashi, H., Clark, D. S. & Hartwig, J. F. Chemoselective, enzymatic C–H bond amination catalyzed by a cytochrome P450 containing an Ir(Me)-PIX cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 1750–1753 (2017).
107. Key, H. M., Dydio, P., Clark, D. S. & Hartwig, J. F. Abiological catalysis by artificial haem proteins containing noble metals in place of iron. *Nature* **534**, 534–537 (2016).
108. Dydio, P. *et al.* An artificial metalloenzyme with the kinetics of native enzymes. *Science* **354**, 102–106 (2016).
109. Chatterjee, A. *et al.* An enantioselective artificial Suzukiase based on the biotin–streptavidin technology. *Chem. Sci.* **7**, 673–677 (2015).
110. Jeschek, M. *et al.* Directed evolution of artificial metalloenzymes for in vivo metathesis.

- Nature* **537**, 661–665 (2016).
111. Zanghellini, A. *et al.* New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design. *Protein Sci.* **15**, 2785–2794 (2006).
 112. Tantillo, D. J., Chen, J. & Houk, K. N. Theozymes and compuzymes: Theoretical models for biological catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 743–750 (1998).
 113. Warshel, A. *et al.* Electrostatic basis for enzyme catalysis. *Chem. Rev.* **106**, 3210–3235 (2006).
 114. Röthlisberger, D. *et al.* Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* **453**, 190–195 (2008).
 115. Kiss, G., Çelebi-Ölçüm, N., Moretti, R., Baker, D. & Houk, K. N. Computational Enzyme Design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 5700–5725 (2013).
 116. Siegel, J. B. *et al.* Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science* **329**, 309–313 (2010).
 117. Jiang, L. *et al.* De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science* **319**, 1387–1391 (2008).
 118. Guo, J. & Teo, P. Anti-Markovnikov oxidation and hydration of terminal olefins. *Dalt. Trans.* **43**, 6952–6964 (2014).
 119. Dong, J. J., Browne, W. R. & Feringa, B. L. Palladium-catalyzed anti-Markovnikov oxidation of terminal alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 734–744 (2015).
 120. Miller, R. E. & Guengerich, F. P. Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P-450: evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochemistry* **21**, 1090–1097 (1982).
 121. Liebler, D. C. & Guengerich, F. P. Olefin oxidation by cytochrome P-450: evidence for group migration in catalytic intermediates formed with vinylidene chloride and trans-1-phenyl-1-butene. *Biochemistry* **22**, 5482–5489 (1983).
 122. Mansuy, D., Leclaire, J., Fontecave, M. & Momenteau, M. Oxidation of monosubstituted olefins by cytochromes P-450 and heme models: Evidence for the formation of aldehydes in addition to epoxides and allylic alcohols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**, 319–325 (1984).
 123. de Visser, S. P., Kumar, D. & Shaik, S. How do aldehyde side products occur during alkene epoxidation by cytochrome P450? Theory reveals a state-specific multi-state scenario where the high-spin component leads to all side products. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1183–1193 (2004).
 124. Kumar, D., de Visser, S. P. & Shaik, S. Multistate reactivity in styrene epoxidation by compound I of cytochrome P450: Mechanisms of products and side products formation. *Chem. - A Eur. J.* **11**, 2825–2835 (2005).
 125. de Visser, S. P., Ogliaro, F., Sharma, P. K. & Shaik, S. Hydrogen bonding modulates the selectivity of enzymatic oxidation by P450: Chameleon oxidant behavior by compound I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1947 (2002).
 126. Ostovic, D. & Bruice, T. C. Mechanism of alkene epoxidation by iron, chromium, and manganese higher valent oxo-metalloporphyrins. *Acc. Chem. Res.* **25**, 314–320 (1992).
 127. de Visser, S. P., Ogliaro, F., Harris, N. & Shaik, S. Multi-state epoxidation of ethene by cytochrome P450: A quantum chemical study. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3037–3047 (2001).
 128. Collman, J. P., Kodadek, T. & Brauman, J. I. Oxygenation of styrene by cytochrome P-450

- model systems. A mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2588–2594 (1986).
129. Groves, J. T. & Myers, R. S. Catalytic asymmetric epoxidations with chiral iron porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5791–5796 (1983).
130. Rudroff, F. *et al.* Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis. *Nat. Catal.* **1**, 12–22 (2018).
131. Bruggink, A., Schoevaart, R. & Kieboom, T. Concepts of nature in organic synthesis: Cascade catalysis and multistep conversions in concert. *Org. Process Res. Dev.* **7**, 622–640 (2003).
132. Schrittwieser, J. H., Velikogne, S., Hall, M. & Kroutil, W. Artificial biocatalytic linear cascades for preparation of organic molecules. *Chem. Rev.* **118**, 270–348 (2018).
133. Huffman, M. A. *et al.* Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science* **366**, 1255–1259 (2019).
134. Schober, M. *et al.* Chiral synthesis of LSD1 inhibitor GSK2879552 enabled by directed evolution of an imine reductase. *Nat. Catal.* **2**, 909–915 (2019).
135. Bengel, L. L. *et al.* Engineered enzymes enable selective N-alkylation of pyrazoles with simple haloalkanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 5554–5560 (2021).
136. Khersonsky, O. *et al.* Automated design of efficient and functionally diverse enzyme repertoires. *Mol. Cell* **72**, 178–186.e5 (2018).
137. Tang, Q. *et al.* Directed evolution of a halide methyltransferase enables biocatalytic synthesis of diverse SAM analogs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 1524–1527 (2021).
138. Yang, Y., Cho, I., Qi, X., Liu, P. & Arnold, F. H. An enzymatic platform for the asymmetric amination of primary, secondary and tertiary C(sp³)-H bonds. *Nat. Chem.* **11**, 987–993 (2019).
139. Yang, Y., Shi, S.-L., Niu, D., Liu, P. & Buchwald, S. L. Catalytic asymmetric hydroamination of unactivated internal olefins to aliphatic amines. *Science* **349**, 62–66 (2015).
140. Fu, H. *et al.* Chemoenzymatic asymmetric synthesis of the metallo- β -lactamase inhibitor aspergillomarasmine A and related aminocarboxylic acids. *Nat. Catal.* **1**, 186–191 (2018).
141. Cui, Y. *et al.* Development of a versatile and efficient C–N lyase platform for asymmetric hydroamination via computational enzyme redesign. *Nat. Catal.* **4**, 364–373 (2021).
142. Johns, A. M., Sakai, N., Ridder, A. & Hartwig, J. F. Direct measurement of the thermodynamics of vinylarene hydroamination. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9306–9307 (2006).
143. Xi, Y., Ma, S. & Hartwig, J. F. Catalytic asymmetric addition of an amine N–H bond across internal alkenes. *Nature* **588**, 37–40 (2020).
144. Zhu, S. & Buchwald, S. L. Enantioselective CuH-catalyzed anti-Markovnikov hydroamination of 1,1-disubstituted alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15913–6 (2014).
145. Xi, Y., Butcher, T. W., Zhang, J. & Hartwig, J. F. Regioselective, asymmetric formal hydroamination of unactivated internal alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 776–780 (2016).
146. Hintermann, L. Recent developments in metal-catalyzed additions of oxygen nucleophiles to alkenes and alkynes. *Top. Organomet. Chem.* **31**, 123–155 (2010).
147. Fleming, W. J., Müller-Bunz, H. & Guiry, P. J. Synthesis and post-resolution modification of new axially chiral ligands for asymmetric catalysis. *European J. Org. Chem.* **2010**, 5996–6004 (2010).

148. Connolly, D. J. *et al.* Preparation and resolution of a modular class of axially chiral quinazoline-containing ligands and their application in asymmetric rhodium-catalyzed olefin hydroboration. *J. Org. Chem.* **69**, 6572–6589 (2004).
149. Maxwell, A. C., Flanagan, S. P., Goddard, R. & Guiry, P. J. Rhodium-catalysed hydroboration employing new Quinazolinap ligands; an investigation into electronic effects. *Tetrahedron: Asymmetry* **21**, 1458–1473 (2010).
150. Thomas, S. P. & Aggarwal, V. K. Asymmetric hydroboration of 1,1-disubstituted alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1896–1898 (2009).
151. Lorenzen, J. *et al.* Rhodococcus erythropolis oleate hydratase: a new member in the oleate hydratase family tree—biochemical and structural studies. *ChemCatChem* **10**, 407–414 (2018).
152. Demming, R. M. *et al.* Asymmetric enzymatic hydration of unactivated, aliphatic alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 173–177 (2019).
153. Zhang, F. H., Zhang, F. J., Li, M. L., Xie, J. H. & Zhou, Q. L. Enantioselective hydrogenation of dialkyl ketones. *Nat. Catal.* **3**, 621–627 (2020).
154. Gao, B., Feng, X., Meng, W. & Du, H. Asymmetric hydrogenation of ketones and enones with chiral Lewis base derived frustrated Lewis pairs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 4498–4504 (2020).
155. Laroche, B., Ishitani, H. & Kobayashi, S. Direct reductive amination of carbonyl compounds with H₂ using heterogeneous catalysts in continuous flow as an alternative to N-alkylation with alkyl halides. *Adv. Synth. Catal.* **360**, 4699–4704 (2018).
156. Yasukawa, T., Masuda, R. & Kobayashi, S. Development of heterogeneous catalyst systems for the continuous synthesis of chiral amines via asymmetric hydrogenation. *Nat. Catal.* **2**, 1088–1092 (2019).
157. Musa, M. M., Karume, I., Takahashi, M., Hamdan, S. M. & Ullah, N. Stereoinversion of R-configured secondary alcohols using a single enzymatic approach. *Chem. Sel.* **3**, 10205–10208 (2018).
158. Vitale, P. *et al.* Unveiling the hidden performance of whole cells in the asymmetric bioreduction of aryl-containing ketones in aqueous deep eutectic solvents. *Adv. Synth. Catal.* **359**, 1049–1057 (2017).
159. Hoang, H. N., Nagashima, Y., Mori, S., Kagechika, H. & Matsuda, T. CO₂-expanded bio-based liquids as novel solvents for enantioselective biocatalysis. *Tetrahedron* **73**, 2984–2989 (2017).
160. Payer, S. E., Schrittwieser, J. H. & Kroutil, W. Vicinal diamines as smart cosubstrates in the transaminase-catalyzed asymmetric amination of ketones. *European J. Org. Chem.* **2017**, 2553–2559 (2017).
161. Telzerow, A. *et al.* Amine transaminase from *Exophiala xenobiotica*—Crystal structure and engineering of a fold IV transaminase that naturally converts biaryl ketones. *ACS Catal.* **9**, 1140–1148 (2018).
162. Chen, F.-F. *et al.* An ammonium-formate-driven trienzymatic cascade for ω -transaminase-catalyzed (R)-selective amination. *J. Org. Chem.* **84**, 14987–14993 (2019).
163. Liu, J., Pang, B. Q. W., Adams, J. P., Snajdrova, R. & Li, Z. Coupled immobilized amine dehydrogenase and glucose dehydrogenase for asymmetric synthesis of amines by reductive amination with cofactor recycling. *ChemCatChem* **9**, 425–431 (2017).
164. Pushpanath, A., Siirola, E., Bornadel, A., Woodlock, D. & Schell, U. Understanding and

- overcoming the limitations of *Bacillus badius* and *Caldalkalibacillus thermarum* amine dehydrogenases for biocatalytic reductive amination. *ACS Catal.* **7**, 3204–3209 (2017).
165. Paris, J. *et al.* Enantioselective one-pot synthesis of biaryl-substituted amines by combining palladium and enzyme catalysis in deep eutectic solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 5486–5493 (2019).
166. Abrahamson, M. J., Wong, J. W. & Bommarius, A. S. The evolution of an amine dehydrogenase biocatalyst for the asymmetric production of chiral amines. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 1780–1786 (2013).
167. Juan Mangas-Sanchez *et al.* Asymmetric synthesis of primary amines catalyzed by thermotolerant fungal reductive aminases. *Chem. Sci.* **11**, 5052–5057 (2020).
168. Montgomery, S. L. *et al.* Characterization of imine reductases in reductive amination for the exploration of structure-activity relationships. *Sci. Adv.* **6**, eaay9320 (2020).
169. Tauber, K. *et al.* Artificial multi-enzyme networks for the asymmetric amination of secondary alcohols. *Chem. – A Eur. J.* **19**, 4030–4035 (2013).
170. Mutti, F. G., Knaus, T., Scrutton, N. S., Breuer, M. & Turner, N. J. Conversion of alcohols to enantiopure amines through dual-enzyme hydrogen-borrowing cascades. *Science* **349**, 1525–1529 (2015).
171. Houwman, J. A., Knaus, T., Costa, M. & Mutti, F. G. Efficient synthesis of enantiopure amines from alcohols using resting *E. coli* cells and ammonia. *Green Chem.* **21**, 3846–3857 (2019).
172. Thompson, M. P. & Turner, N. J. Two-enzyme hydrogen-borrowing amination of alcohols enabled by a cofactor-switched alcohol dehydrogenase. *ChemCatChem* **9**, 3833–3836 (2017).
173. González-Martínez, D., Gotor, V. & Gotor-Fernández, V. Stereoselective synthesis of 1-arylpropan-2-amines from allylbenzenes through a Wacker-Tsuji oxidation-biotransamination sequential process. *Adv. Synth. Catal.* **361**, 2582–2593 (2019).
174. Albarrán-Velo, J., Gotor-Fernández, V. & Lavandera, I. Markovnikov Wacker-Tsuji oxidation of allyl(hetero)arenes and application in a one-pot photo-metal-biocatalytic approach to enantioenriched amines and alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **363**, 4096–4108 (2021).
175. Huang, X. & Groves, J. T. Oxygen activation and radical transformations in heme proteins and metalloporphyrins. *Chem. Rev.* **118**, 2491–2553 (2018).
176. Duan, L., Jogl, G. & Cane, D. E. The cytochrome P450-catalyzed oxidative rearrangement in the final step of pentalenolactone biosynthesis: Substrate structure determines mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 12678–12689 (2016).
177. Kulinkovich, O. Organotitanium and organozirconium reagents. *Compr. Org. Synth. Second Ed.* **1**, 124–158 (2014).
178. Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.* (Georg Thieme Verlag, 2012).
179. Lightner, D. A., Quistad, G. B. & Irwin, E. Hydrogen rearrangements in the mass spectra of alkylbenzenes. *Appl. Spectrosc.* **25**, 253–258 (1971).
180. Oba, M. A convenient method for palladium-catalyzed reductive deuteration of organic substrates using deuterated hypophosphite in D₂O. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **58**, 215–219 (2015).

181. Hoye, T. R., Jeffrey, C. S. & Shao, F. Mosher ester analysis for the determination of absolute configuration of stereogenic (chiral) carbinol carbons. *Nat. Protoc.* **2**, 2451–2458 (2007).
182. Matoishi, K. *et al.* The first synthesis of both enantiomers of [α -2H]phenylacetic acid in high enantiomeric excess. *Chem. Commun.* **16**, 1519–1520 (2000).
183. Mandrelli, F., Blond, A., James, T., Kim, H. & List, B. Deracemizing α -branched carboxylic acids by catalytic asymmetric protonation of bis-silyl ketene acetals with water or methanol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 11479–11482 (2019).
184. Liang, T., Zhang, Z. & Antilla, J. C. Chiral Brønsted acid catalyzed pinacol rearrangement. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 9734–9736 (2010).
185. Wu, H., Wang, Q. & Zhu, J. Organocatalytic enantioselective vinylogous Pinacol rearrangement enabled by chiral ion pairing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15411–15414 (2016).
186. Trost, B. M. & Yasukata, T. A catalytic asymmetric Wagner–Meerwein shift. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7162–7163 (2001).
187. Rojas, C. M. *Molecular Rearrangements in Organic Synthesis*. (John Wiley & Sons, Inc, 2015). doi:10.1002/9781118939901.
188. Jung, M. E. & D'Amico, D. C. Enantiospecific synthesis of all four diastereomers of 2-methyl-3-[(trialkylsilyl)oxy]alkanals: facile preparation of aldols by non-aldol chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12208–12209 (1993).
189. Snape, T. J. Recent advances in the semi-pinacol rearrangement of α -hydroxy epoxides and related compounds. *Chem. Soc. Rev.* **36**, 1823–1842 (2007).
190. Groves, J. T. & Nemo, T. E. Epoxidation reactions catalyzed by iron porphyrins. Oxygen transfer from iodosylbenzene. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5786–5791 (1983).
191. Collins, P., Kramer, Z. C., Carpenter, B. K., Ezra, G. S. & Wiggins, S. Nonstatistical dynamics on the caldera. *J. Chem. Phys.* **141**, 034111 (2014).
192. Kurouchi, H. & Singleton, D. A. Labelling and determination of the energy in reactive intermediates in solution enabled by energy-dependent reaction selectivity. *Nat. Chem.* **10**, 237–241 (2018).
193. Ess, D. H. *et al.* Bifurcations on potential energy surfaces of organic reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 7592–7601 (2008).
194. Yang, B., Schouten, A. & Ess, D. H. Direct dynamics trajectories reveal nonstatistical coordination intermediates and demonstrate that σ and π -coordination are not required for rhenium(I)-mediated ethylene C–H activation. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 8367–8374 (2021).
195. Hare, S. R. & Tantillo, D. J. Post-transition state bifurcations gain momentum – current state of the field. *Pure Appl. Chem.* **89**, 679–698 (2017).
196. Senn, H. M. & Thiel, W. QM/MM studies of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 182–187 (2007).
197. Klenk, J. M. Identifikation und Charakterisierung neuer Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung. (Universität Stuttgart, 2018). doi:10.18419/opus-10255.
198. Gerlt, J. A. *et al.* Enzyme function initiative-enzyme similarity tool (EFI-EST): A web tool for generating protein sequence similarity networks. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1854**, 1019–1037 (2015).
199. Warman, A. J. *et al.* Characterization of Cupriavidus metallidurans CYP116B1 - A

- thiocarbamate herbicide oxygenating P450-phthalate dioxygenase reductase fusion protein. *FEBS J.* **279**, 1675–1693 (2012).
200. Roberts, G. A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J. Bacteriol.* **184**, 3898–3908 (2002).
201. Liu, L., Schmid, R. D. & Urlacher, V. B. Cloning, expression, and characterization of a self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44319. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 876–882 (2006).
202. Ciaramella, A., Catucci, G., Gilardi, G. & Di Nardo, G. Crystal structure of bacterial CYP116B5 heme domain: New insights on class VII P450s structural flexibility and peroxygenase activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **140**, 577–587 (2019).
203. Minerdi, D. *et al.* CYP116B5: a new class VII catalytically self-sufficient cytochrome P450 from *A. cinetobacter radioresistens* that enables growth on alkanes. *Mol. Microbiol.* **95**, 539–554 (2015).
204. Li, R.-J. *et al.* Rapid probing of the reactivity of P450 monooxygenases from the CYP116B subfamily using a substrate-based method. *New J. Chem.* **40**, 8928–8934 (2016).
205. Li, A. T., Zhang, J. D., Xu, J. H., Lu, W. Y. & Lin, G. Q. Isolation of *Rhodococcus* sp. strain ECU0066, a new sulfide monooxygenase-producing strain for asymmetric sulfoxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 551–556 (2009).
206. Sheldon, R. A. & Van Bekkum, H. *Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis*. *Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis* (Wiley-VCH Verlag, 2007). doi:10.1002/9783527612963.
207. Keinan, E., Seth, K. K. & Lamed, R. Organic synthesis with enzymes. 3. TBADH-catalyzed reduction of chloro ketones. Total synthesis of (+)-(S,S)-(cis-6-methyltetrahydropyran-2-yl)acetic acid: a civet constituent. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3474–3480 (1986).
208. Khersonsky, O., Roodveldt, C. & Tawfik, D. S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 498–508 (2006).
209. Matzel, P., Krautschick, L. & Höhne, M. Photometric characterization of the reductive amination scope of the imine reductases from *Streptomyces tsukubaensis* and *Streptomyces ipomoeae*. *ChemBioChem* **18**, 2022–2027 (2017).
210. Borlinghaus, N., Gergel, S. & Nestl, B. M. Biocatalytic access to piperazines from diamines and dicarbonyls. *ACS Catal.* **8**, 3727–3732 (2018).
211. Morlock, L. K., Böttcher, D. & Bornscheuer, U. T. Simultaneous detection of NADPH consumption and H₂O₂ production using the Ampliflu™ Red assay for screening of P450 activities and uncoupling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 985–994 (2018).
212. Vogel, M., Büldt, A. & Karst, U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis - a critical review. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **366**, 781–791 (2000).
213. Preeti, R., Pandey, A. & Binod, P. Microbial production of ketoreductases: Development of a novel high-throughput screening method. *Bioresour. Technol.* **242**, 319–323 (2017).
214. Mesquita, C. S. *et al.* Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal. Biochem.* **458**, 69–71 (2014).
215. Megraw, R. E., Reeves, H. C. & Ajl, S. J. Reaction of pyridine nucleotides with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Nature* **205**, 502–503 (1965).
216. Megraw, R. E. Reaction of reduced nicotinamide adenine dinucleotide with 2,4-dinitrophenylhydrazine in serum lactate dehydrogenase assays. *Am. J. Clin. Pathol.* **56**,

- 225–226 (1971).
217. Zumbrägel, N., Merten, C., Huber, S. M. & Gröger, H. Enantioselective reduction of sulfur-containing cyclic imines through biocatalysis. *Nat. Commun.* **9**, 1949 (2018).
218. Pick, A. *et al.* Identification and characterization of two new 5-keto-4-deoxy-D-glucarate dehydratases/decarboxylases. *BMC Biotechnol.* **16**, 80 (2016).
219. Reetz, M. T. & Carballeira, J. D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* **2**, 891–903 (2007).
220. Tavanti, M. *et al.* The crystal structure of P450-TT heme-domain provides the first structural insights into the versatile class VII P450s. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **501**, 846–850 (2018).
221. Kille, S. *et al.* Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth. Biol.* **2**, 83–92 (2013).
222. Biasini, M. *et al.* SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, 252–258 (2014).
223. Zeymer, C. & Hilvert, D. Directed evolution of protein catalysts. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 131–157 (2018).
224. Li, R.-J. *et al.* Enhancing the catalytic performance of a CYP116B monooxygenase by transdomain combination mutagenesis. *ChemCatChem* **10**, 2962–2968 (2018).
225. Li, A., Qu, G., Sun, Z. & Reetz, M. T. Statistical analysis of the benefits of focused saturation mutagenesis in directed evolution based on reduced amino acid alphabets. *ACS Catal.* **9**, 7769–7778 (2019).
226. Reetz, M. T. *Directed Evolution of Selective Enzymes*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016). doi:10.1002/9783527655465.
227. Qu, G., Li, A., Acevedo-Rocha, C. G., Sun, Z. & Reetz, M. T. The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 13204–13231 (2020).
228. Kille, S., Zilly, F. E., Acevedo, J. P. & Reetz, M. T. Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution. *Nat. Chem.* **3**, 738–743 (2011).
229. Acevedo-Rocha, C. G. *et al.* P450-catalyzed regio- and diastereoselective steroid hydroxylation: Efficient directed evolution enabled by mutability landscaping. *ACS Catal.* **8**, 3395–3410 (2018).
230. Basler, S. *et al.* Efficient Lewis acid catalysis of an abiological reaction in a de novo protein scaffold. *Nat. Chem.* **13**, 231–235 (2021).
231. Reetz, M. T. The importance of additive and non-additive mutational effects in protein engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2658–2666 (2013).
232. Starr, T. N. & Thornton, J. W. Epistasis in protein evolution. *Protein Sci.* **25**, 1204–1218 (2016).
233. Mitchell, L. A. *et al.* Multichange isothermal mutagenesis: a new strategy for multiple site-directed mutations in plasmid DNA. *ACS Synth. Biol.* **2**, 473–477 (2013).
234. Huang, Z., Wagner, C. R. & Benkovic, S. J. Nonadditivity of mutational effects at the folate binding site of Escherichia coli dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **33**, 11576–11585 (1994).

235. Reetz, M. T., Prasad, S., Carballeira, J. D., Gumulya, Y. & Bocola, M. Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity: Rigorous comparison with traditional methods. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9144–9152 (2010).
236. Zheng, H. & Reetz, M. T. Manipulating the stereoselectivity of limonene epoxide hydrolase by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15744–15751 (2010).
237. Zhang, Z.-G., Lonsdale, R., Sanchis, J. & Reetz, M. T. Extreme synergistic mutational effects in the directed evolution of a Baeyer–Villiger monooxygenase as catalyst for asymmetric sulfoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17262–17272 (2014).
238. Sainna, M. A. *et al.* A comprehensive test set of epoxidation rate constants for iron(IV)-oxo porphyrin cation radical complexes. *Chem. Sci.* **6**, 1516–1529 (2015).
239. Dodani, S. C. *et al.* Discovery of a regioselectivity switch in nitrating P450s guided by molecular dynamics simulations and Markov models. *Nat. Chem.* **8**, 419–425 (2016).
240. Fasan, R., Chen, M. M., Crook, N. C. & Arnold, F. H. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450BM3 exhibiting natively like catalytic properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8414–8418 (2007).
241. Pochapsky, T. C., Kazanis, S. & Dang, M. Conformational plasticity and structure/function relationships in cytochromes P450. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1273–1296 (2010).
242. Acevedo-Rocha, C. G. *et al.* Pervasive cooperative mutational effects on multiple catalytic enzyme traits emerge via long-range conformational dynamics. *Nat. Commun.* **12**, 1621 (2021).
243. Osuna, S. The challenge of predicting distal active site mutations in computational enzyme design. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **11**, e1502 (2021).
244. Romero-Rivera, A., Garcia-Borràs, M. & Osuna, S. Role of conformational dynamics in the evolution of retro-aldolase activity. *ACS Catal.* **7**, 8524–8532 (2017).
245. Wang, Z.-M., Sang, X.-L., Che, C.-M. & Chen, J. Ruthenium(IV) porphyrin catalyzed highly selective oxidation of internal alkenes into ketones with Cl₂pyNO as terminal oxidant. *Tetrahedron Lett.* **55**, 1736–1739 (2014).
246. Hoffmann, S. M. Studien zur Optimierung der Katalyse mittels der Monooxygenase CYP153AM.aq. (Universität Stuttgart, 2017). doi:10.18419/opus-9932.
247. Zelasko, S., Palaria, A. & Das, A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using Escherichia coli expression systems. *Protein Expr. Purif.* **92**, 77–87 (2013).
248. Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M. & Schenkman, J. B. Enhanced expression of CYP1B1 in Escherichia coli. *Toxicology* **144**, 211–219 (2000).
249. Faiq, M. A., Ali, M., Dada, T., Dada, R. & Saluja, D. A novel methodology for enhanced and consistent heterologous expression of unmodified human cytochrome P450 1B1 (CYP1B1). *PLoS One* **9**, e110473 (2014).
250. Todd, M., Viitanen, P. & Lorimer, G. Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* **265**, 659–666 (1994).
251. Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N. & Timmis, K. N. Chaperonins govern growth of Escherichia coli at low temperatures. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1266–1267 (2003).
252. Fabara, A. N. & Fraaije, M. W. An overview of microbial indigo-forming enzymes. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.* **104**, 925–933 (2020).
253. Truesdale, G. A. & Downing, A. L. Solubility of oxygen in water. *Nature* **173**, 1236–1236 (1954).
254. Zaidlewicz, M. & Wolan, A. Syntheses with organoboranes. XIII. Synthesis of ω -(4-bromophenyl)alkanoic acids and their borylation. *J. Organomet. Chem.* **657**, 129–135 (2002).
255. Lara, M., Mutti, F. G., Glueck, S. M. & Kroutil, W. Biocatalytic cleavage of alkenes with O₂ and *Trametes hirsuta* G FCC 047. *European J. Org. Chem.* **2008**, 3668–3672 (2008).
256. Borate, H. B. *et al.* One-step method for the synthesis of aryl olefins from aryl aldehydes and aliphatic aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **54**, 1528–1530 (2013).
257. Pratsch, G. & Overman, L. E. Synthesis of 2,5-diaryl-1,5-dienes from allylic bromides using visible-light photoredox catalysis. *J. Org. Chem.* **80**, 11388–11397 (2015).
258. Kulig, J. *et al.* Stereoselective synthesis of bulky 1,2-diols with alcohol dehydrogenases. *Catal. Sci. Technol.* **2**, 1580–1589 (2012).
259. Huo, X. *et al.* Palladium-catalyzed allylic alkylation of simple ketones with allylic alcohols and its mechanistic study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6776–6780 (2014).
260. Jang, H., Jung, B. & Hoveyda, A. H. Catalytic enantioselective protoboration of disubstituted allenes. Access to alkenylboron compounds in high enantiomeric purity. *Org. Lett.* **16**, 4658–4661 (2014).
261. Bhongale, N. N., Pore, V. S. & Natu, A. A. Synthesis of optically active β -ketosulphides catalysed by quinine/quinidine and homogeneous catalysts. *Synth. Commun.* **18**, 1597–1606 (1988).
262. Fuganti, C., Grasselli, P., Spreafico, F., Zirotti, C. & Casati, P. Synthesis of the enantiomeric forms of alpha- and beta-alkoxy carbonyl compounds from the (2S,3R)-2,3-diol prepared in fermenting bakers' yeast from alpha-methylcinnamaldehyde. *J. Org. Chem.* **49**, 543–546 (1984).
263. Zawodny, W. *et al.* Chemoenzymatic synthesis of substituted azepanes by sequential biocatalytic reduction and organolithium-mediated rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17872–17877 (2018).
264. Musacchio, A. J. *et al.* Catalytic intermolecular hydroaminations of unactivated olefins with secondary alkyl amines. *Science* **730**, 727–730 (2017).
265. Pirnot, M. T., Wang, Y.-M. & Buchwald, S. L. Copper hydride-catalyzed hydroamination of alkenes and alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 48–57 (2015).
266. Sato, H., Hummel, W. & Gröger, H. Cooperative catalysis of noncompatible catalysts through compartmentalization: Wacker oxidation and enzymatic reduction in a one-pot process in aqueous media. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 4488–4492 (2015).
267. Schnapperelle, I., Hummel, W. & Gröger, H. Formal asymmetric hydration of non-activated alkenes in aqueous medium through a “chemoenzymatic catalytic system”. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 1073–1076 (2012).
268. Erb, T. J., Jones, P. R., Bar-Even, A., Hauer, B. & Lutz, S. Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **37**, 56–62 (2017).
269. Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K. & Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 88–119 (2021).
270. Ducrot, L., Bennett, M., Grogan, G. & Vergne-Vaxelaire, C. NAD(P)H-dependent enzymes

- for reductive amination: Active site description and carbonyl-containing compound spectrum. *Adv. Synth. Catal.* **363**, 328–351 (2021).
271. Roddan, R., Ward, J. M., Keep, N. H. & Hailes, H. C. Pictet–Spenglerases in alkaloid biosynthesis: Future applications in biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **55**, 69–76 (2020).
272. Brovotto, M., Gamenara, D., Saenz Méndez, P. & Seoane, G. A. C–C bond-forming lyases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **111**, 4346–4403 (2011).
273. Leisch, H., Morley, K. & Lau, P. C. K. Baeyer–Villiger monooxygenases: More than just green chemistry. *Chem. Rev.* **111**, 4165–4222 (2011).
274. Knaus, T., Böhmer, W. & Mutti, F. G. Amine dehydrogenases: efficient biocatalysts for the reductive amination of carbonyl compounds. *Green Chem.* **19**, 453–463 (2017).
275. Köhler, V. & Turner, N. J. Artificial concurrent catalytic processes involving enzymes. *Chem. Commun.* **51**, 450–464 (2014).
276. Sharma, M., Mangas-Sánchez, J., Turner, N. J. & Grogan, G. NAD(P)H-dependent dehydrogenases for the asymmetric reductive amination of ketones: Structure, mechanism, evolution and application. *Adv. Synth. Catal.* **359**, 2011–2025 (2017).
277. Aleku, G. A. *et al.* A reductive aminase from *Aspergillus oryzae*. *Nat. Chem.* **9**, 961–969 (2017).
278. Méndez-Sánchez, D., Mangas-Sánchez, J., Busto, E., Gotor, V. & Gotor-Fernández, V. Dynamic reductive kinetic resolution of benzyl ketones using alcohol dehydrogenases and anion exchange resins. *Adv. Synth. Catal.* **358**, 122–131 (2016).
279. Matteson, D. S. Product Subclass 1: Hydroboranes. in *Science of Synthesis, 6: Category 1, Organometallics* (eds. Kaufmann, Matteson, Schaumann & Regitz) (Georg Thieme Verlag, 2005). doi:10.1055/sos-SD-006-00003.
280. Brown, H. C. & Singaram, B. Chiral synthesis via organoboranes. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 1797–1800 (1984).
281. Denissova, I. & Barriault, L. Stereoselective formation of quaternary carbon centers and related functions. *Tetrahedron* **59**, 10105–10146 (2003).
282. Trost, B. M. & Jiang, C. Catalytic enantioselective construction of all-carbon quaternary stereocenters. *Synthesis* **2006**, 369–396 (2006).
283. Damborsky, J. & Brezovsky, J. Computational tools for designing and engineering enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 8–16 (2014).
284. Sumbalova, L., Stourac, J., Martinek, T., Bednar, D. & Damborsky, J. HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Res.* **46**, W356–W362 (2018).
285. Liardo, E., Ríos-Lombardía, N., Morís, F., Rebolledo, F. & González-Sabín, J. Hybrid organo- and biocatalytic process for the asymmetric transformation of alcohols into amines in aqueous medium. *ACS Catal.* **7**, 4768–4774 (2017).
286. Fuchs, M., Farnberger, J. E. & Kroutil, W. The industrial age of biocatalytic transamination. *European J. Org. Chem.* **2015**, 6965–6982 (2015).
287. Kelly, S. A. *et al.* Application of ω -transaminases in the pharmaceutical industry. *Chem. Rev.* **118**, 349–367 (2018).
288. Uthoff, F. & Gröger, H. Asymmetric synthesis of 1-phenylethylamine from styrene via combined Wacker oxidation and enzymatic reductive amination. *J. Org. Chem.* **83**, 9517–9521 (2018).

289. Roiban, G.-D. *et al.* Efficient biocatalytic reductive aminations by extending the imine reductase toolbox. *ChemCatChem* **9**, 4475–4479 (2017).
290. Lichman, B. R., Zhao, J., Hailes, H. C. & Ward, J. M. Enzyme catalysed Pictet-Spengler formation of chiral 1,1'-disubstituted- and spiro-tetrahydroisoquinolines. *Nat. Commun.* **8**, 14883 (2017).
291. Roberge, C., Fleitz, F., Pollard, D. & Devine, P. Synthesis of optically active cyanohydrins from aromatic ketones: Evidence of an increased substrate range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 208–214 (2007).
292. Saiki, R. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
293. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. in *Methods in Enzymology* vol. 155 335–350 (Academic Press, 1987).
294. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
295. Bond, S. R. & Naus, C. C. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Res.* **40**, 209–213 (2012).
296. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 3150–3152 (2012).
297. Guengerich, F. P., Martin, M. V, Sohl, C. D. & Cheng, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat. Protoc.* **4**, 1245–1251 (2009).
298. Magre, M., Paffenholz, E., Maity, B., Cavallo, L. & Rueping, M. Regiodivergent hydroborative ring opening of epoxides via selective C–O bond activation. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 14286–14294 (2020).
299. Albright, H., Vonesh, H. L. & Schindler, C. S. Superelectrophilic Fe(III)-ion pairs as stronger Lewis acid catalysts for (E)-selective intermolecular carbonyl-olefin metathesis. *Org. Lett.* **22**, 3155–3160 (2020).
300. Liu, S. & Wolf, C. Chiral amplification based on enantioselective dual-phase distribution of a scalemic bisoxazolidine catalyst. *Org. Lett.* **9**, 2965–2968 (2007).
301. Ueno, S., Usui, K. & Kuwano, R. Transformation of α -substituted propanols into γ -amino alcohols through nickel-catalyzed amination on the terminal γ -carbon of propanols. *Synlett* **2011**, 1303–1307 (2011).
302. Kundu, G., Sperger, T., Rissanen, K. & Schoenebeck, F. A next-generation air-stable palladium(I) dimer enables olefin migration and selective C–C coupling in air. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 21930–21934 (2020).
303. Werner, T., Bauer, M., Riahi, A. M. & Schramm, H. A catalytic system for the activation of diorganozinc reagents. *European J. Org. Chem.* **2014**, 4876–4883 (2014).
304. Kabalka, G. W., Li, N.-S., Tejedor, D., Malladi, R. R. & Trotman, S. Synthesis of (E)-1-aryl-1-alkenes via a novel BF₃·OEt₂-catalyzed aldol–Grob reaction sequence. *J. Org. Chem.* **64**, 3157–3161 (1999).
305. Kabalka, G. W., Tejedor, D., Li, N.-S., Malladi, R. R. & Trotman, S. A tandem aldol-Grob reaction of ketones with aromatic aldehydes. *Tetrahedron* **54**, 15525–15532 (1998).
306. Zhang, H.-P., Li, X.-F. & Li, H.-Y. Efficient stille cross-coupling reaction catalysed by the

- Pd(OAc)₂/orotic acid catalytic system. *J. Chem. Res.* **37**, 219–222 (2013).
307. Fristrup, P., Tanner, D. & Norrby, P.-O. Updating the asymmetric osmium-catalyzed dihydroxylation (AD) mnemonic: Q2MM modeling and new kinetic measurements. *Chirality* **15**, 360–368 (2003).
308. Jobin-Des Lauriers, A. & Legault, C. Y. Iodine(III)-mediated oxidative hydrolysis of haloalkenes: access to α -halo ketones by a release-and-catch mechanism. *Org. Lett.* **18**, 108–111 (2016).
309. Koya, S., Nishioka, Y., Mizoguchi, H., Uchida, T. & Katsuki, T. Asymmetric epoxidation of conjugated olefins with dioxxygen. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 8243–8246 (2012).
310. Daniel, P. E., Weber, A. E. & Malcolmson, S. J. Umpolung synthesis of 1,3-amino alcohols: stereoselective addition of 2-azaallyl anions to epoxides. *Org. Lett.* **19**, 3490–3493 (2017).
311. Fristrup, P., Dideriksen, B. B., Tanner, D. & Norrby, P.-O. Probing competitive enantioselective approach vectors operating in the Jacobsen–Katsuki epoxidation: A kinetic study of methyl-substituted styrenes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13672–13679 (2005).
312. Hunsen, M. Pyridinium chlorochromate catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes and ketones with periodic acid. *Tetrahedron Lett.* **46**, 1651–1653 (2005).
313. Zimbron, J., Seeger-Weibel, M., Hirt, H. & Gallou, F. Development of a robust and practical process for the Darzens condensation and α,β -epoxide rearrangement: Scope and limitations of the methodology. *Synthesis* **8**, 1221–1226 (2008).
314. McIntosh, M. L., Moore, C. M. & Clark, T. B. Copper-catalyzed diboration of ketones: facile synthesis of tertiary α -hydroxyboronate esters. *Org. Lett.* **12**, 1996–1999 (2010).
315. Zhou, X., Zhang, G., Huang, R. & Huang, H. Palladium-catalyzed allyl–allyl reductive coupling of allylamines or allylic alcohols with H₂ as sole reductant. *Org. Lett.* **23**, 365–369 (2021).
316. Liu, P., Yasir, M., Ruggi, A. & Kilbinger, A. F. M. Heterotelechelic polymers by ring-opening metathesis and regioselective chain transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 914–917 (2018).
317. Beaulieu, L.-P. B., Zimmer, L. E., Gagnon, A. & Charette, A. B. Highly enantioselective synthesis of 1,2,3-substituted cyclopropanes by using α -iodo- and α -chloromethylzinc carbenoids. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 14784–14791 (2012).
318. Li, C. *et al.* Palladium-catalyzed regioselective aerobic allylic C–H oxygenation: direct synthesis of α,β -unsaturated aldehydes and allylic alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **360**, 1600–1604 (2018).
319. Matsumoto, T., Ohishi, M. & Inoue, S. Selective cross-acyloin condensation catalyzed by thiazolium salt. Formation of 1-hydroxy 2-one from formaldehyde and other aldehydes. *J. Org. Chem.* **50**, 603–606 (1985).
320. Kondekar, N. B. & Kumar, P. Synthesis of (R)-selegiline via hydrolytic kinetic resolution. *Synth. Commun.* **41**, 1301–1308 (2011).
321. Wang, J.-C., Sakakibara, M., Liu, J.-Q., Dairi, T. & Itoh, N. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding phenylacetaldehyde reductase from styrene-assimilating *Corynebacterium* sp. strain ST-10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 386–392 (1999).
322. Schlieben, N. H. *et al.* Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. *J. Mol. Biol.* **349**, 801–813 (2005).

323. Vázquez-Figueroa, E., Chaparro-Riggers, J. & Bommarius, A. S. Development of a thermostable glucose dehydrogenase by a structure-guided consensus concept. *ChemBioChem* **8**, 2295–2301 (2007).

7. Anhang

7.1. Varianten des Panels zur Startpunktbestimmung

Tabelle 30 – Gescreente Varianten des Panels zur Startpunktbestimmung unter Angabe der enthaltenen Aminosäuresubstitutionen.

Variante	Substitution	Variante	Substitution
LA1	Wildtyp	LA1-P7F	P7-V123I, H206W
LA1-P1A	N201K, Y385H	LA1-P7.5	P7-V123I, I326V
LA1-P1B	T121A, I198M	LA1-P8	P7.5-M118L
LA1-P2	N201H, Y385H	LA1-P8A	P8-R120Q
LA1-P4	T121A, N201K, Y385H	LA1-P8B	P8-V327M
LA1-P6	P4-N209S	LA1-P9	P8-R120H
LA1-P6A	P6-R155H	LA1-P9A	P9-M391L
LA1-P7	P6-E418G	LA1-P10	P9-V327M
LA1-P7A	P7-V123I	LA1-P10A	P10-A103M
LA1-P7B	P7-I326V	LA1-P10B	P10-M391L
LA1-P7C	P7-H206W	LA1-P11	P10-A103L
LA1-P7D	P7-H206W, I326V	LA1-P12	P11-M391L
LA1-P7E	P7-V123I, H206W, I326V		

7.2. P450-katalysierte Nebenreaktion ausgehend von Epoxiden

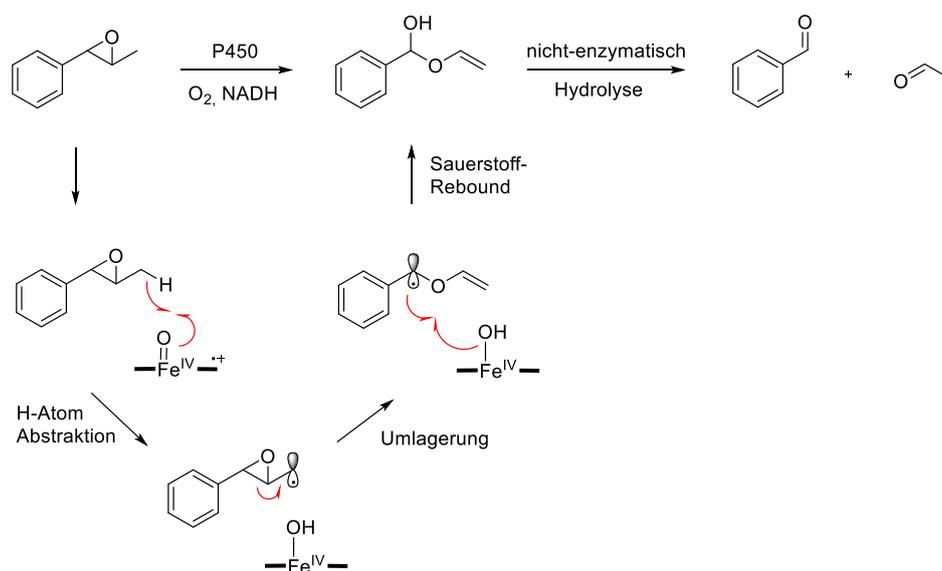


Abbildung 56 – Postulierter Mechanismus für eine P450-katalysierte Nebenreaktion, die zum Abbau des zuvor gebildeten Epoxid-Produkts führen kann.

7.3. Chromatogramme ausgewählter Biotransformationen

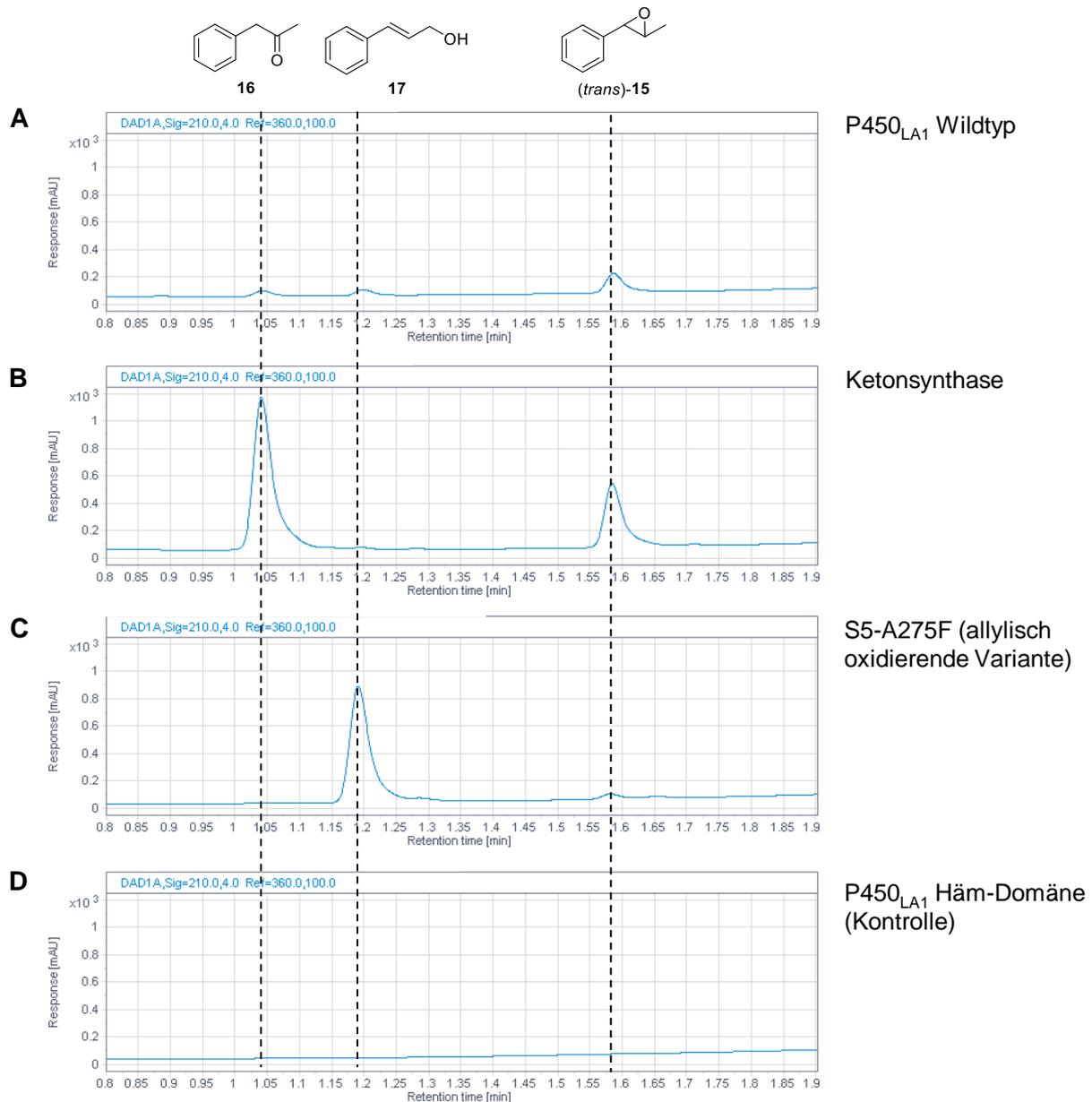


Abbildung 57 – Chromatogramme interessanter Varianten und Kontrollen. UHPLC-Analyse von Biotransformationen (2 h Reaktionszeit) unter Verwendung von *trans*-β-Methylstyren (*trans*-**14**, 5 mM) als Substrat und NADH (5 mM) als Cofaktor. In jedem gezeigten Beispiel wurde eine Enzymkonzentration von 0.625 μM verwendet. **(A)** Oxidationsproduktbildung mit dem P450_{LA1}-Wildtyp. **(B)** Nach zwölf Runden gerichteter Evolution wurde die Produktverteilung in Richtung der Bildung von Phenylacetone (**16**) als Hauptprodukt mit der Ketonsynthese verschoben. Nur Spuren von Zimtalkohol (**17**, allylische Oxidation) können nachgewiesen werden. **(C)** Variante S5-A275F bildet hauptsächlich Zimtalkohol. **(D)** Kontrolleexperimente mit der Häm-Domäne von P450_{LA1} zeigen keine Bildung von Oxidationsprodukten und lassen den Schluss zu, dass die Häm-Domäne allein (ohne die Reduktase-Domäne) nicht katalytisch aktiv ist.

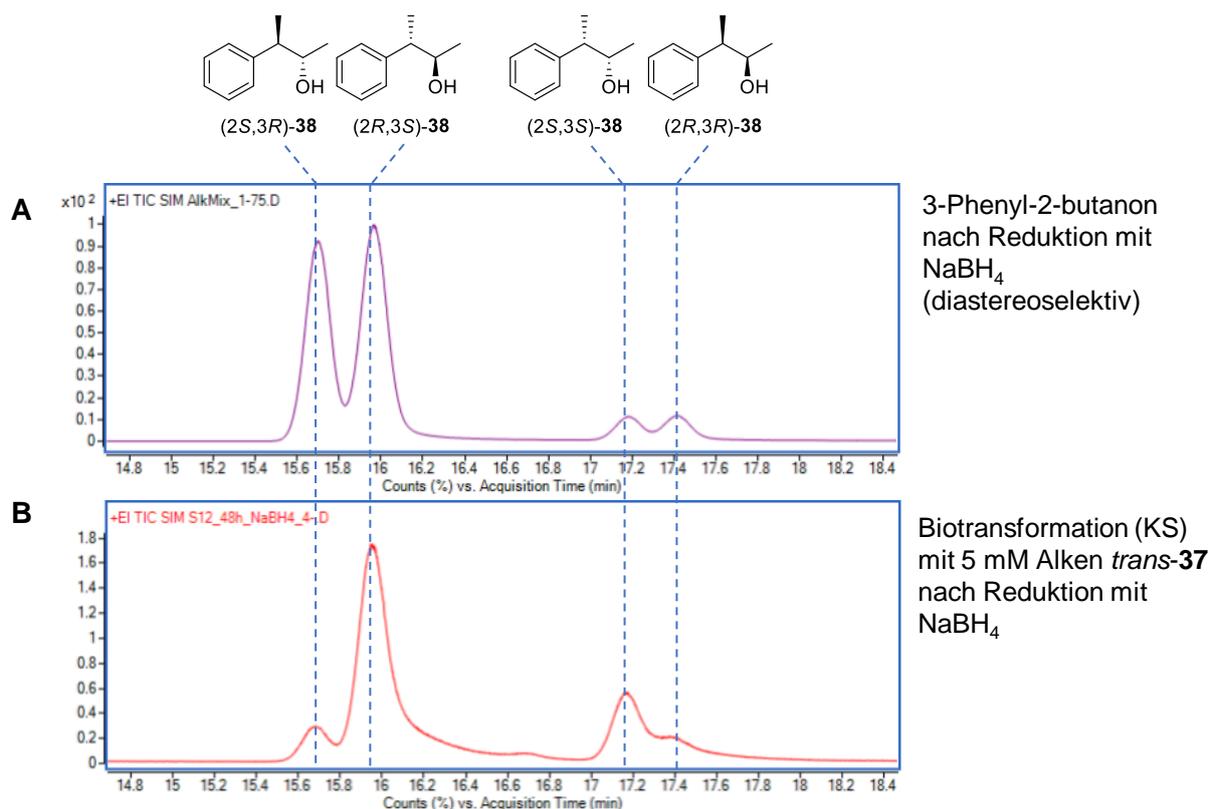


Abbildung 58 – (A) Chirale GC/MS-Analyse von Biotransformationen von (*E*)-But-2-en-2-ylbenzol (*trans*-37, 5 mM) mit der Ketonsynthese nach direkter Reduktion des gebildeten Ketons mit Natriumborhydrid (etwa 1 mg) vor der Extraktion. (B) Die resultierende Produktverteilung von 3-Phenylbutan-2-ol (38) erlaubt die Zuordnung der absoluten Stereochemie des enzymatisch gebildeten 3-Phenylbutan-2-ols (30). Da die Reduktion mit NaBH_4 nicht enantioselektiv ist, wird das Stereozentrum in 2-Position nicht kontrolliert. Das (3*S*)-konfigurierte Enantiomer ist das Hauptprodukt für beide Diastereomere und wird von der Ketonsynthese kontrolliert. Die Zuordnung der Stereoisomere wurde durch Vergleich mit authentischen Standards vorgenommen.

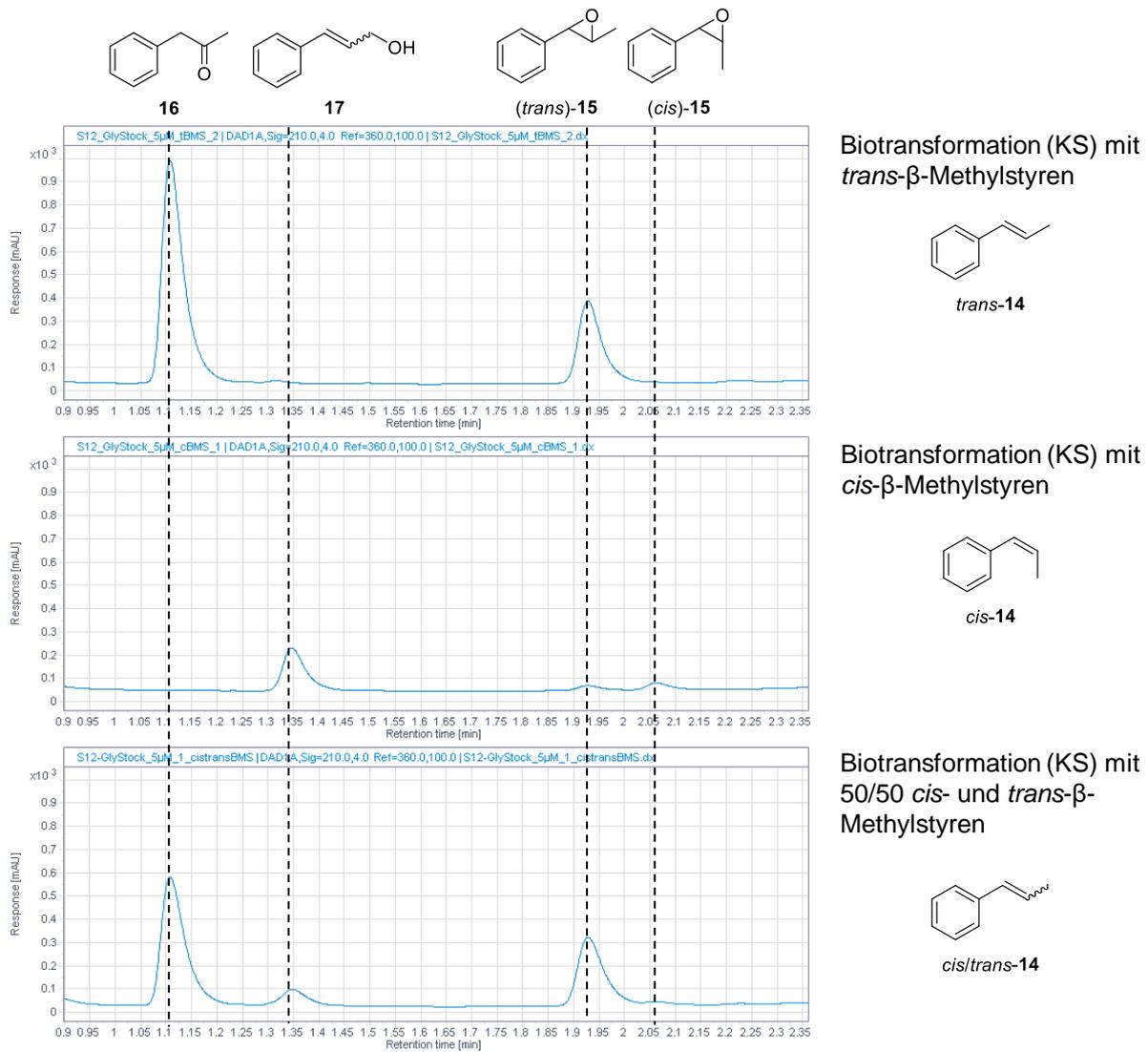
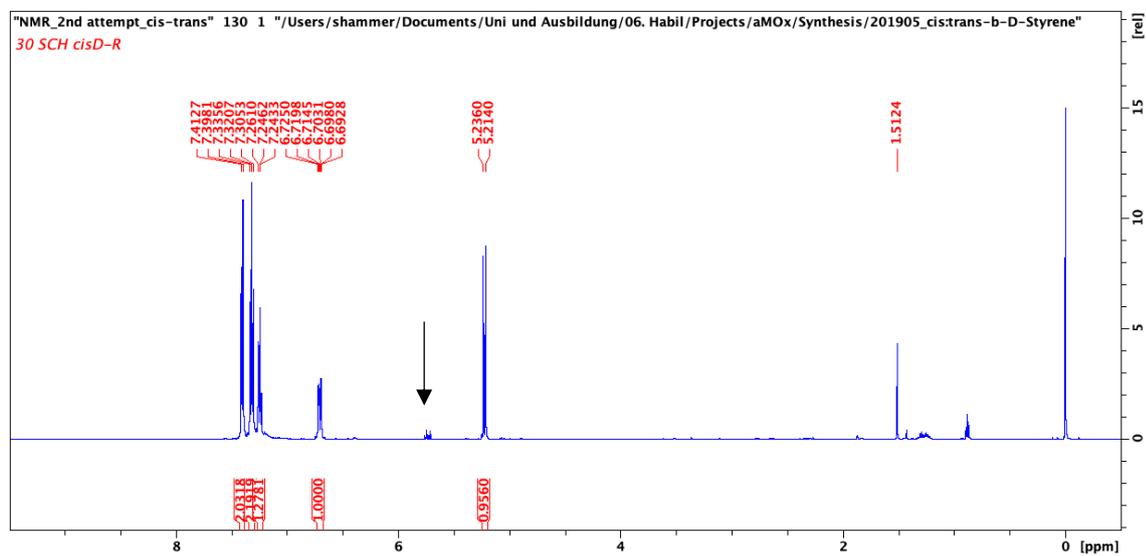


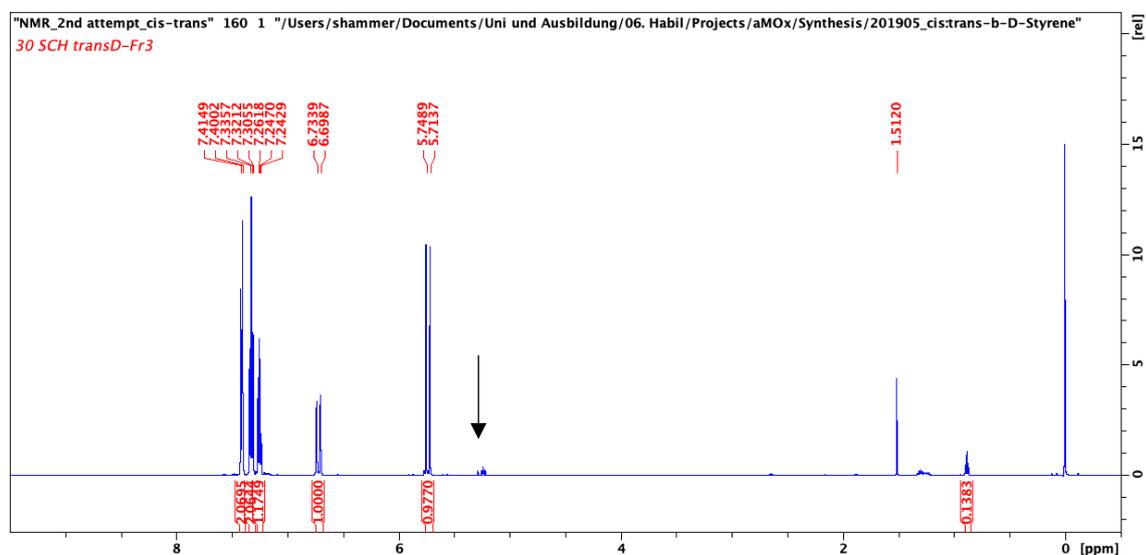
Abbildung 59 – Sowohl *cis*- als auch *trans*- β -Methylstyren (**14**) können unter Standardbedingungen als Substrat für die Ketonsynthese dienen. Während *trans*- β -Methylstyren (*trans*-14) hauptsächlich in Phenylacetone (**16**) umgewandelt wurde, wurde für *cis*- β -Methylstyren (*cis*-14) kein Keton identifiziert. Es wurden beträchtliche Mengen an Zimtalkohol (**17**, allyliche Oxidation) und sowohl *cis*- als auch *trans*-Epoxide (**15**) gebildet. Die Verwendung einer 50/50-Mischung von *cis*- und *trans*-Alkenen ergibt eine Linearkombination der beiden einzelnen Produktverteilungen.

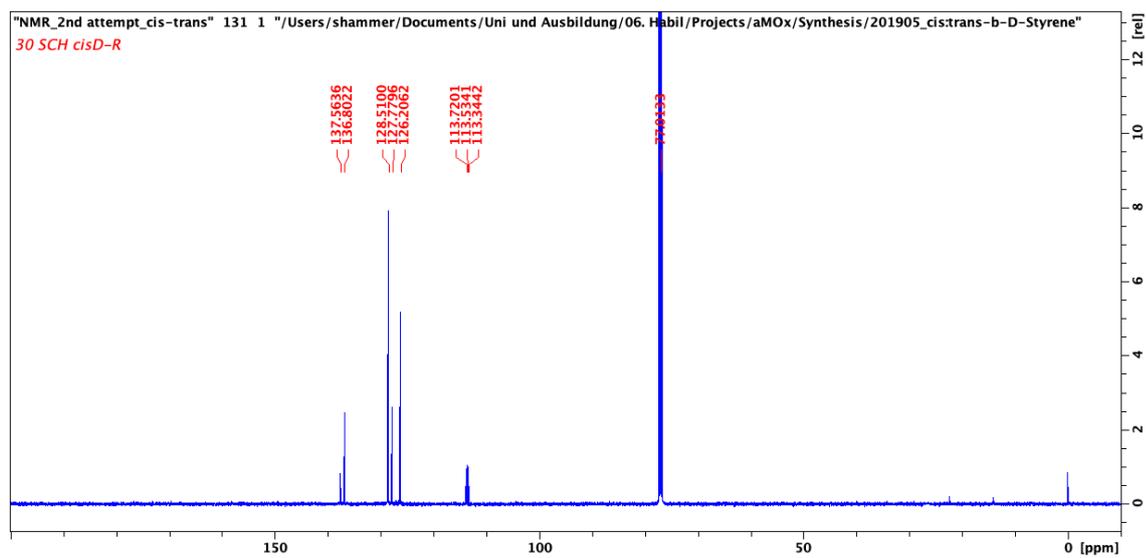
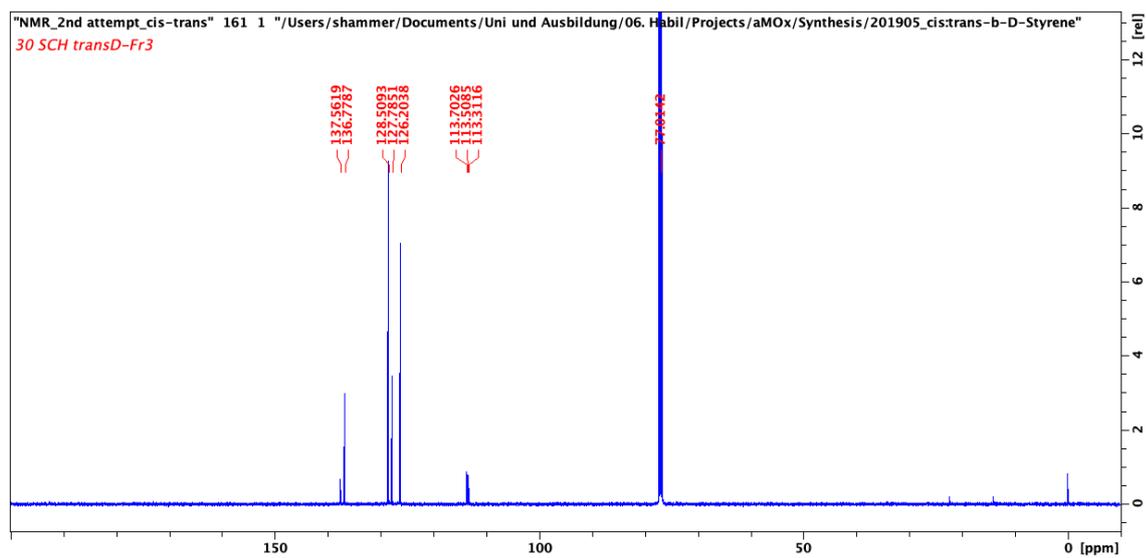
7.4. NMR-Spektren Deuterium-markierter Verbindungen

$^1\text{H-NMR}$: *cis*-Styren- β - d (2)

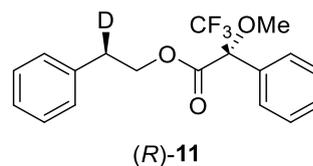


$^1\text{H-NMR}$: *trans*-Styren- β - d (4)

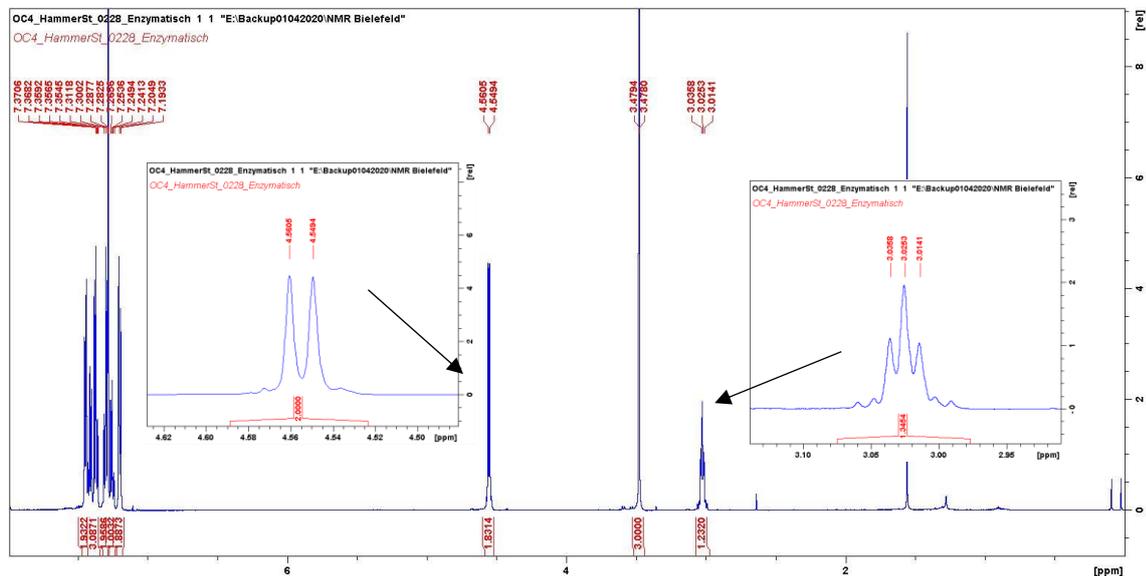


^{13}C -NMR: *cis*-Styren- β - d (2) ^{13}C -NMR: *trans*-Styren- β - d (4)

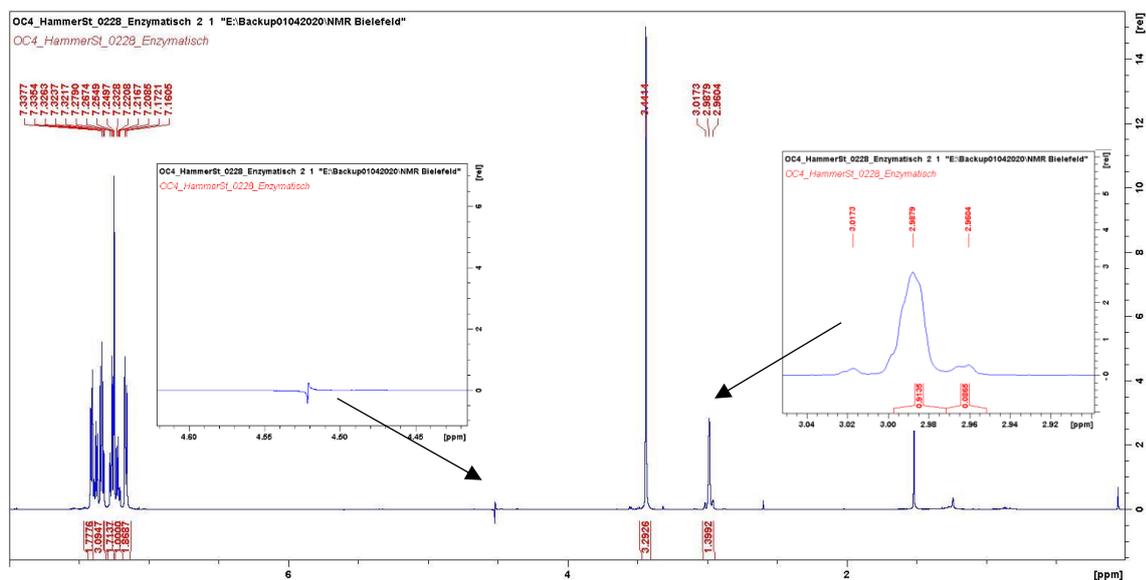
(R)-2-Phenylethyl-2-d (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoate ((R)-11):



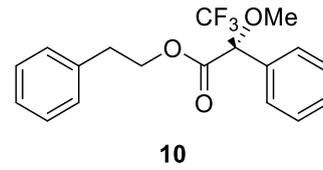
¹H-NMR:



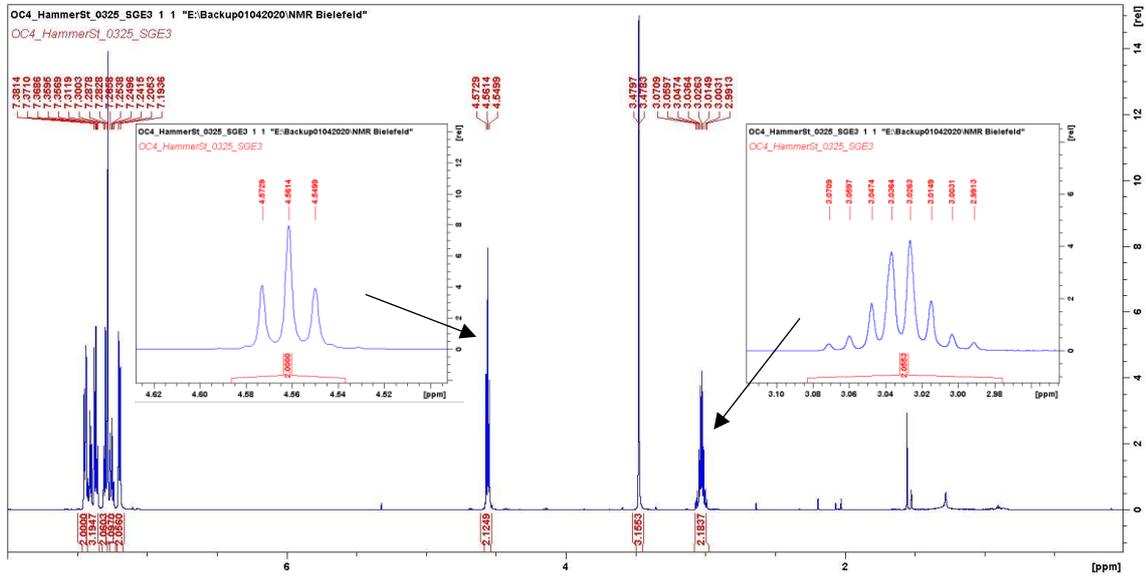
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) mit Entkopplung durch Anregung der Methylenprotonen ($\delta = 4.52$ ppm) unter Verwendung des Bruker zgpd.2 Standardpuls-Programms:



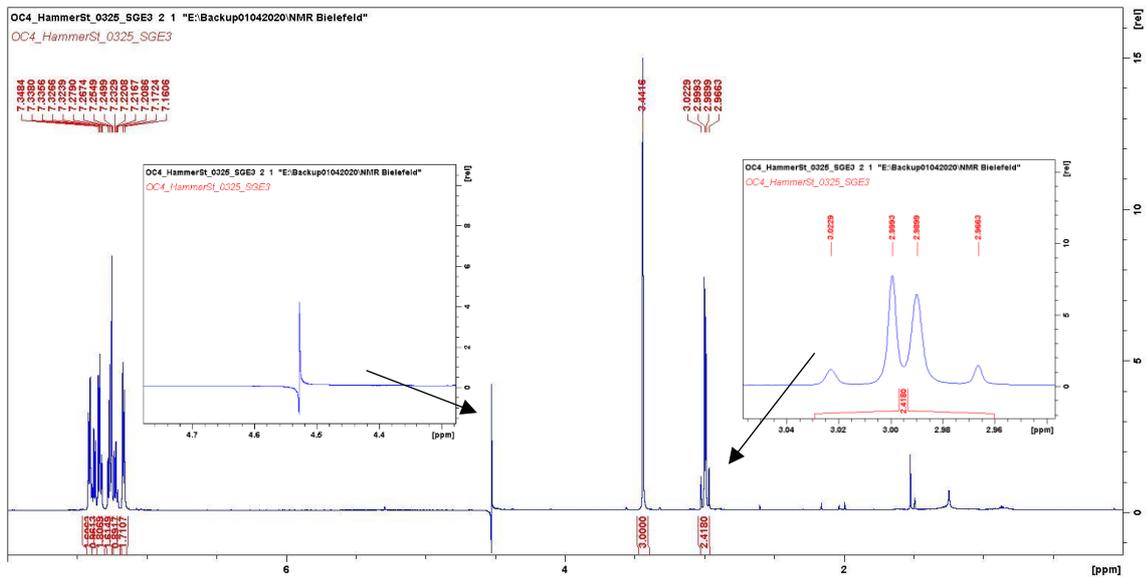
Phenethyl (*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoate (10):



¹H-NMR:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) mit Entkopplung durch Anregung der Methylenprotonen ($\delta = 4.52$ ppm) unter Verwendung des Bruker zgpd.2 Standardpuls-Programms:



7.5. DNA- und Aminosäuresequenzen

P450_{LA1} wurde in Vorarbeiten in einen pET22b(+)-Vektor kloniert, der einen C-terminalen Poly-His₆-Tag enthält.⁷² Im Folgenden angegeben sind Gen- und Aminosäuresequenzen von P450_{LA1} (Uniprot ID: A0P0F6) und der evolvierten Ketonsynthase sowie Aminosäuresequenzen der Varianten P7E, S5-A275F und aMOx.

P450_{LA1}

ATGGAACGCACTGCAAATCCAGCGGACGTTCCGGCTGGTGGTAAATCTTCTGAAGGCAAGGCGGGTACTCCACCGGCTGCTGAGCTCAATGCCCTTTCAGCAAAATGGCAGCAGATTTTCGACGCTTTCGACAGGCCATATCAGGCTGATCCGGCAGAAGCGCTGCTGGTCTCGTGACCAGCTGCCGGTTTTCTATTCCCCGAACCTGGGTACTGGGTGGTTTTCTCGTTACGATGATATCAAAGCTGTTTTTCGTGACAACATCCTGTTTCAGCCCGCTAACGCTCTGGAAAAAATTACTCCGGCAACCCCGGAAGCGATGGAGGTCTGAAAGGTTATGGTTACGCAATGAACCGTACCATGGTTAACGAAGACGAACCAGTTCACATGGAACGTCGTCGTGCACCTGATGGGCCACTTCTGCCGACAATCTGGAAGCTCGTCAGGAGATGGTACGCCGCTGACCCGGAAAAAATCGATGCATTCATCGATTCGGTTCGCGTGGATCTGGTGAAGCCATGCTGTATGAGGTTCCGCTGAACGTTGCTCTGCACCTTCTGGGCGTTCGGGAGGATGACATTGCCATTCTGAAAACTTTCTGTGCGCACACAGCGTCAACACCTGGGGTAAACCGACCGATGAGCAGCAGGTTGCGATCGCACACGACGTTGGTCAGTTCGGAACCTATGCTGGTAAAATCATCGAAAAAATGCGCAAGGAACCGGACGGTACCGGTTGGATGCACGAAACCATCCGTA AAAACGCAGAAATGCCGGATATTGTTCCGGATTCTTATGTTCACTCCATGATGATGGCGATCATCGTTGCGGCACACGAGACCACCGCTGCCCTCTGCAGGTATGTTTAAAACCTGCTGACTCACCGTCAGGCTTGGCAGGATATCTGCGAGGACCCGCTCCTGATTCCGAACGCAGTTGAGGAGTGTCTGCGTTATAGCGGCTCCATCGTGGCATGGCGTCGTCAGCTACGGCTGCCACCCGATCGGTGGTGTGACATCCCGGAAGGTGCTAACTGCTGATCGTTCAAGCATCTGGTAATCAGGATGAGCGTCACTTCGAGGATGGTGACAAATTTGACATCTACCGGATAACCGGTGGACCACCTGACCTTTGGCTACGGTTCTCATCAGTGTATGGGCAAAAACATTGCCCGTATGGAGATGCGCATCTTCTGGAAGAAATGACTCGTCGCCTGCCTCACCTGCAACTGGCGGAACAGGAATCACTTACCTGTCCAACACCAGCTTTCGTGGTCCGGATCATGTGTGGTTCGAATGGGATCCGGAAAAAACCCTGAACGTGCCGATCCGAGCCTGGCTAACGGCAACCACCGTTTTCCAGTTGGTGCCCCAGCCCGCGTGATATTGCAGTAAAATTCGCATCAAACTGTTTCGTGCTGAAGCCGACGGCATCCTGGGCTGACCATTGAGGATGCAAAGGTCGTTCTCTGCCAGTTGGTCCGCTGGTGCACATCGAAGTGTGTGTGACGGCTTCGACCGTAAATATCCCTGTGTGGTTCGTGCCGACTCCGTGACTATGATATCGCAGTTCGTGGAAGAAGGCGGTGCGGGTGGTAGCCGTCGTATTACGAAGTGGCTGCCGAGGGCTGGAGCTGCGCCTGCGTGGTCTTCTAACCTGTTCCGCTGGACGAACAGGCGCTTCTATGTTCTGATTGCGGGTGGCATTGGTATCACCCCGATCCTGGCAATGGCGGACCACCTGAAAGCCCTGGGTCGTGACTACACCATCCACTACTGCGGTCGTTCTCGTCGTTCTATGGCATTCTGGACCGTCTGCAGGCAGACCATGGCGAGCGTCTGTCTGTGCATGCTGGCGATGAGAACCCTCACGCCGAGCTGGCTGGTATTGTTGCCTCCCTGCCGAAGGTGGCCAGATTTACGCATGTGGTCCGGAACGTATGATCAGCGAGCTGGAAGATCTGACCGCCGCTGCCACATGGCACCTGCATTTTCAGCACTTCAGCGCTCAGGAACTGCCTGGACCCGCTAAAGAAAACGCATTCCAGGTAGAACTGAAAGATTCCGGTCTGACTCTGGAGGTGGCTGCGAACGTTACCCCTGCTGGATGCACTGTGGCGTCTGGTATCGATATCTTGTGACTGCCGTGAAGGCCTGTGTGGCTCTTGCAGGTTAGAAGTCTGGAGGGCGAGATCGACCACCGCAGCTGGTACTGACTCGCACCGAACGTGCGGAAAACCGTCGCATGATGTCTTGCTGTTCCCGCTCTGTA AAAAGCGGTAAGCTGAAACTGGCACTGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

MERTANPADVPAGGKSSEGKAGTPPAEAEQCPFSKMAADFDAFAGPYQADPAEALRWSRDQLPVFYSPNLGYWVVSRYDDIKA
VFRDNI LFS PRNALEKI TPATPEAMEVLKGYGYAMNRTMVNEDEPVHMERRRALMGHFLPDNLEARQEMVRRRLTREKIDAFID
SGRVDLVEAMLYEVLNVALHFLGVPEDDIAILKNFSVAHSVNTWKGPTDEQQVAIAHDVQGFWNYAGKII EKMRKEPDGTGW
MHETIRKNAEMPDIVPDSYVHSMMAIIVA AHETTS LASAGMFKLLTHRQAWQDICE DPSLI PNAVEECLRYSGSIVAWRRQ
ATAATRIGGVDIPEGAKLLIVQASGNQDERHFEDGDKFDIYRDNAV DHLT FGYGSHQCMGKNIARMEMRIFLEEMTRRLPHLQ
LAEQEFTYLSNTSFRGPDHVWVEWDPEKNPERADPSLANGNHRFPVGAPARRDIARKIRIKTVRREADGILGLTIEDAKGRSL
PRWSAGAHIEVCVDGFRKYS LCGRADSRDYDIAVLL EEGRRGSSRIHEVAAEGLELRLRGPSNLFRLEDEQARSYVLIAGGI
GITPILAMADHLKALGRDYTIHYCGRSRRSMAFLDRLQADHGERLSVHAGDENRHAELAGIVASLPEGGQIYACGPERMISEL
EDLTARLPHGTLHFHFS AQETALDPSKENAFQVELKDSGLTLEVAANVTLLDALLASGIDISCDCREGLCGSCEVEVLEGEI
DHRDVVLRTERAENRRMMSCCSRSVKGGKLLKALLEHHHHHH

Ketonsynthase (P450_{LA1}-S12)

ATGGAGCGCACTGCAAATCCAGCGGACGTTCCGGCTGGTGGTAAATCTTCTGAAGGCAAGGCGGGTACTCCACCGCTGCTGA
AGCTCAATGCCCTTTCAGCAAAATGGCAGCAGATTTTCGACGCTTTCGACGGCCATATCAGGCTGATCCGGCAGAAGCGCTGC
GTTGGTCTCGTGACCAGCTGCCGGTTTTCTATTCCCGAACCTGGGTTACTGGGTGGTTTTCTCGTTACGATGATATCAAAGCT
GTTTTTCGTGACAACATCCTGTTACGCCCAGCGTAACGCTCTGGAAAAATCACTCCGGCAACCCCGGAAGCGATGGAGGTCTA
TAAAGGTTATGGTTACCAGATGAACCAAGTCATGATTAACGAAGACGAACCAAGTTCACATGGAACGTCGTCGTCGACTGATGG
GCCACTTCTGCCGGACAATCTGGAAGCTCGTCAGGAGATGGTACGCCGCTGACCCGCGAAAAAATCGATGCATTTCATCGAT
TCCGGTCGCGTGGATCTGGTGGAAAGCCATGCTGTATGAGGTTCCACTGAACGTTGCCCTGCACCTTCTGGGCGTTCCGGAGGA
TGACATTGCCATTCGAAAAAGTTTTCTCATGCAGCGAGCCAGAGCGTATGGGGTAAACCGACCGATGAGCAGCAGGTTGCGA
TCGCACACGACGTTGGTCAGTTCGGAACATATGCTGGTAAAATCATCGAAAAAATGCGCAAGGAACCGGACGGTACCGGTTGG
ATGCACGAAACCATCCGTA AAAACGCAGAAATGCCGGATATTGTCCCGGATTCTTATGTTCACTCCATGATGTTCCGGATCAT
CGTTGCCGCACACGATAACCAGCCTGGCCTCTGCAGGATGTTTTAAAACCTGCTGACTCACCGTCAGGCTTGGCAGGATA
TCTGCGAGGACCCGCTCTGATTCCGAACGCAGTTGAGGAGTGTCTGCGTTATAGCGGCTCCGTTGTGGCATGGCGTCGTCAA
GCTACGGCTGCCACCCGATCCGGTGGTGTGACATCCCGGAAGGTGCTAAACTGCTGATCGTTCAAGCATCTGGTAATCAGGA
TGAGCGTCACTTCGAGGATGGTGACAAATTTGACATCTACCGCGATAACCGGTTGGACCACCTGACCTTTGGCCACGGTTCTC
ACCACTGTATGGGCTTAACATTGCCCGTATGGAGATGCGCATCTTCTGGAAGAAATGACTCGTCGCCCTGCCTCACCTGCAA
CTGGCGGGACAGGAATCACTTACTGGTCCAACACCAGCTTTCGTTGGTCCGGATCATGTGTGGGTGCAATGGGATCCGGAAAA
AAACCTGAACGTTGCCGATCCGAGCCTGGCTAACGGCAACACCCTTTCCAGTTGGTGGCCAGCCCGCCGCTGATATTGCAC
GTA AAAATTCGCATCAAACTGTTCTGTCGTGAAGCCGACGGCATCCTGGGCTGACCATTGAGGATGCAAAGGGTGGTTCTCTG
CCAGTTGGTCCGCTGGTGCACATCGAAGTGTGTGTTGACGGCTTCGACCGTAAATATTCCCTGTGTGGTGGTGCAGGACTC
CCGTGACTATGATATCGCAGTTCGCTGGAAGAAGGCGGTGCGGTTGGTAGCCGTCGTATTACGAAGTGGCTGCCGAGGGCC
TGGAGCTGCGCCTGCGTGGTCTTCTAACCTGTTCCGCTGGACGAACAGGCGGTTCCATGTTCTGATTGCGGGTGGCATT
GGTATCACCCCGATCCTGGCAATGGCGGACCACCTGAAAGCCCTGGGTCGTGACTACACCATCCACTACTGCGGTCGTTCTCG
TCGTTCTATGGCATTCCTGGACCGTCTGCAGGCAGACCATGGCGAGCGTCTGTCTGTGCATGCTGGCGATGAGAACCCTCACG
CCGAGCTGGCTGGTATTGTTGCCTCCCTGCCGGAAGGTGGCCAGATTTACGCATGTGGTCCGGAACGTATGATCAGCGAGCTG
GAAGATCTGACCGCCGCTCTGCCACATGGCACCCCTGCATTTTCGAGCACTTCAGCGCTCAGGAACTGCCCTGGACCCGCTTAA
AGAAAACGCATTCCAGGTAGA ACTGAAAGATTCCGCTGACTCTGGAGGTGGCTGCGAACGTTACCCTGCTGGATGCACTGC
TGGCTCTGGTATCGATATCTCTTGTGACTGCCGTGAAGCCTGTGTGGCTCTTGGCAGGTAGAAGTCTGGAGGGCGAGATC
GACCACCGCAGCTGTTACTGACTCGCACCGAACGTTGCCGAAAACCTGCGCATGATGTCTTGGCTGTTCCCGCTCTGTA AAAAG
CGGTAAGCTGAAACTGGCACTGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

MERTANPADVPAGGKSSEKAGTPPAEAEQCPFSKMAADFDAFAGPYQADPAEALRWSRDQLPVFYS PNLGYWVVSRYDDIKA
VFRDNILFSPRNALEKITPATPEAMEVYKGYGYQMNQVMINEDEPVHMERRRALMGHFLPDNLEARQEMVRRLTREKIDAFID
SGRVDLVEAMLYEVPLNVALHFLGVPEDDIAILKFSHASQSVWGKPTDEQQVAIAHDVGFQFVNYAGKIEKMRKEPDGTGW
MHETIRKNAEMPDIVPDSYVHSMMF A I I V A A H D T T S L A S A G M F K T L L T H R Q A W Q D I C E D P S L I P N A V E E C L R Y S G S V V A W R R Q
ATAATRIGGVDIPEGAKLLIVQASGNQDERHFEDGDKFDIYRDNVDHLTFGHGSHQCMGLNIARMEMRIFLEEMTRRLPHLQ
LAGQEFTYWSNTSFRGPDHVWVEWDPEKNPERADPSLANGNHRFPVGA PARRDIARKIRIKTVRREADGILGLTIEDAKGRSL
PRWSAGAHIEVCVDGFDRKYS L C G R A D S R D Y D I A V L L E E G G R G S R R I E H V A A E G L E L R L R G P S N L F R L D E Q A R S Y V L I A G G I
GITPILAMADHLKALGRDYTIHYCGRSRRSMAFLDRLQADHGERLSVHAGDENRHAELAGIVASLPEGGQIYACGPERMISEL
EDLTARLPHGTLHFEHFSAQETALDPSKENAFQVELKDSGLTLEVAANVTLLDALLASGIDISDCREGLCGSCEVEVLEGEI
DHRDVVLRTERAENRRMMSCCSRSVKGGKLLALLEHHHHHH

P450_{LA1}-S12 weist im Vergleich zu P450_{LA1} die folgenden Aminosäuresubstitutionen auf: L111Y, A117Q, R120Q, T121V, V123I, N201K, V204H, H206A, V208Q, N209S, T210V, M274F, E282D, I326V, Y385H, K393L, E418G, L424W.

P450_{LA1}-P7E

ATGGAGCGCACTGCAAATCCAGCGGACGTTCCGGCTGGTGGTAAATCTTCTGAAGGCAAGGCGGGTACTCCACCGCTGCTGA
 AGCTCAATGCCCTTTCAGCAAAATGGCAGCAGATTTTCGACGCTTTCGACGGCCATATCAGGCTGATCCGGCAGAAGCGCTGC
 GTTGGTCTCGTGACCAGCTGCCGGTTTTCTATTCCCCGAACCTGGGTTACTGGGTGGTTTCTCGTTACGATGATATCAAAGCT
 GTTTTTCGTGACAACATCCTGTTACGCCCAGCGTAACGCTCTGGAAAAATCACTCCGGCAACCCCGGAAGCGATGGAGGTCCT
 GAAAGGTTATGGTTACGCAATGAACCGTGCCATGATTAACGAAGACGAACCAAGTTCACATGGAACGTCGTCGTCGACTGATGG
 GCCACTTCTGCCGGACAATCTGGAAGCTCGTCAGGAGATGGTACGCCGCTGACCCGCGAAAAATCGATGCATTTCATCGAT
 TCCGGTCCGCTGGATCTGGTGGAAAGCCATGCTGTATGAGGTTCCACTGAAAGCTTGCCTGCACCTTCTGGGCGTTCGGGAGGA
 TGACATTGCCATTTGAAAAAGTTTTCTGTGCGATGGAGCGTCAGCACCTGGGGTAAACCGACCGATGAGCAGCAGGTTGCGA
 TCGCACACGACGTTGGTCAGTTCGGAACTATGCTGGTAAAATCATCGAAAAATGCGCAAGGAACCGGACGGTACCGGTTGG
 ATGACAGAAACCATCCGTAACCAACGAGAAATGCCGGATATTGTCCCGGATTCTTATGTTCACTCCATGATGATGGCGATCAT
 CGTTGCCGACACGAGACCAGCCTGGCCTCTGCAGGATGTTTTAAAACCTGCTGACTCACCGTCAGGCTTGGCAGGATA
 TCTGCGAGGACCCGCTCTGATTCCGAACGCAGTTGAGGAGTGTCTGCGTTATAGCGGCTCCGTTGTGGCATGGCGTCGTCAA
 GCTACGGCTGCCACCCGATCGGTGGTGTGACATCCCGGAAGGTGCTAAACTGCTGATCGTTCAAGCATCTGGTAATCAGGA
 TGAGCGTCACTTCGAGGATGGTGACAAATTTGACATCTACCGGATAACCGGGTGGACCACCTGACCTTTGGCCACGGTTCTC
 ACCAGTGTATGGGCAAAACATTGCCCGTATGGAGATGCGCATCTTCTGGAAGAAATGACTCGTCGCCTGCCTCACCTGCAA
 CTGGCGGGACAGGAATCACTTACCTGTCCAACACCAGCTTTCGTGGTCCGGATCATGTGTGGGTGCAATGGGATCCGGAAAA
 AAACCTGAAAGTGGCGATCCGAGCCTGGCTAACCGCAACACCCTTTCCAGTTGGTGGCCAGCCCGCCGCTGATATTGCAC
 GTAATAATTCGCATCAAACTGTTCTGCTGTAAGCCGACGGCATCCTGGGCTGACCATTGAGGATGCAAAGGGTGGTTCTCTG
 CCAGTGGTCCGCTGGTGGCAGATCGAAGTGTGTGTTGACGGCTTCGACCGTAAATATTCCCTGTGTGGTGGTGGGACTC
 CCGTACTATGATATCGCAGTTCGCTGGAAGAAGGCGGTGCGGGTGGTAGCCGCTGATTACGAAGTGGCTGCCGAGGGCC
 TGGAGCTGCGCCTGCGTGGTCTTCTAACCTGTTCCGCTGGACGAACAGGCGGCTTCTATGTTCTGATTGCGGGTGGCATT
 GGTATCACCCCGATCCTGGCAATGGCGGACCACCTGAAAGCCCTGGGTCGTCGACTACACCATCCACTACTGCGGTGCTTCTCG
 TCGTTCTATGGCATCCTGGACCGTCTGCAGGCAGACCATGGCGAGCGTCTGTCTGTGTCATGCTGGCGATGAGAACCCTCACG
 CCGAGCTGGCTGGTATTGTTGCCTCCCTGCCGGAAGGTGGCCAGATTTACGCATGTGGTCCGGAACGTATGATCAGCGAGCTG
 GAAGATCTGACCGCCGCTCTGCCACATGGCACCCCTGCATTTTCGAGCACTTCAGCGCTCAGGAACTGCCCTGGACCCGCTTAA
 AGAAAACGCATTCCAGGTAGAAGTAAAGATTCCGGTCTGACTCTGGAGGTGGCTGCGAACGTTACCCTGCTGGATGCACTGC
 TGGCTCTGGTATCGATATCTCTTGTGACTGCCGTGAAAGCCTGTGTGGCTCTTGGGAGGTAGAAGTCTGGAGGGCGAGATC
 GACCACCGCAGCTGGTACTGACTCGACCGAACGTGCGGAAAACCTGCGCATGATGTCTTGGTCTTCCGCTCTGTAAAAGG
 CGGTAAGCTGAAACTGGCACTGCTCGAGCACCACCACCACCAC**CTGA**

MERTANPADVPAGGKSSEKAGTPPAEAEQCPFSKMAADFDAFAGPYQADPAEALRWSRDQLPVFYSPLNGYWVVSRYDDIKA
 VFRDNI LFS PRNALEKITPATPEAMEVLKGYGYAMNR**AM**INEDEPVHMERRRALMGHFLPDNLEARQEMVRRLTREKIDAFID
 SGRVDLVEAMLVEVPLNVALHFLGVPEDDIAILK**K**FSVA**W**SV**S**TWKGPTDEQQVAIAHDVGFQFVNYAGKIEKMRKEPDGTGW
 MHETIRKNAEMPDIVPDSYVHSMMAIIVAHEHTTSLASAGMFKLLTHRQAWQDICEPDLIPNAVEECLRYSGS**V**VAWRRQ
 ATAATRIGGVDIPEGAKLLIVQASGNQDERHFEDGDKFDIYRDNAV DHLT**F**HGSHQCMGKNIARMEMRIFLEEMTRRLPHLQ
 LA**Q**EFYTLNNTSFRGPDHVWVEWDPEKNPERADPSLANGNHRFPVGGAPARRDIARKIRIKTVRREADGILGLTIEDAKGRSL
 PRWSAGAHIEVCVDGFDRKYSLCGRADSRDYDIAVLLLEGGRRGSRRIHEVAAEGLELRLRGPSNLFRLDEQARSYVLIAGGI
 GITPILAMADHLKALGRDYTIHYCGRSRRSMAFLDRLQADHGERLSVHAGDENRHAELAGIVASLPEGGQIYACGPERMISEL
 EDLTARLPHGTLHFEHFSAQETALDPSKENAFQVELKDSGLTLEVAANVTLLDALLASGIDISDCREGLCGSCEVEVELEGEI
 DHRDVVLRTERAENRRMMSCCSRSVKGGKLLALLEHHHHHH

P450_{LA1}-P7E hat im Vergleich zu P450_{LA1} die folgenden Aminosäuresubstitutionen: T121A, V123I,
 N201K, H206W, N209S, I326V, Y385H, E418G.

P450_{LA1}-S5-A275F

ATGGAGCGCACTGCAAATCCAGCGGACGTTCCGGCTGGTGGTAAATCTTCTGAAGGCAAGGCGGGTACTCCACCGCTGCTGA
 AGCTCAATGCCCTTTCAGCAAAATGGCAGCAGATTTTCGACGCTTTCGACGGCCATATCAGGCTGATCCGGCAGAAGCGCTGC
 GTTGGTCTCGTGACCAGCTGCCGGTTTTCTATTCCCCGAACCTGGGTTACTGGGTGGTTTTCTCGTTACGATGATATCAAAGCT
 GTTTTTCGTGACAACATCCTGTTTCAGCCCGCTAACGCTCTGGAAAAATCACTCCGGCAACCCCGGAAGCGATGGAGGTCCT
 GAAAGGTTATGGTTACGCAATGAACCAGGCCATGATTAACGAAGACGAACCAAGTTCACATGGAACGTCGTCGTCGACTGATGG
 GCCACTTCTGCCGGACAATCTGGAAGCTCGTCAGGAGATGGTACGCCGCTGACCCGCGAAAAAATCGATGCATTCATCGAT
 TCCGGTCCGCTGGATCTGGTGGAAAGCCATGCTGTATGAGGTTCCACTGAAAGTTGCCCTGCACCTTCTGGGCGTTCGGGAGGA
 TGACATTTGCCATTTGAAAAAGTTTTCTGTGCGCAGCGAGCGTCAGCGTGTGGGGTAAACCGACCGATGAGCAGCAGGTTGCGA
 TCGCACACGACGTTGGTCAGTTCTGGAACATATGCTGGTAAAATCATCGAAAAAATGCGCAAGGAACCGGACGGTACCGGTTGG
 ATGACAGAAACCATCCGTA AAAACGCAGAAATGCCGGATATTGTCCCGGATTCTTATGTTCACTCCATGATGATGTTTATCAT
 CGTTGCCGCACACGATAACCAGCCTGGCCTCTGCAGGATGTTTTAAAACCTGCTGACTCACCGTCAGGCTTGGCAGGATA
 TCTGCGAGGACCCGCTCTGATTCCGAACGCAGTTGAGGAGTGTCTGCGTTATAGCGGCTCCGTCGTTGGCATGGCGTCGTCAA
 GCTACGGCTGCCACCCGATCCGGTGGTGTGACATCCCGGAAGGTGCTAAACTGCTGATCGTTCAAGCATCTGGTAATCAGGA
 TGAGCGTCACTTCGAGGATGGTGACAAAATTTGACATCTACCGCGATAACCGGTTGGACCACCTGACCTTTGGCCACGGTTCTC
 ACCAGTGTATGGGCAAAAACATTGCCCGTATGGAGATGCGCATCTTCTGGAAGAAATGACTCGTCGCCCTGCCTCACCTGCAA
 CTGGCGGGACAGGAATCACTTACCTGTCCAACACCAGCTTTCGTGGTCCGGATCATGTGTGGGTGCAATGGGATCCGGAAAA
 AAACCTGAAAGTCCGATCCGAGCCTGGCTAACCGCAACACCCTTTCCAGTTGGTGGCCAGCCCGCCGCTGATATTGCAC
 GTAAAATTCGCATCAAAACTGTTCTGCTGTAAGCCGACGGCATCCTGGGCTGACCATTGAGGATGCAAAAGGGTGGTTCTCTG
 CCAGTTGGTCCGCTGGTGCACATCGAAGTGTGTGTTGACGGCTTCGACCGTAAATATTCCCTGTGTGGTGGTGGGACTC
 CCGTACTATGATATCGCAGTTCTGCTGGAAGAAGCGGGTCCGCGTGGTAGCCGTCGTATTACGAAGTGGCTGCCGAGGGCC
 TGGAGCTGCGCCTGCGTGGTCTTCTAACCTGTTCCGCTGGACGAACAGGCGCGTTCCTATGTTCTGATTGCGGGTGGCATT
 GGTATCACCCCGATCCTGGCAATGGCGGACCACCTGAAAGCCCTGGGTCGTGACTACACCATCCACTACTGCGGTCGTTCTCG
 TCGTTCTATGGCATTCCTGGACCGTCTGCAGGCAGACCATGGCGAGCGTCTGTCTGTGCATGCTGGCGATGAGAACCCTCACG
 CCGAGCTGGCTGGTATTGTTGCCTCCCTGCCGGAAGGTGGCCAGATTTACGCATGTGGTCCGGAACGTATGATCAGCGAGCTG
 GAAGATCTGACCGCCGCTCTGCCACATGGCACCCCTGCATTTTCGAGCACTTCAGCGCTCAGGAAACTGCCCTGGACCCGCTTAA
 AGAAAACGCATTCCAGGTAGAAGTGAAGATTCCGCTGACTCTGGAGGTGGCTGCGAACGTTACCCTGCTGGATGCACTGC
 TGGCTCTGGTATCGATATCTCTTGTGACTGCCGTGAAGCCTGTGTGGCTCTTTCGAGGTTAGAAGTCTGGAGGGCGAGATC
 GACCACCGCAGCTGTTACTGACTCGCACCGAACGTGCGGAAAACCTGCGCATGATGTCTTGTCTTCCGCTCTGTAAAAGG
 CGGTAAGCTGAAACTGGCACTGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

MERTANPADVPAGGKSSEGKAGTPPAEAEQCPFSKMAADFDAFAGPYQADPAEALRWSRDQLPVFYSPLNGYWVVSRYDDIKA
 VFRDNILFSPRNALEKITPATPEAMEVLKGYGYAMNQAMINEDEPVHMERRRALMGHFLPDNLEARQEMVRRRLTREKIDAFID
 SGRVDLVEAMLYEVPLNVALHFLGVPEDDIAILK KFSVAASV SVWGKPTDEQQVAIAHDVQGFWNYAGKIEKMRKEPDGTGW
 MHETIRKNAEMPDIVPDSYVHSM MF IIVA AHDTTSLASAGMFKLLTHRQAWQD ICEDPSLIPNAVEECLRYSGSVVAVRRQ
 ATAATRIGGVDIPEGAKLLIVQASGNQDERHFEDGDKFDIYRDNV DHLT FGHSHQCMGKNIARMEMRIFLEEMTRRLPHLQ
 LAQQEFTYLSNTSFRGPDHVWVEWDPEKNPERADPSLANGNHRFPV GAPARRDIARKIRIKTVRREADGILGLTIEDAKGRSL
 PRWSAGAHIEVCVDGFDRKYSLCGRADSRDYDIAVLL EEGRRGSSRIHEVAAEGLELRLRGPSNLFRLDEQARSYVLIAGGI
 GITPILAMADHLKALGRDYTIHYCGRSRRSMAFLDRLQADHGERLSVHAGDENRHAELAGIVASLPEGGQIYACGPERMISEL
 EDLTARLPHGTLHFEHFSAQETALDPSKENAFQVELKDSGLTLEVAANVTLLDALLASGIDISDCDREGLCGSCVEVEVEGEI
 DHRDVVLRTERAENRRMSSCSRSVKGGKLLALLEHHHHHH

P450_{LA1}-S5-A275F hat im Vergleich zu P450_{LA1} die folgenden Aminosäuresubstitutionen: R120Q, T121A, V123I, N201K, H206A, N209S, T210V, A275F (induziert allylische Oxidation), E282D, I326V, Y385H, E418G.

aMOx

ATGGAGCGCACTGCAAATCCAGCGGACGTTCCGGCTGGTGGTAAATCTTCTGAAGGCAAGGCGGGTACTCCACCGCTGCTGA
 AGCTCAATGCCCTTTCAGCAAAATGGCAGCAGATTTTCGACGCTTTCGACGGCCATATCAGGCTGATCCGGCAGAAGCGCTGC
 GTTGGTCTCGTGACCAGCTGCCGGTTTTCTATTCCCGAACCTGGGTTACTGGGTGGTTTCTCGTTACGATGATATCAAAGCT
 GTTTTTCGTGACAACATCCTGTTGACCCCGGTAACGCTCTGGAAAAATCACTCCGCTGACCCCGGAAGCGATGGAGGTCCT
 GAAAGGTTATGGTTACGCACTGAACCATGCCATGATTAACGAAGACGAACCACTTACATGGAACGTCGTCGTCGACTGATGG
 GCCACTTCTGCCGGACAATCTGGAAGCTCGTCAGGAGATGGTACGCCGCTGACCCGCGAAAAATCGATGCATTTCATCGAT
 TCCGGTCCGCTGGATCTGGTGGAAAGCCATGCTGTATGAGGTTCCACTGAAAGCTTGCCTGCACTTCTGGGCGTTCGGGAGGA
 TGACATTGCCATTTGAAAAAGTTTTCTGTGCGCACACAGCGTCAGCACCTGGGGTAAACCGACCGATGAGCAGCAGGTTGCGA
 TCGCACACGACGTTGGTCAGTTCGGAACATATGCTGGTAAAATCATCGAAAAATGCGCAAGGAACCGGACGGTACCGGTTGG
 ATGACAGAAACCATCCGTAACCAACGAGAAATGCCGGATATTGTCCCGGATTCTTATGTTCACTCCATGATGATGGCGATCAT
 CGTTGCCGACACGAGACCAGCCTGGCCTCTGCAGGATGTTTTAAAACCTGCTGACTCACCGTCAGGCTTGGCAGGATA
 TCTGCGAGGACCCGCTCTGATTCCGAACGAGTTGAGGAGTGTCTGCGTTATAGCGGCTCCGTTATGGCATGGCGTCGTCAA
 GCTACGGCTGCCACCCGATCGGTGGTGTGACATCCCGGAAGGTGCTAAACTGCTGATCGTTCAAGCATCTGGTAATCAGGA
 TGAGCGTCACTTCGAGGATGGTGACAAATTTGACATCTACCGGATAACCGGTTGGACCACCTGACCTTTGGCGTGGGTTCTC
 ACCAGTGTCTGGGCAAAACATTGCCCGTATGGAGATGCGCATCTTCTGGAAGAAATGACTCGTCGCTGCCTCACCTGCAA
 CTGGCGGGACAGGAATCACTTACCTGTCCAACACCAGCTTTCGTGGTCCGGATCATGTGTGGGTGCAATGGGATCCGGAAAA
 AAACCTGAAAGTCCGATCCGAGCCTGGCTAACGGCAACACCCTTTCCAGTTGGTGGCCAGCCCGCCGCTGATATTGCAC
 GAAAAATTCGCATCAAACTGTTCTGCTGTAAGCCGACGGCATCCTGGGCTGACCATTGAGGATGCAAGGGTGGTTCTCTG
 CCACGTTGGTCCGCTGGTGCACATCGAAGTGTGTGTTGACGGCTTCGACCGTAAATATTCCCTGTGTGGTGGTGGGACTC
 CCGTACTATGATATCGCAGTTCGCTGGAAGAAGGCGGTCGCGGTGGTAGCCGTCGTATTACGAAGTGGCTGCCGAGGGCC
 TGGAGCTGCGCCTGCGTGGTCTTCTAACCTGTTCCGCTGGACGAACAGGCGGTTCCATGTTCTGATTGCGGGTGGCATT
 GGTATCACCCCGATCCTGGCAATGGCGGACCACCTGAAAGCCCTGGGTCGTGACTACACCATCCACTACTGCGGTGCTTCTCG
 TCGTTCTATGGCATCCTGGACCGTCTGCAGGCAGACCATGGCGAGCGTCTGTCTGTGCATGCTGGCGATGAGAACCCTCACG
 CCGAGCTGGCTGGTATTGTTGCCTCCCTGCCGGAAGGTGGCCAGATTTACGCATGTGTTCCGGAACGTATGATCAGCGAGCTG
 GAAGATCTGACCGCCGCTCTGCCACATGGCACCCCTGCATTTTCGAGCACTTCAGCGCTCAGGAACTGCCCTGGACCCGCTTAA
 AGAAAACGCATTCCAGGTAGAAGTAAAGATTCCGCTGACTCTGGAGGTGGCTGCGAACGTTACCCTGCTGGATGCACTGC
 TGGCTCTGGTATCGATATCTCTTGTGACTGCCGTGAAAGCCTGTGTGGCTCTTGGCAGGTAGAAGTCTGGAGGGCGAGATC
 GACCACCGCAGCTGTTACTGACTCGCACCGAACGTGGGAAAACCTGCGCATGATGTCTTGGCTGTTCCCGCTCTGTAAAAGG
 CGGTAAGCTGAAACTGGCACTGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

MERTANPADVPAGGKSSEKAGTPPAEAEQCPFSKMAADFDAFAGPYQADPAEALRWSRDQLPVFYS PNLGYWVVSRYDDIKA
 VFRDNI LFS PRNALEKITP L TPEAMEVLKGYGYA L NHAM I NEDEPVHMERRRALMGHFLPDNLEARQEMVRRLTREKIDAFID
 SGRVDLVEAMLYEVPLNVALHFLGVPEDDIA I L K F SVAHSV S TWGKPTDEQQVAIAHDVGQFWNYAGK I IEKMRKEPDGTGW
 MHETIRKNAEMPDIVPDSYVHSMMAI I VAAHETTS LASAGMFKLLTHRQAWQD ICEDPSLI PNAVEECLRYSGS V MAWRRQ
 ATAATRIGGVDIPEGAKLLIVQASGNQDERHFEDGDKFDIYRDNVNDHLTFV V GSHQCL GKN I ARMEMRIFLEEMTRRLPHLQ
 LA G QEF TYLSNTSFRGPDHVWVEWDPEKNPERADPSLANGNHRFPV G APARRDIARKIRIKTVRREADGILGLTIEDAKGRSL
 PRWSAGAHIEVCVDGFDKYS L CGRADSRDYDIAV L LEEGGRRGSSRIHEVAAEGLELRLRGPSNLFRLDEQARSYVLIAGGI
 GITPILAMADHLKALGRDYTIHYCGRSRRSMAFLDRLQADHGERLSVHAGDENRHAELAGIVASLPEGGQIYACGPERMISEL
 EDLTARLPHGTLHFEHFSAQETALDPSKENAFQVELKDSGLTLEVAANVTLLDALLASGIDISDCREGLCGSCEVEVELEGEI
 DHRDVVLRTERAENRRMSSCSRSVKGGKLLALLEHHHHHH

aMOx hat im Vergleich zu P450_{LA1} die folgenden Aminosäuresubstitutionen: A103L, M118L,
 R120H, T121A, V123I, N201K, N209S, I326V, V327M, Y385V, M391L, E418G.

Gen- und Aminosäuresequenz der Phenylacetaldehyd-Reduktase (PAR) aus *Rhodococcus* sp., ST-10, kloniert in einen pET22b(+)-Vektor mit einem C-terminalen Poly-His₆-Tag.³²¹

PAR

ATGAAGGCCATCCAGTACACTCGCATTTGGCGCTGAGCCTGAACTGACTGAGATCCCAAAGCCGAGCCCGGGCCCGGAGAAGT
 CCTTCTTGAAGTGACAGCAGCCGAGTTTGTCACTCTGATGATTTTATATGAGCTTGCAGAGAAGACAGTATACCTACGGGT
 TACCTTGCATTAGGACACGAAGGAGCAGGGAAGGTCGACGCCGTGGGTGAGGGCTTGAGGGATTAGATATCGGCACGAAC
 GTCGTAGTGTACGGCCGTGGGGCTGTGAAATTGCTGGCACTGTTCTCAGGGTCTTGAGAAGTATTGTAGTCGCGCACAGGA
 GTTAGGAATTAACCTCCAGGATTGGGAGCTCCAGGGGCATTGGCCGAGTTTATGATCGTAGATAGTCCCCGCCATTTAGTGC
 CTATTGGAGACTTAGACCCAGTTAAACTGTTCCATTGACCGACGCGGGTCTTACACCTTATCACGCTATTAACGTTAGCTTA
 CCCAAGCTTCGTGGCGGATCGTATGCGGTGGTTATTGGCACGGGCGCCCTTGCCATGTGCCATCCAATTATTACGTCACCT
 GTCGGCGGCCACTGTCATTGCCTTGGACGTTAGTGGGATAAACTTGAATTAGCTACGAAAGTCGGGGCCATGAGGTTGTGT
 TAAGCGATAAAGATGCTGCCGAAAATGTACGTAAGATCACAGGATCACAGGGAGCTGCACTTGTCTTAGATTTCTGTCGGATAT
 CAGCCACAATCGATACCGCGATGGCCGTGGCCGGTGTGCGGTAGCGATGTCACCATTGTGGGCATTGGGGACGGACAAGCCCA
 CGCAAAGTCGGATTCTTTCAAAGCCCTACGAAGTCTGTGAACCGTTCCTTACTGGGGTGCACGCAACGAATTAATCGAAC
 TGATCGATTTAGCCACGCGGGATCTTCGACATTTCCGTTAGAACTTTCTCTTTGGATAACGGTGCAGAGGCGTACCGTCCG
 TTGGCGGGGTACGCTGAGTGGCCGTGCCGTGGTGGTCCGGTTTGTCTCGAGCACCATCACCACCATCAC TGA

MKAIQYTRIGAEPELTEIPKPEPGPEVLLLEVTAAGVCHSDDFIMSLPEEQYTYGLPLTLGHEGAGKVAAVGEGVEGLDIGTN
 VVYGPWGCNCWHCSQLENYCSRAQELGINPPGLGAPGALAEFMIVDSPRHLVPIGDLDPVKTVPLTDAGLTPYHAIKRSL
 PKLRGGSYAVVIGTGGLGHVAIQLLRHLSAATVIALDVSADKLELATKVGAEVVLSDKDAENVRKITGSQGAALVLDVFGY
 QPTIDTAMAVAGVGSVTVIVGIGDQAHAKVGFQSPYEASVTVPYWGARNELIELIDLAHAGIFDISVETFSLDNGAEAYRR
 LAAGTLSGRAVVVPLLEHHHHHH

Gen- und Aminosäuresequenz einer gentechnisch erzeugten NAD(H)-abhängigen, (R)-selektiven, anti-Prelog Ketoreduktase aus *Lactobacillus brevis* (LBv-ADH-G37D), kloniert in einen pET22b(+)-Vektor.³²²

LBv-ADH

ATGAGCTTGGTCGAGAAAACCAGTATTATCAAGGACTTACTCTTTTTGAAAAGATGTCAGAGCAGCAGCAAGTCGTGTTCTG
 TAACGACCCGGCAACTGGCCTGCGCGGATTATCGCAATTCACGATACCACCTTAGGTCGGCCCTCGGTGGGTGCCGGATGC
 AGCCGTACAATAGCCTTGAAGAAGCCCTCGAAGATGCCCTCCGGCTGTCGAAGGGCATGACCTACTCCTGTGCGGCTTCTGAT
 GTTGATTTTGGTGGGGTAAGGCTGTCATTATCGCGGATCCGCAAAAAGACAAAAGCCAGAGTTATTTGCGCGCTTTGGCCA
 GTTTGTGATTCGCTTGGCGCCGTTTACACGGGACTGACATGGGCACAAACATGGAGGATTTTATTCACGCAATGAAGG
 AGACCAATTGCATCGTTGGTGTTCCTGAAGCATATGGTGGCGGTGGGATTCTCGATCCCTACCGCTATGGGCGTATTGTAT
 GGCATCAAAGCAACAAATAAAATGCTTTTGGGAAAGATGATTTAGGCGCGTTACGTACGCCATCCAAGGCTTAGGCAAGGT
 CGGCTATAAAGTAGCTGAAGTCTGCTTGAAGAAGGTGCACACCTTTTCGTGACAGACATCAACGAGCAAACATTAGAAGCTA
 TTCAAGAGAAAGCTAAGACAACATCCGTTTACGTTACAGTAGTTGCCTCGGACGAGATTTATTCTCAGGAAGCAGATGTGTT
 GTCCGTGCGCCTTCGGTGGGGTGTGAACGACGAGACAATGAAACAGTTTAAAGTAAAGGCCATTGCAGGGTCTGCGAATCT
 TCAGCTCTTAAGTGAAGCATTGGTTCGCCACCTTGGCGACAAGGGCATTTTGTACGCCCCAGATTACATGTGAATTCGGGTG
 GCTTAATTCAAGTTGCGGATGAGTTATATGAAGTTAATAAGGAGCGCGTTTTAGCCAAAACGAAACACATCTACGACGCGATT
 TTAGAGGTTTATCAGCAGGCCGAACCTGACCAAATTACTACAATGGAGGCCCAATCGTATGTGTGAGCAACGGATGGCCG
 TCGGGGTGCGCGTAACTCGTTTTTACCTCAAGCGTAAAACAAAATGGGACATTCG TAA

MSLVEKTSIIKDFTLFEKMSEHEQVVFCDNPATGLRAIIAHDITLGPALGGCRMQPYNSVEEALEDALRLSKGMTYSCAASD
 VDFGGGKAVIIGDPQKDKSPELFRAGQFVDSLGGFRYTGTDGMNEMEDIHAMKETNCIVGVPEAYGGGGDSSIPTAMGVLY
 GIKATNKMLFGKDDLGGVYTAIQGLKVGKYKVAEGLLEEGAHLFVTDINEQTLEAIQEKAKTTSVSVTVASDEIYSQEADV
 VPCAFGGVNDKMQFKVKAISANLQLLTEDHGRHLADKGIYAPDYIVNSGLIQVADELYEVNKRVLAKTKHIYDAI
 LEVYQQAELDQITTMEANRMCEQRMAARGRRNSFFTSVVKPKWDIRN

Gen- und Aminosäuresequenz einer Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* 168 (A7CC 23857) mit den thermostabilisierenden Mutationen E170K und Q252L, kloniert in einen pACYCDuet-1 Vektor.³²³

GDH

ATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCGTCGCTATTACAGGAGCTGCTTCAGGGCTCGGAAAGGCGATGGCCATTCGCTTCGG
CAAGGAGCAGGCAAAAGTGGTTATCAACTATTATAGTAATAAACAAGATCCGAACGAGGTAAAAGAAGAGGTCATCAAGGCGG
GCGGTGAAGCTGTTGTCGTCCAAGGAGATGTCACGAAAGAGGAAGATGTAAAAAATATCGTGCAAACGGCAATTAAGGAGTTC
GGCACACTCGATATTATGATTAATAATGCCGGTCTTGAAAATCCTGTGCCATCTCACGAAATGCCGCTCAAGGATTGGGATAA
AGTCATCGGCACGAACTTAACGGGTGCCTTTTTAGGAAGCCGTGAAGCGATTAAATATTTCTAGAAAACGATATCAAGGGAA
ATGTCATTAACATGTCAGTGTGCACGAAGTGATTCCTTGCCGTTATTTGTCCACTATGCGGCAAGTAAAGGCGGGATAAAG
CTGATGACAAAGACATTAGCGTTGGAATACGCGCCGAAGGGCATTGCGGTCAATAATATTTGGGCCAGGTGCGATCAACACGCC
AATCAATGCTGAAAAATTCGCTGACCCATAACAGAAAGCTGATGTAGAAAGCATGATTCCAATGGGATATATCGGCCGAACCGG
AGGAGATCGCCGAGTAGCAGCCTGGCTTGCTTCGAAGGAAGCCAGTACGTACAGGCATCACGTTATTCGCGGACGGCGGT
ATGACACTCTATCCTTCATTCCAGGCAGGCCGCGGT

MYPDLKGVVAITGAASGLGKAMAIREFKEQAKVVINYYSNKQDPNEVKKEVIKAGGEAVVVQGDVTKEEDVKNIVQTAIKEF
GTLDIMINNAGLENPVPSHEMPLKDWKVIIGNLTGAFGLSREAIKYFVENDIKGNVINMSSVHEVI PWPLFVHYAASKGGIK
LMTKTLALEYAPKIRVNNIGPGAINTPINAIEKFAADPKQKADVESMIPMGYIGEPEEIAAVAAWLASKEASYVTGITLFADGG
MTLYPSFQAGRG

Aminosäuresequenz einer Iminreduktase aus *Cystobacter ferrugineus* (Uniprot ID: A0A1L9AVJ5_9DELTA), kloniert in einen pET-28b (+) Vektor.^{168,263}

pIR-23 (CfIRED)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMKPGISVLGTGRMGSAALVGAFLKQGYNVAVVNRRTKSKCAPLAALGARVATTVRDAVADAEEVVV
VNVNDYVTSEALLRQDDVTKGLRGKLIIVQLTSGSPRQAREMAAWARQHELQYLDGAIMGTPNFIFEGPGGTILYSGPGALFEKY
KPVLLVLGGNSLHVGSVDVGHASALDSALLSFLWGSFMFVLQAVSVCEAEGLPLGAYMEYVQATKPMVDGAVTDFVKRIQTGRF
AGDEKTLATVEAHHGALRHLIELCEEHGIHHAHPAAFGQLFQAALQAGHAQDDFAVLNKFMK

7.6. Plasmidkarten

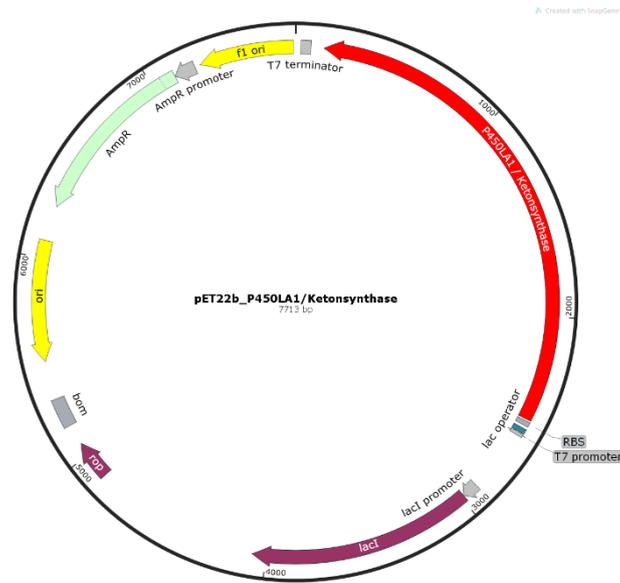


Abbildung 60 – Mit der Software SnapGene visualisierte Plasmidkarte für das Gen von P450_{LA1} bzw. der Ketonsynthase innerhalb eines pET-22b(+) Vektorsystems.

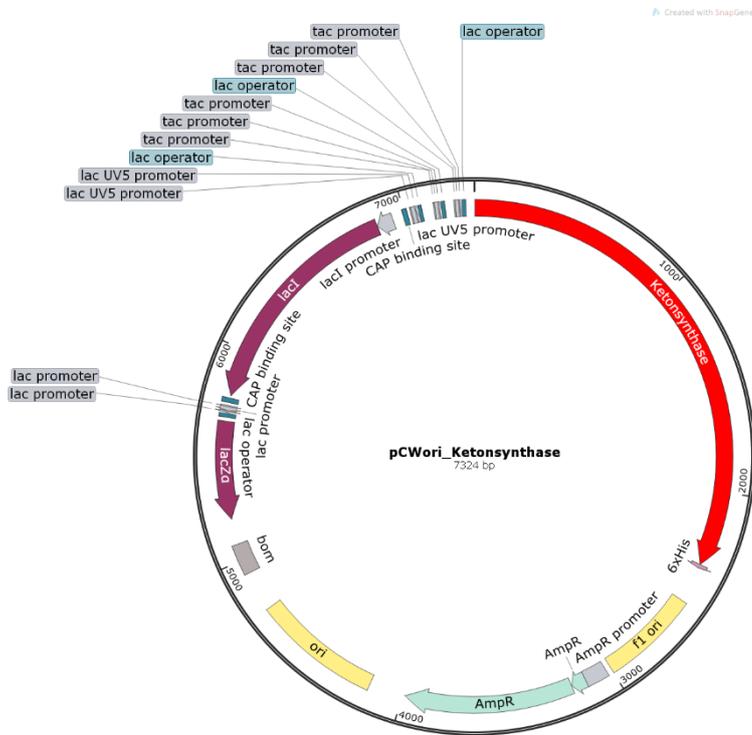


Abbildung 61 – Mit der Software SnapGene visualisierte Plasmidkarte für das Gen der Ketonsynthase innerhalb eines pCWori Vektorsystems.

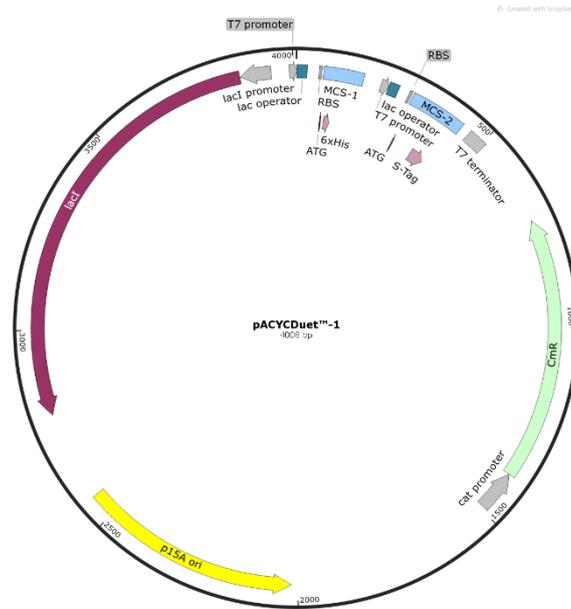


Abbildung 62 – Mit der Software SnapGene visualisierte Plasmidkarte des pACYC Vektorsystems. Das Gen der Ketonsynthese wurde in die MCS-1 kloniert (siehe Kapitel 5.2.7.).

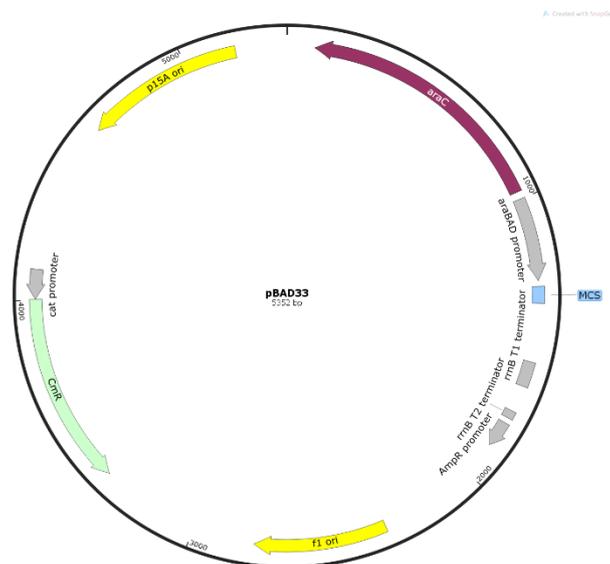


Abbildung 63 – Mit der Software SnapGene visualisierte Plasmidkarte des pBAD33 Vektorsystems. Das Gen der Ketonsynthese wurde in die MCS kloniert (siehe Kapitel 5.2.7.).

7.7. SDS-PAGE Analyse eingesetzter Lysate

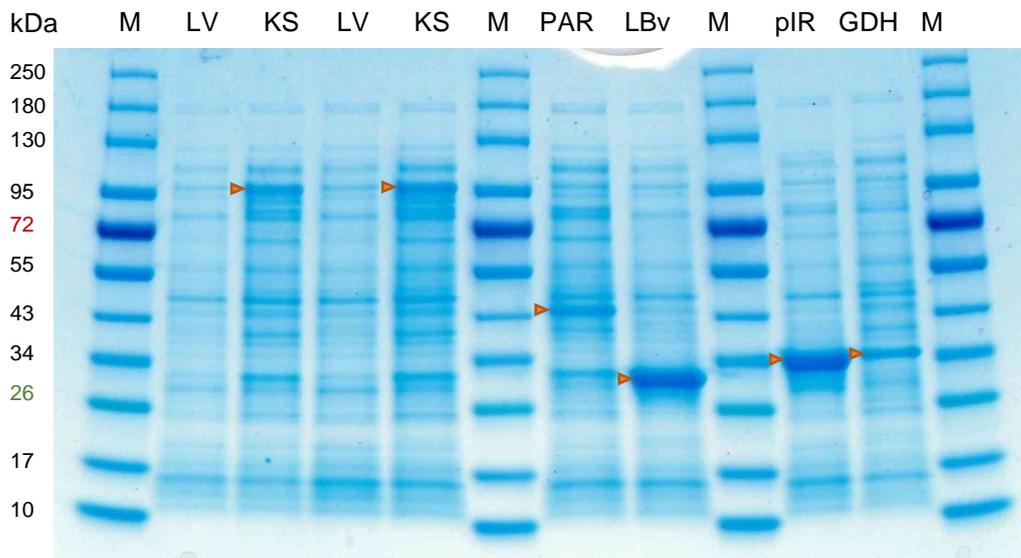


Abbildung 64 – SDS-PAGE Analyse der eingesetzten Lysate zeigt eine Überexpression der gewünschten Enzyme.

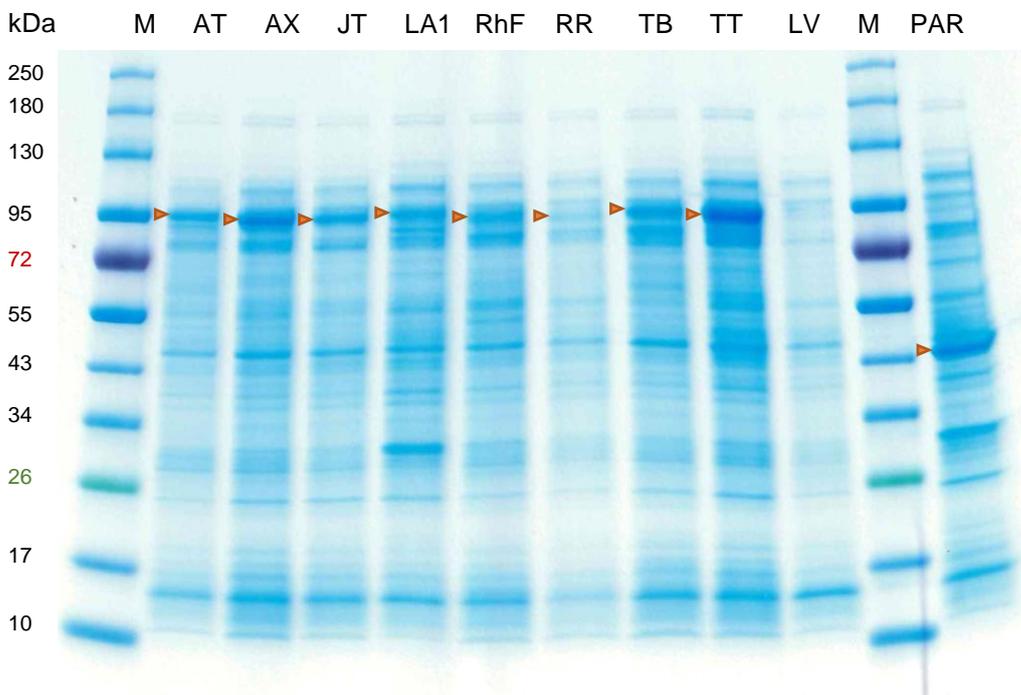


Abbildung 65 – SDS-PAGE Analyse der eingesetzten Lysate des CYP116-Panels.

