

**Untersuchungen zur Enantioselektivität
Thiamindiphosphat abhängiger Enzyme:
Reaktionstechnische Optimierung der C-C Bindungsbildung**

**Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation**

**von
Marco Berheide**

**aus
Münster**

2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2005 bis August 2009 am Institut für Technische Biokatalyse der Technischen Universität Hamburg-Harburg angefertigt.

1. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. A. Liese
2. Gutachter:	Prof. Dr.-Ing. R. Eggers
Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. rer. nat. A.-P. Zeng
Datum der mündlichen Prüfung:	12.08.2010

Für Eva

Veröffentlichungen

Biotechnology and Bioengineering

M. Berheide, S. Peper, S. Kara, W. S. Long, S. Schenkel, M. Pohl, B. Niemeyer, A. Liese;

Influence of the Hydrostatic Pressure and pH on the Asymmetric 2-Hydroxyketone Formation Catalyzed by Pseudomonas putida Benzoylformate Decarboxylase and Variants thereof;

(2010), 106, (1), 18-26.

Biochemistry

M. Bruning, M. Berheide, D. Meyer, R. Golbik, H. Bartunik, A. Liese, K. Tittmann;
Structural and Kinetic Studies on Native Intermediates and an Intermediate Analogue in Benzoylformate Decarboxylase Reveal a Least Motion Mechanism with an Unprecedented Short-Lived Predecarboxylation Intermediate;

(2009), 48, (15), 3258–3268.

Journal of Bioprocess and Biosystems Engineering

L. Hilterhaus, B. Minow, J. Müller, M. Berheide, H. Quitmann, M. Katzer, O. Thum, G. Antranikian, A. P. Zeng, A. Liese;

Application of Sepabeads in Different Reactor Setups on Preparative Scale;

(2008), 31, (3), 163-171.

Vorträge

Vortrags- und Diskussionstagung: "Biokatalyse: Neue Verfahren, neue Produkte"

S. Kara, M. Berheide, W.S. Long, S. Peper, B. Niemeyer, A. Liese

Synthese chiraler 2-Hydroxyketone unter Anwendung hoher Drücke

18.05-20.05.2009, Bad Schandau

European Bioperspectives 2008

M. Berheide, S. Peper, B. Niemeyer, M. Pohl, A. Liese

Increase of enantioselectivity in asymmetric C-C bond formations by change of pressure and pH

07.10-09.10.2008, Hannover

7th International Conference on Mechanisms and Physiology of Thiamine, Chemical Biology of Thiamine

M. Berheide, S. Peper, B. Niemeyer, M. Pohl, A. Liese

Factors that influence the enantioselective C-C bond formation of benzoylformate decarboxylase from P. putida

29.05-01.06.2008, Leucon/Wittenberg

Mini-Symposium on Technical Biocatalysis

M. Berheide, A. Liese

Enantioselective biotransformations: The Benzoylformate Decarboxylase as model system

18.06.2007, Hamburg

4. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie

M. Berheide, M. Bruning, H. Bartunik, A. Liese

Wie unterscheiden Enzyme zwischen links und rechts?

03.05.2007, Hamburg

Poster

Vortrags- und Diskussionstagung: "Biokatalyse: Neue Verfahren, neue Produkte"

S. Peper, W.S. Long, S. Kara, M. Berheide, A. Liese, B. Niemeyer

Enantioselektive Carboligierung der Benzoylformate Decarboxylase unter Anwendung hoher Drücke

18.05-20.05.2009, Bad Schandau

European Bioperspectives 2008

S. Kara, M. Berheide, D. Gocke, M. Pohl, A. Liese

Kinetic Modeling of Carboligations Catalyzed by Benzoylformate Decarboxylase

Variants from *Pseudomonas putida*

07.10-09.10.2008, Hannover

4th International Congress on Biocatalysis, Biocat 2008

M. Berheide, S. Kara, S. Peper, W.S. Long, S. Schenkel, B. Niemeyer, M. Pohl, A. Liese.

Investigation of Pressure Effects for the Production of Chiral 2-Hydroxyketones Catalyzed by Benzoylformate Decarboxylase

31.08-04.09.2008, Hamburg

4th International Congress on Biocatalysis, Biocat 2008

S. Kara, M. Berheide, D. Gocke, M. Pohl, A. Liese

Development of a Kinetic Model for the Carboligierung of Isophthalaldehyde with Acetaldehyde Catalyzed by Benzoylformate Decarboxylase Variants from

Pseudomonas putida

31.08-04.09.2008, Hamburg

7th International Conference on Mechanisms and Physiology of Thiamine, Chemical Biology of Thiamine

S. Kara, M. Berheide, D. Gocke, M. Pohl, A. Liese

Reaction Engineering of Novel Benzoylformate Decarboxylase Mutants BFDL461A and BFDL461V from *Pseudomonas putida*

29.05-01.06.2008, Leucon/Wittenberg

3rd International Congress on Biocatalysis, Biocat 2006

M. Berheide, M. Bruning, M. Pohl, H. Bartunik, A. Liese

Structural Investigations of Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida*

03.09.-07.09.2006, Hamburg

From μL to m^3 -Strategies in Bioprocess Development, Dechema

M. Berheide, T. Sonke, A. Liese

Biocatalytical Investigations of the Phenylpyruvate Decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*

28. - 29.03.2006, Hamburg

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Andreas Liese für die interessante Themenstellung und die stetige Diskussionsfreudigkeit, sowie besonders für die Möglichkeit zur weitgehend freien Gestaltung der Arbeit.

Prof. Dr. Rudolf Eggers vom Institut für Thermische Verfahrenstechnik, TUHH, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Bernd Niemeyer und Dr. Stephanie Peper vom Institut für Verfahrenstechnik, insbesondere Stofftrennung, von der Helmut Schmidt Universität Hamburg für die fruchtbare Kooperation im Bereich Hochdruck und die netten Stunden an der HSU.

Prof. Dr. Kai Tittmann aus der Abteilung Bioanalytik von der Georg-August-Universität Göttingen und Danilo Meyer für die kompetente Unterstützung bei den CD-Messungen und für die ausgesprochen nette Gastfreundschaft bei meinem Besuch in Halle/Saale.

Dr. Hans Bartunik von der Max-Planck-Gesellschaft, Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie am DESY Hamburg und ganz besonders seinem Mitarbeiterpionier Dr. Marc Bruning für die Durchführung der Kristallisationsexperimente.

Patrick Prühs und Lutz Hilterhaus für die kritische Durchsicht der Arbeit, sowie vielen Gesprächen und Ratschlägen in meist geselliger Runde.

Selin Kara, Jacob Müller, Markus Neumann, Paul Bubenheim und Daniela Lange, die durch ihr Mitwirken zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Kameraden aus dem Forsthaus am Spitzberg und Promotionskollegen Nils Kurlmann und Hendrich Quitmann für unschlagbare Stunden und Fachdiskussionen in und besonders auch vor der WG am Aztekenofen.

Katja, Simon, Clive-Steven, Anna, Boris, Gerd, Uta, Maren, Rudi, Noi, Ruslan, Ana Gabriela, Sebastian sowie allen anderen Mitgliedern des Instituts für Technische Biokatalyse für das tolle Arbeitsklima und die schöne Zeit am Institut.

Ulrike Zimmermann für die vielen erfüllten Literaturwünsche und die angenehme Atmosphäre im Institut.

Meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und die stetig offene Tür zu Hause.

André, Mathias, Dirk, Alfons und vielen weiteren Freunden für einen Teil meiner wochenendlichen Freizeitgestaltung in Albersloh.

Meiner Freundin Eva für den restlichen Teil meiner Freizeitgestaltung, das Zusammenstehen in den letzten Jahren und die vielen schönen Momente in dieser Zeit.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Chiralität.....	1
1.2	Enzyme.....	2
1.3	Cofaktoren.....	3
1.4	Physiologie chiraler Verbindungen.....	4
1.5	Anwendung von Enzymen in der industriellen Biokatalyse..	6
1.6	Der Cofaktor Thiamindiphosphat (ThDP).....	6
1.7	Reaktionsmechanismus der C-C Bindungsbildung ThDP abhängiger Enzyme.....	7
1.8	Industrielle Anwendung chiraler 2-Hydroxyketone.....	8
1.9	Synthese chiraler 2-Hydroxyketone.....	9
2.	Motivation und Zielsetzung.....	11
3.	ThDP abhängige Enzyme und Bereitstellung der BFD.....	13
3.1	ThDP abhängige Enzyme mit Red/Ox Potential.....	13
3.2	ThDP abhängige Enzyme mit C-C Bindungsbildungspotential.....	13
3.2.1	Dihydroxyacetonsynthase.....	13
3.2.2	1-Deoxyxylulose-5-phosphat Synthase.....	13
3.2.3	Transketolase.....	14
3.2.4	Benzaldehydlyase.....	14
3.2.5	Pyruvatdecarboxylase.....	15
3.2.6	Benzoylformiatdecarboxylase.....	16
3.3	Bereitstellung der Enzyme.....	17
3.3.1	Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> SG13009 und Stammerhaltung.....	17
3.3.2	Fermentation von <i>E. coli</i> SG13009.....	18
3.3.3	Reinigung der wtBFD.....	19
3.3.4	Reinigung der BFD Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I.....	20
3.3.5	Reinigung der Variante BFD A460I-F464I für die Enzymkristallisation.....	21
3.4	Kurzzusammenfassung.....	22

4.	Charakterisierung der BFD Varianten.....	25
4.1	Stabilitätsuntersuchungen.....	25
4.2	Reaktivität der Benzoylformiatdecarboxylase.....	26
4.3	BFD katalysierte 2-HPP Bildung.....	27
4.4	Einfluss der Substratkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss.....	32
4.5	Einfluss des pH-Wertes auf den Enantiomerenüberschuss....	34
4.6	Einfluss der Temperatur auf Aktivität und Stereoselektivität	38
4.7	Kurzzusammenfassung.....	43
5.	Einfluss des hydrostatischen Drucks.....	45
5.1	Einfluss hoher Drücke auf Proteine.....	45
5.2	Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf die Benzoylformiatdecarboxylase.....	46
5.3	Kurzzusammenfassung.....	54
6.	Reversibilität des Reaktionssystems.....	55
6.1	C-C Bindungsbildung ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd.....	55
6.2	Carboligation mit BFD-Varianten.....	55
6.2.1	Carboligation der wtBFD.....	55
6.2.2	Carboligation der BFD F464I.....	58
6.2.3	Carboligation der BFD A460I.....	59
6.2.4	Carboligation der BFD A460I-F464I.....	60
6.3	Umsetzung von Benzoin mit BFD Varianten.....	64
6.3.1	Vergleich von Phosphat- und TEA-Puffer.....	64
6.3.2	Kinetische Racematspaltung von Benzoin.....	66
6.4	Racemisierung von 2-HPP.....	74
6.4.1	2-HPP abhängige 2-HPP Racemisierung.....	74
6.4.2	Acetaldehyd abhängige 2-HPP Racemisierung.....	78
6.5	Gleichgewichtszustand von 2-HPP, Benzoin, Benzaldehyd und Acetaldehyd.....	85
6.6	Kurzzusammenfassung.....	94
7.	Enzyminhibierung.....	95
7.1	Reversible und irreversible Enzyminhibierung.....	95
7.2	Gezielte Inhibierung von Enzymen.....	98

7.3	Inhibierung ThDP abhängiger Enzyme.....	99
7.4	Inhibierung der BFD durch Methylbenzoylphosphonat-Derivate.....	101
7.5	Kurzzusammenfassung.....	113
8.	Kristallisation.....	115
8.1	Kristallisation der wtBFD.....	115
8.2	Kristallisation der BFD A460I-F464I.....	119
8.3	Kurzzusammenfassung.....	123
9.	Synthesen.....	125
9.1	Darstellung von (S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon	125
9.2	Darstellung von (R)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon	125
9.3	Darstellung von (R)-Benzoin.....	127
9.4	Darstellung von 3-Chlor-, 4-Chlor- und 4-Methoxybenzoylphosphonatmethylester.....	127
10.	Diskussion und Ausblick.....	131
10.1	Beeinflussung der Enantioselektivität der BFD katalysierten 2-HPP Bildung.....	131
10.2	Ausblick.....	138
11.	Zusammenfassung.....	141
Anhang		
A	Material und Methoden.....	143
A.1	Material.....	143
A.2	Methoden.....	145
A.2.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> SG13009 Zellen.....	145
A.2.2	Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> SG13009 und Stammerhaltung.....	145
A.2.3	Fermentation von <i>E. coli</i> SG13009.....	146
A.2.4	Enzymreinigung.....	148
A.2.5	Reinigung der Variante BFD A460I-F464I für die Enzymkristallisation.....	150

A.2.6	Analytik.....	151
A.2.7	Allgemeine Vorgehensweise für enzymatische Umsetzungen.....	153
A.2.8	Charakterisierung der auf Phosphonatester basierenden Enzyminhibitoren.....	157
A.2.9	Enzymkristallisationen.....	159
A.3	Synthesen.....	159
A.3.1	Darstellung von (<i>S</i>)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon...	159
A.3.2	Darstellung von (<i>R</i>)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon...	160
A.3.3	Darstellung von (<i>R</i>)-Benzoin.....	160
A.3.4	Darstellung von 3-Chlorbenzoylphosphonat methylester (3-Chloro-MBP).....	161
A.3.5	Darstellung von 4-Chlorbenzoylphosphonat methylester (4-Chloro-MBP).....	161
A.3.6	Darstellung von 4-Methoxybenzoylphosphonat methylester (4-Methoxy-MBP).....	162
B	Symbolverzeichnis.....	163
C	Abkürzungsverzeichnis.....	164
D	Abbildungsverzeichnis.....	166
E	Tabellenverzeichnis.....	176
F	MATLAB-Skripte zur Simulation der Konzentrationsverläufe.	180
G	Literaturverzeichnis.....	187

1. Einleitung

1.1 Chiralität

Oftmals verhalten sich in der Natur Dinge wie Bild und Spiegelbild. Diesen Effekt findet man z.B. bei Händen oder gegenläufig gewundenen Hörnern zahlreicher Huftiere und man bezeichnet ihn nach dem griechischen Wort für Händigkeit als Chiralität. Ein weiteres Phänomen, das in der Natur häufig vorkommt, ist der Effekt, dass fast ausschließlich eines dieser Spiegelbilder existiert. Beispielsweise findet man sehr häufig rechtsdrehende Weinbergschneckenhäuser, wohingegen linksdrehende extrem selten sind (Brunner 1999). Dieses Phänomen beobachtete bereits 1768 der Philosoph Immanuel Kant und verfasste in seinem Aufsatz „Von dem ersten Grunde des Unterschiedes der Gegenden im Raum“ die Formulierung:

*„Aller Hopfen windet sich von der Linken gegen die Rechte um seine Stange;
die Bohnen aber nehmen eine entgegen gesetzte Wendung.“*
-Immanuel Kant-

Dieses Phänomen existiert allerdings nicht nur auf makroskopischer, sondern auch auf makromolekularer und molekularer Ebene. In Analogie zu den Rankpflanzen liegen DNA-Stränge in rechtsgängigen α -helikalen Strukturen vor, wie auch α -Helices in Proteinen rechtsgängig sind. Aminosäuren bilden dabei die Bausteine der Proteine und sind aus biologischer Sicht die kleinsten chiralen Grundeinheiten. Die 20 Aminosäuren, die im genetischen Code verankert sind, bezeichnet man als proteinogene oder kanonische Aminosäuren und nach der Fischer-Projektion haben sie ausschließlich L-Konfiguration.

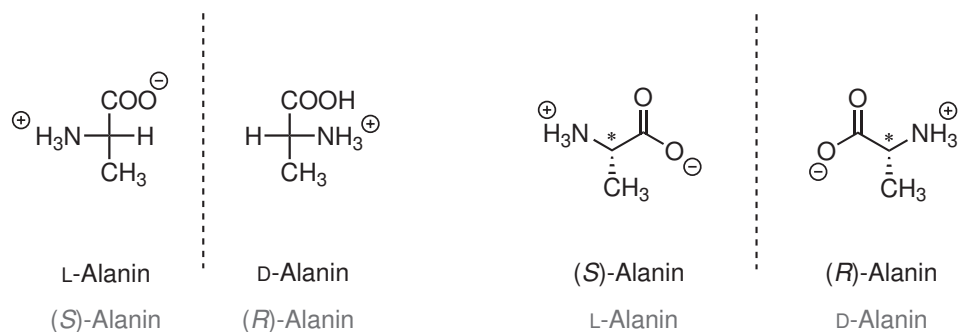


Abbildung 1.1: Darstellung der beiden Enantiomere von Alanin in der Fischer-Projektion (links) und der herkömmlichen chemischen Schreibweise mit Nomenklatur nach den CIP-Regeln (rechts). Zusätzlich ist jeweils die andere Nomenklatur angegeben (grau).

Basis für solch eine Konfigurationsgebung bilden Stereozentren, die aus chemischer Sicht die kleinsten Bausteine mit chiraler Information sind. Solch ein Stereozentrum besitzt ein Zentralatom, vorwiegend Kohlenstoff, welches vier unterschiedliche Liganden hat. Neben der

Fischer-Projektion und Namensgebung gibt es die Cahn-Ingold-Prelog Nomenklatur (CIP-Nomenklatur), die auf der Unterscheidung der Substituenten (bezogen auf ihre Ordnungszahl) am Stereozentrum basiert.

1.2 Enzyme

Die gesamte genetische Information der Lebewesen ist in ihren Genen in Form einer Sequenz aus den vier unterschiedlichen Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin gespeichert. Durch regulatorische Mechanismen können diese Informationen mittels Transkription in mRNA überführt werden. Durch die anschließende Translation wird diese Basensequenz in eine Aminosäuresequenz umgewandelt und die benötigten Zielproteine synthetisiert. Da alle Proteine aus chiralen Aminosäuren (eine Ausnahme bildet Glycin) aufgebaut sind, bilden sie ihrerseits ebenfalls eine chirale Struktur.

Als Primärstruktur bezeichnet man dabei die Reihenfolge der Aminosäuren und als Sekundärstruktur ihre Anordnung zu z.B. α -Helices oder β -Faltblättern. Die relative Anordnung dieser Sekundärstrukturen zueinander bildet die Tertiärstruktur eines Proteins aus. Einige Proteine setzen sich aus mehreren dieser Tertiärstrukturen zusammen und besitzen somit eine Quartärstruktur.

Die Funktion von Proteinen im Organismus ist sehr vielfältig, so gibt es z.B. Proteine zur Strukturbildung und Strukturhaltung wie Collagene, aber auch Transportproteine wie das Präalbumin für den Transport von Schilddrüsenhormonen (Koolman, Röhm 1997).

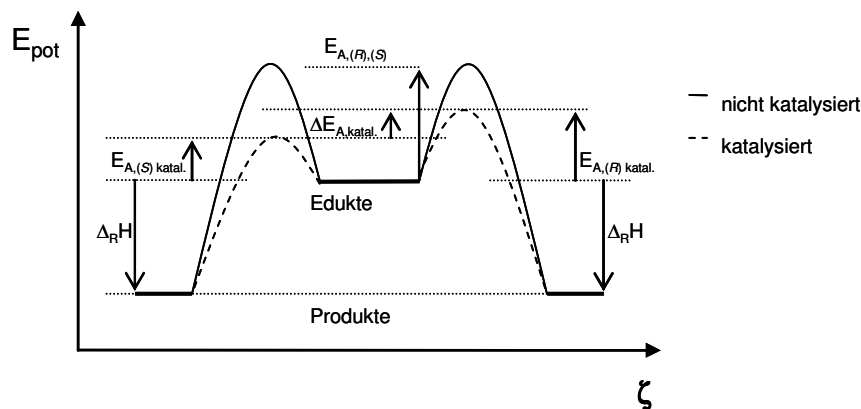


Abbildung 1.2: Energiediagramm einer nicht katalysierten (racemischen) und katalysierten (katal.) asymmetrischen Reaktion. Aufgetragen sind die Energieniveaus der Produkte und Edukte sowie die benötigten Aktivierungsenergien (E_A) und frei werdenden Reaktionsenthalpien (ΔH_R) in Abhängigkeit der Reaktionskoordinate ξ .

Enzyme bilden im Allgemeinen eine Klasse von Proteinen, die Reaktionen katalysieren und unverändert aus der Reaktion wieder hervorgehen. Typischerweise katalysieren sie dabei Reaktionen um den Faktor 10^5 - 10^{17} (Lehninger et al. 2005). Das besondere an Enzymen ist

ihre eigene chirale Struktur und ihre Fähigkeit, bei Reaktionen stark stereoselektiv zu sein, also oftmals lediglich ein Enantiomer zu bilden. Die Ursache darin liegt in der unterschiedlichen Herabsetzung der beiden Aktivierungsenergien $E_{A,(S) \text{ katal.}}$ und $E_{A,(R) \text{ katal.}}$ ($\rightarrow \Delta E_{A,\text{katal.}}$), die aufgebracht werden müssen, um die jeweiligen Übergangszustände beider Enantiomere zu durchlaufen (siehe Abbildung 1.2). Bei einer racemischen Reaktion sind hingegen beide Aktivierungsenergien gleich ($E_{A,(R), (S)}$). Triebkraft einer Reaktion ist im Allgemeinen der Zugewinn an Energie in Form der Reaktionsenthalpie ΔH_R , die bei der Bildung beider Enantiomere gleich ist. Auf Grund der unterschiedlichen Reaktionen, die durch Enzyme katalysiert werden, unterteilt man diesbezüglich in sechs Klassen.

Tabelle 1.1: Einteilung der Enzymklassen.

Enzymklasse	Name	Reaktionstyp	Beispiel
1	Oxido-reduktasen	Reduktions-/Oxidations-Reaktionen	Peroxidase
2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen	Amino-transferase
3	Hydrolasen	hydrolytische Spaltungen	Esterase/Lipase
4	Lyasen	Spaltung/Bildung von Bindungen; insbesondere C-C, C-O, C-N	Fumarase
5	Isomerasen	Isomerisierungen	Glucose-isomerase
6	Ligasen	Spaltung/Bildung von Bindungen unter Energieverbrauch; insbesondere C-C, C-O, C-N	DNA-Ligase

1.3 Cofaktoren

Viele enzymkatalysierte Reaktionen beinhalten Reaktionsschritte, die nicht alleine durch die polypeptidische Struktur katalysiert werden können. Dies sind z.B. die Übertragung von Elektronen in Reduktions-/Oxidations-Reaktionen oder die Übertragung funktioneller Gruppen. Diese Aufgaben werden von Cofaktoren übernommen, die fest an das Enzym gebunden sein können, sogenannte prosthetische Gruppen, oder nicht kovalent gebunden als Coenzyme vorliegen. So vielfältig wie die Art der katalysierten Reaktionen sind auch die Cofaktoren. Die einfachsten Cofaktoren sind dabei Metallionen wie Cu^{2+} (Cytochrom-c-Oxidase), Fe^{3+} (Hämoglobin), Zn^{2+} (Zinkfingerprotein) oder Mg^{2+} (Chlorophyll; Decarboxylasen), die vorwiegend komplexierende Eigenschaften übernehmen. Bei Red/Ox-Reaktionen sind unterschiedliche Coenzyme beteiligt wie vor allem die Adenindinucleotide des Nikotinamids $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ und Flavins FAD. Als prosthetische Gruppen für Red/Ox-Reaktionen dienen verschiedene Eisen/Schwefel-Cluster, die vor allem in der Atmungskette benötigt werden (Koolman, Röhm 1997). Bei der Übertragung funktioneller Gruppen ist beispielsweise das Coenzym A bei der Acylgruppenübertragung, Pyridoxalphosphat bei

Aminogruppen sowie Thiamindiphosphat (ThDP, siehe Abbildung 1.3) bei Hydroxyalkylresten beteiligt.

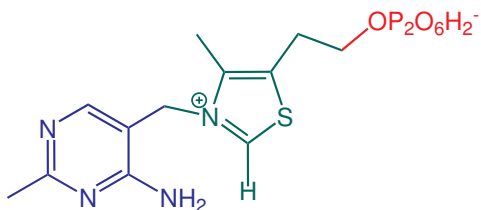


Abbildung 1.3: Struktur des Cofaktors Thiamindiphosphat; bestehend aus einer Pyrimidin- (blau) und Thiazoleinheit (grün) sowie einem Diphosphatrest (rot).

Eine Vielzahl der Coenzyme, die der Mensch benötigt, ist essentiell und muss daher über die Nahrung aufgenommen werden. Zumeist sind dies Vorstufen der Coenzyme, die zu den Vitaminen gehören. Die Gruppe der B-Vitamine umfasst dabei die wasserlöslichen Vitamine (siehe Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Vitamine der Vitamin B Gruppe und ihr natürliches Vorkommen.

Vitamin	Verbindung	Vorkommen
B1	Thiamin	Hefe, Schweinefleisch, Sojabohnen
B2	Riboflavin	Milch, Eier
B3 / P	Nicotinsäure (Niacin)	Fleisch, Hefeprodukte, Obst, Gemüse
B5	Pantothersäure	Eier, Nüsse, Obst, Gemüse, Milch, Innereien
B6	Pyridoxin	Fleisch, Gemüse, Vollkornprodukte
B7 / H	Biotin	Hefeprodukte, Hülsenfrüchte, Nüsse
B9 /	Folsäure	frisches/grünes Gemüse, Leber
B11 / M		
B12	Cobalamin	Fleisch, Leber, Milch, Eier

Eine Unterversorgung mit den verschiedenen Vitaminen führt oftmals zu Mangelerscheinungen mit teilweise stark ausgeprägten Krankheitsbildern. Beispiele finden sich hierfür bei Skorbut und Beri-Beri, die durch ungenügende Versorgung mit Vitamin C bzw. Vitamin B1 hervorgerufen werden.

1.4 Physiologie chiraler Verbindungen

Chirale Verbindungen verfügen, wie bereits beschrieben, über ein Stereozentrum und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild zueinander, weshalb sie auch als asymmetrisch bezeichnet werden. Die chemischen sowie physikalischen Eigenschaften von Enantiomeren wie Schmelzpunkt, Siedepunkt und Löslichkeit sind dabei identisch. Einen Unterschied gibt

es hingegen bei der Brechung von linear polarisiertem Licht, weshalb man Verbindungen mit Stereozentren auch als optisch aktiv bezeichnet.

Da eine Vielzahl der in der Natur vorkommenden Verbindungen und Moleküle ein bzw. mehrere Stereozentren besitzen, bestehen lebende Organismen selbst aus einer Vielzahl von chiralen Verbindungen. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass diese Verbindungen unterschiedliche physiologische Wirkungen auf die Organismen haben können. Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden L-Aminosäuren können die enantiokomplementären (und äußerst selten vorkommenden) D-Aminosäuren in der Regel nur teilweise bzw. gar nicht metabolisiert werden.

Eine weitere beispielhafte Stoffgruppe chiraler und natürlicher vorkommender Verbindungen bilden die Steroide, zu denen viele Hormone wie die Östrogene, Corticoide oder Testosteron zählen. Besonders wichtig ist die Unterscheidung bei Pharmazeutika, da hier von Enantiomeren auch unterschiedliche physiologische Wirkungen ausgehen können. Ein bekanntes Beispiel ist der beim Heroinentzug eingesetzte Wirkstoff Methadon, welcher ein vollständig synthetisches Opioid ist. Methadon ist ein Racemat der beiden Enantiomere Levomethadon ((*R*)-Enantiomer) und Dextromethadon ((*S*)-Enantiomer), wobei sowohl das Racemat (Methaddict[®]) wie auch das reine (*R*)-Enantiomer (L-Polamidon[®]) vertrieben werden (siehe Abbildung 1.4). Das (*R*)-Enantiomer zeigt dabei eine 50-fach stärker schmerzstillende Wirkung, wohingegen das (*S*)-Enantiomer ein wirkungsvolles Antitussivum (=Hustenreizstiller) ist (Nguyen et al. 2006), (Bausewein et al. 2005). Noch bedeutender wird die Unterscheidung bei Enantiomeren, von denen auch negative bzw. unerwünschte Wirkungen ausgehen können. Viele Geruchsstoffe zeichnen sich ebenfalls durch ihre Chiralität und diversifizierte Physiologie aus, so duftet das (*S*)-Carvon nach Kümmel im Gegensatz zum (*R*)-Carvon, welches in krauser Minze enthalten ist und einen typischen Spearmintgeruch besitzt (Friedman, Miller 1971), (Russell, Hills 1971).

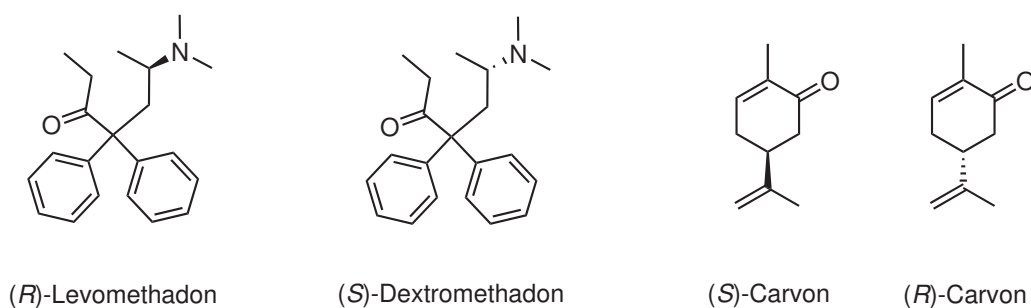


Abbildung 1.4: Strukturen der Enantiomere des Methadons und Carvons. Jeweils beide Enantiomere besitzen unterschiedliche physiologische Wirkungen.

Durch diese oftmals unterschiedliche Physiologie von Verbindungen ist daher die Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen besonders wichtig, da hierdurch eine spätere Trennung der beiden Enantiomere vermieden werden kann und bei der Synthese wesentlich weniger Substrate benötigt werden.

1.5 Anwendung von Enzymen in der industriellen Biokatalyse

Enzyme haben in Bezug auf ihre katalytische Aktivität meist sehr spezielle Eigenschaften, was je nach Anforderung sowohl Vor- als auch Nachteil sein kann. Typisch ist ihre hohe Spezifität gegenüber Substraten und die Selektivität gegenüber den gebildeten Produkten. Dies ermöglicht zwar in der Regel die Produktion von hochselektiven Produkten, jedoch werden viele dem Originalsubstrat analoge Verbindungen nur schlecht bzw. gar nicht umgesetzt. Ihre hohe Spezifität ermöglicht im Vergleich zur chemischen Synthese oftmals Reaktionsschritte, die unter physiologischen Bedingungen ablaufen, auf herkömmlichem Weg jedoch sehr kompliziert bzw. teilweise gar nicht zu realisieren sind. Alternativ bleibt dann oftmals nur die Isolierung von Verbindungen aus Naturstoffen.

Aufgrund ihres natürlichen Ursprungs katalysieren Enzyme Reaktionen in der Regel unter physiologischen Bedingungen, also in wässrigen Medien bei moderaten Temperaturen und Normaldruck. Nachteilig ist hier jedoch oft die begrenzte Löslichkeit der benötigten Substrate und Produkte, was sich im Vergleich zur chemisch katalysierten Synthese in geringeren Raum-Zeit-Ausbeuten auswirkt sowie eine Abtrennung der Produkte aus dem wässrigen Reaktionsmedium bedingt.

Eingesetzt werden Biokatalysatoren in unterschiedlichsten Industriezweigen, wie etwa der Lebensmittel-, Pharma- oder Textilindustrie. Genannt seien hier jedoch nur einige Beispiele. Fructose wird als Süßungsmittel im Fructose-Glucose-Sirup (High Fructose Corn Syrup; HFCS) eingesetzt und aus Mais in einem dreistufigen Prozess durch die Enzyme α -Amylase, Glucoamylase und Glucoseisomerase hergestellt. Die Weltjahresproduktion liegt hier bei über einigen Millionen Jahrestonnen (Liese et al. 2006), (USDA 2007). Ebenfalls biokatalytisch werden Acrylamid für die Polymersynthese sowie verschiedene Aminosäuren großtechnisch hergestellt (Breuer et al. 2004). Bei der Produktion der chiralen Verbindung (*R*)-Phenylacetylcarbinol als Intermediat für das Asthmatikum Ephedrin, wird Molasse als Substrat sowie Hefe (Pyruvatdecarboxylase; siehe Kapitel 3.2.5) als Katalysator eingesetzt (Liese et al. 2006). Spezielle Anwendungsmöglichkeiten der Biokatalyse finden sich besonders bei der Produktion von Zwischenstufen für Pharmazeutika, wie beispielsweise bei der Synthese von antiviralen Medikamenten (Atazanavir, Indinavir) oder Cholesterinsenkern (Statine) (Patel 2004), (Panke, Wubbolts 2005).

1.6 Der Cofaktor Thiamindiphosphat (ThDP)

Wie zuvor erwähnt, gehört das essentielle Vitamin B1, oder auch Thiamin, zur Gruppe der wasserlöslichen B-Vitamine. Im Organismus selbst gibt es keine Verwendung für Thiamin, weswegen es nach der Aufnahme modifiziert werden muss. Nach Phosphorylierung durch die Thiaminpyrophosphokinase mit Adenosintriphosphat wird Thiamindiphosphat (ThDP) als aktiver Cofaktor gebildet (Zhao et al. 2001). Die Bindung des ThDP an die Enzyme erfolgt über Komplexbildung mit einem zweiwertigen Metallion wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} . Als weitere Liganden für das Metallion dienen Aminosäurereste der Proteinstruktur.

Die katalytische Besonderheit der ThDP abhängigen Reaktionen ist dabei die sogenannte Umpolung von Carbonylverbindungen, bei denen die ursprünglich elektrophilen Carbonylkohlenstoffe selbst zu Nukleophilen werden. Hierdurch wird beispielsweise die Übertragung einer solch nukleophilen Carbonylgruppe auf eine weitere Carbonylgruppe ermöglicht, wodurch eine neue C-C Bindung hergestellt wird. Bei den ThDP abhängigen Decarboxylasen wird nach der Abspaltung von Kohlenstoffdioxid der 2-Ketosäuren (z.B. Pyruvat oder Benzoylformiat) ein Proton auf die nukleophile Carbonylgruppe übertragen und der korrespondierende Aldehyd (z.B. Acetaldehyd oder Benzaldehyd) freigesetzt.

1.7 Reaktionsmechanismus der C-C Bindungsbildung ThDP abhängiger Enzyme

Durch ThDP abhängige Enzyme werden eine weite Reihe von synthetisch interessanten Reaktionen katalysiert, was vor allem durch die asymmetrische Bildung einer neuen C-C Bindung begründet ist (Schörken, Sprenger 1998), (Sprenger, Pohl 1999), (Iding et al. 1998), (Pohl et al. 2002), (Pohl, Liese 2007), (Müller et al. 2009), (Gocke et al. 2009).

Als Substrate werden Carbonylverbindungen akzeptiert, deren zentrales Kohlenstoffatom dann im Laufe des Reaktionszyklus vom Elektrophil zum Nukleophil umgepolt wird. Bei der C-C Bindungsknüpfung unterscheidet man die beiden Carbonylverbindungen in Donor- und Akzeptorsubstrat, da sie aus chemischer Sicht unterschiedlich geladene Carbonylkohlenstoffe besitzen. Da das zuerst gebundene Carbonyl durch die Umpolung negativ geladen wird und die neue Bindung von diesem Kohlenstoff ausgeht, wird dieses Carbonyl als Donorsubstrat bezeichnet. Analog wird das zweite Carbonyl als Akzeptorsubstrat bezeichnet.

Das in dieser Arbeit verwendete ThDP abhängige Enzym ist die Benzoylformiat-decarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida* sowie die drei durch Mutagenese veränderten Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Bei diesen sind die Aminosäuren Phenylalanin (F) bzw. Alanin (A) durch Isoleucin (I) an den Positionen 460 und 464 ersetzt worden.

Im Katalysezyklus wird als erster Schritt der C2-Kohlenstoff am Thiazolring deprotoniert (1), wobei das resultierende Ylid (2) als Zwitterion gebildet wird (Abbildung 1.5) (Breslow 1958), (Jordan et al. 1999). Als Base dafür fungiert die Amino- bzw. Iminogruppe des Pyrimidinrings (R_1) des ThDP selbst (Nemeria et al. 2007). Das elektrophile Donorcarbonyl (3) wird durch das Ylid angegriffen, wodurch das tetraedrische Intermediat eines Hydroxyalkyl- bzw. -aryl-ThDP (4) gebildet wird. Durch Deprotonierung dieses Übergangszustands wird das Enamin/Carbanion (5, 6) gebildet, welches sich durch den nun nukleophilen Charakter der vormals elektrophilen Carbonylgruppe auszeichnet. Durch den Angriff auf ein weiteres Carbonyl (7) wird ein weiterer tetraedrischer Übergangszustand (8) gebildet, aus dem das Endprodukt in Form eines chiralen 2-Hydroxyketons (9) gebildet wird. Der Cofaktor liegt danach wieder in seiner freien Form als ThDP vor.

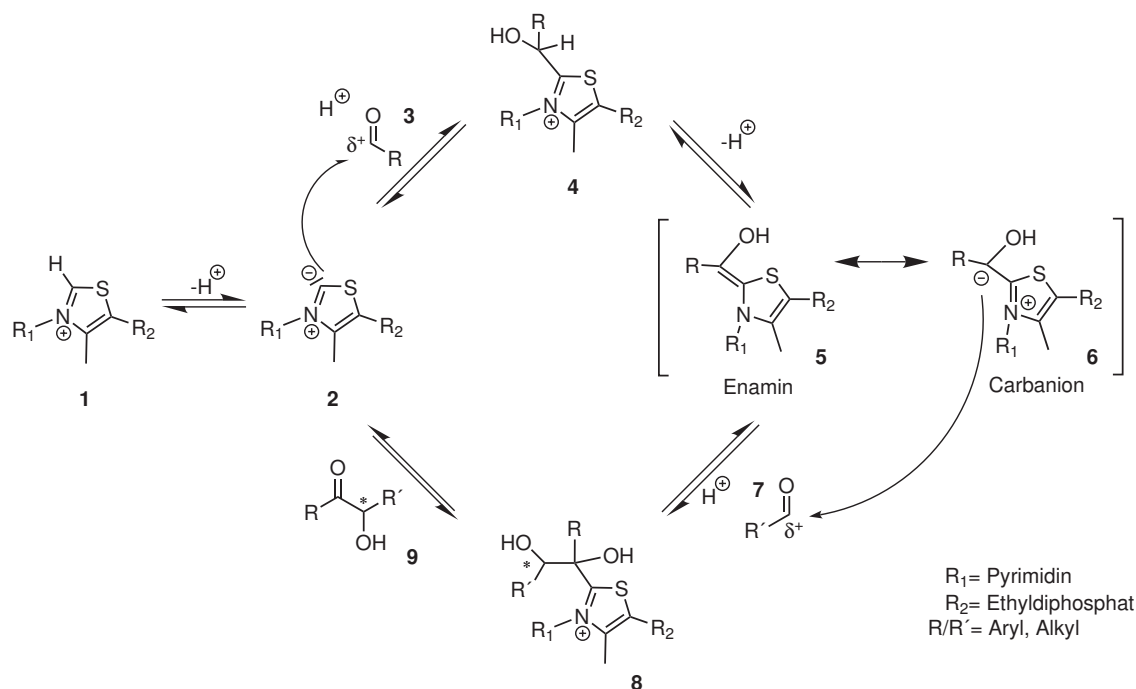


Abbildung 1.5: Reaktionszyklus der asymmetrischen 2-Hydroxyketonbildung durch ThDP abhängige Enzyme.

1.8 Industrielle Anwendung chiraler 2-Hydroxyketone

2-Hydroxyketone stellen aus chemischer Sicht eine interessante Stoffklasse dar, da sie mit ihrer Hydroxy- und Ketogruppe über zwei funktionelle Gruppen sowie einem Stereozentrum verfügen. Für direkte Modifikationen bietet sich z.B. die selektive Reduzierung der Ketogruppe zu chiralen Diolen oder eine Transaminierung zu chiralen Aminoalkoholen an (Kihumbu et al. 2002).

Großes Potential bieten chirale 2-Hydroxyketone bei der Synthese verschiedener pharmazeutischer Produkte wie in Abbildung 1.6 gezeigt. Bupropion und 1555U88 werden als Antidepressiva eingesetzt sowie (-)-Cytoxazon als Antiallergikum (Fang et al. 2000), (Kakeya et al. 1999). Zur Inhibierung der *multi drug pump* wird 5-Methoxyhydnocarbin eingesetzt, um Antibiotikaresistenzen (MDR; *multi drug resistance*) in mikrobiellen Zellen zu minimieren (Stermitz et al. 2000). Zur Behandlung von Malaria kann Nitidanin eingesetzt werden sowie die Verbindung Sch42427 / Sm8688 als Fungizid (Kuboki et al. 2007), (Gala et al. 1996).

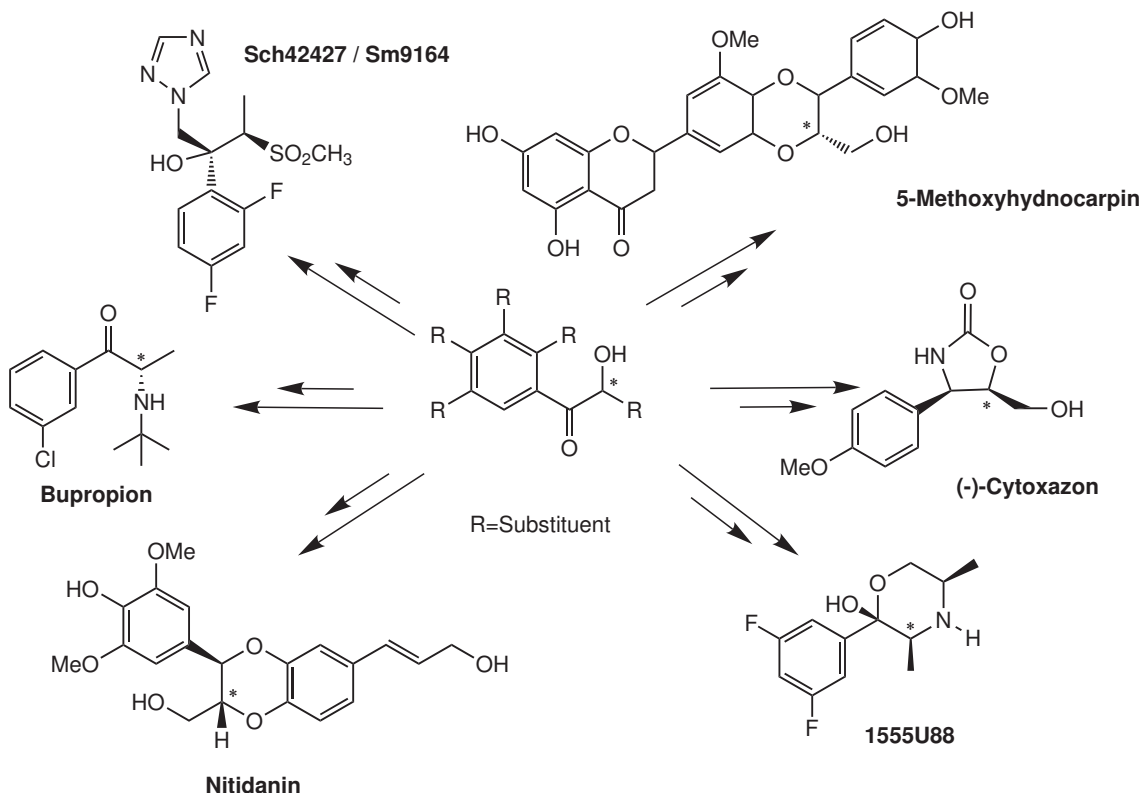


Abbildung 1.6: Mögliche Anwendung von chiralen 2-Hydroxyketonen als Intermediate für die Produktion pharmazeutischer Produkte.

1.9 Synthese chiraler 2-Hydroxyketone

Die bekannteste Methode der chemischen Synthese zur Herstellung aromatischer 2-Hydroxyketone stellt die klassische Benzoinkondensation dar, bei der durch Cyanidionen katalysiert, zwei Benzaldehydmoleküle miteinander zum Produkt rac-Benzoin reagieren (Beyer, Walter 1991). Eine Weiterentwicklung dieser Methode, bei der racemische Benzoin synthetisiert werden, stellt der Einsatz von chiralen Thiazolium- und Triazoliumsalzen als Katalysatoren dar (Breslow 1958), (Enders et al. 1996), (Knight, Leeper 1998), (Kiasat et al. 2009). Okada et al. zeigten darüber hinaus die Bildung von 2-Hydroxyketonen durch die Reaktion von Triphenylphosphoniumverbindungen an Aldehyde in einer irregulären Wittig Reaktion (Okada et al. 2009).

Neben den Kondensationsreaktionen sind chirale 2-Hydroxyketone auch durch Reduktion bzw. Oxidation entsprechender Vorstufen zugänglich. Die Reduktion von 1,2-Diketonen mit einem chiralen Ruthenium-Katalysator liefert 2-Hydroxyketone sowie 1,2-Diole mit hoher optischer Reinheit. Die Reduktionsäquivalente werden dabei durch eine Transferhydrierung mit Formiat und einem tertiären Amin zur Verfügung gestellt (Koike et al. 2000). Ebenfalls ist die Reduktion durch modifizierte Platinkatalysatoren möglich (Toukoniitty et al. 2001).

Durch selektive Oxidation von 1,2-Diolen sind ebenfalls 2-Hydroxyketone zugänglich, wobei auch hier unterschiedliche Möglichkeiten bestehen. Curci et al. zeigen eine Möglichkeit der

Oxidation von *O*-Isopropylidenderivaten diverser Diole mittels Dioxiranen (Curci et al. 1996). Die Oxidation von Enolethern ist ebenfalls möglich, wobei hier elektrophile Oxidationsmittel wie Osmiumtetroxid sowie chirale Agenzien verwendet werden (Hashiyama et al. 1992). Die selektive Oxidation von cis-1,2-Diolen zu stereoselektiven 2-Hydroxyketonen kann mittels der Glyceroldehydrogenasen aus *Enterobacter aerogenes* und *Cellulomonas sp.* durchgeführt werden (Lee, Whitesides 1986). Möglich ist jedoch auch die selektive Reduktion von racemischen 2-Hydroxyketonen in Form einer kinetischen Racematspaltung (Lee, Whitesides 1986) bzw. die stereoselektive Veresterung von racemischen 2-Hydroxyketonen (Adam et al. 1996).

Eine durch Mikrowellentechnik zugängliche Synthese von 2-Hydroxyketonen stellt die Substitution von Halogenen in 2-Haloketonen durch Wasser dar (Utsukihara et al. 2006).

Einen weiteren und einfachen Zugang zu chiralen 2-Hydroxyketonen stellen die Thiamindiphosphat abhängigen Enzyme dar, die in Kapitel 3 näher beschrieben werden.

2. Motivation und Zielsetzung

Die Bildung chiraler 2-Hydroxyketone ist aus organisch chemischer sowie pharmazeutischer Sicht von großem Interesse, da diese Stoffklasse ein hohes Potential als Intermediate zur Herstellung von Spezialchemikalien und Pharmazeutika besitzt. Enzymkatalysierte Reaktionen haben oft den Vorteil, dass sie mit hoher Stereoselektivität ablaufen und somit auf eine anschließende Trennung von Enantiomeren weitgehend verzichtet werden kann. Jedoch gibt es besonders beim Einsatz von nicht natürlichen Substraten oftmals auch eine Verringerung der Stereoselektivität, wodurch die Ausbeute des gewünschten Enantiomers erniedrigt wird und das unerwünschte Enantiomer abgetrennt werden muss. Die Kontrolle bzw. die Beeinflussung der Enantioselektivität von enzymatischen Reaktionen ist daher ein wichtiger Aspekt bei der Synthese chiraler Verbindungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Enzyme wtBFD sowie die Varianten BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I bezüglich ihrer Stereoselektivität und deren Beeinflussung näher charakterisiert werden. Im Besonderen soll dazu der Einfluss der Parameter

- Temperatur
- pH-Wert
- Substratkonzentration sowie der
- hydrostatische Druck

auf das Reaktionssystem untersucht werden. Die Carboligaseaktivität der BFD gilt bislang als irreversibel und steht damit im Kontrast zum homologen Enzym Benzaldehydlyase (BAL). Eine eventuelle Reversibilität der Carboligaseaktivität soll in Form einer Lyaseaktivität der Carboligationsprodukte 2-HPP und Benzoin nachgewiesen werden sowie eine damit verbundene Beeinflussung der Produktstereoselektivität.

Darüber hinaus soll die Bindung von Substraten bzw. von substratanalogen Inhibitoren untersucht werden. Dazu sollen zusätzlich zum Inhibitor Methylbenzoylphosphonat (MBP) die substituierten Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP synthetisiert und bezüglich ihres Inhibierungsverhaltens untersucht werden. In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe Proteindynamik von Dr. Hans Bartunik der Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie am DESY/Hamburg sollen die Inhibitoren mit der wtBFD sowie der Variante BFD A460I-F464I als Enzym-Inhibitor-Komplex kristallisiert und analysiert werden, um Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten von Substraten ziehen zu können.

3. ThDP abhängige Enzyme und Bereitstellung der BFD

3.1 ThDP abhängige Enzyme mit Red/Ox Potential

Die Gruppe der Thiamindiphosphat (ThDP) abhängigen Enzyme umfasst Enzyme aus unterschiedlichen Enzymklassen, wobei alle den Cofaktor ThDP für ihre katalytische Aktivität benötigen.

Die Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) sowie die Oxoglutaratdehydrogenase (EC 1.2.4.2) sind Bestandteile von Multienzymkomplexen, die die oxidative Decarboxylierung der α -Ketosäuren Pyruvat bzw. Oxoketoglutarat katalysieren. Nach der Decarboxylierung der α -Ketosäuren werden die Substratreste dabei auf das Coenzym A als Acetyl-CoA bzw. Succinyl-CoA übertragen, wodurch sie dem weiteren Stoffwechsel zur Verfügung stehen.

Neben diesen beiden Enzymen zur oxidativen Decarboxylierung gibt es aus synthetischer Sicht interessantere ThDP abhängige Enzyme, die die Bildung neuer C-C Bindungen katalysieren können. Einige sollen im Weiteren vorgestellt werden.

3.2 ThDP abhängige Enzyme mit C-C Bindungsbildungspotential

3.2.1 Dihydroxyaceton synthase

Die Dihydroxyaceton synthase (DHAS) oder auch Formaldehydtransketolase (EC 2.2.1.3) ist ein wichtiges Enzym in methylotrophen Hefen, da sie die Bindung von Formaldehyd an Xylulose-5-phosphat katalysiert. Formaldehyd stellt den ersten Metaboliten der Methanoloxidation dar, was die DHAS zum zentralen Enzym der Substratbindung macht (van Dijken et al. 1978).

Zur Synthese dient die DHAS bei der Herstellung von ^{13}C -markiertem Dihydroxyaceton, welches aus Hydroxypyruvat und Formaldehyd gebildet wird. Das isotonenmarkierte Dihydroxyaceton findet Anwendung als Ausgangssubstanz ^{13}C -markierter Zucker (Yanase et al. 1995).

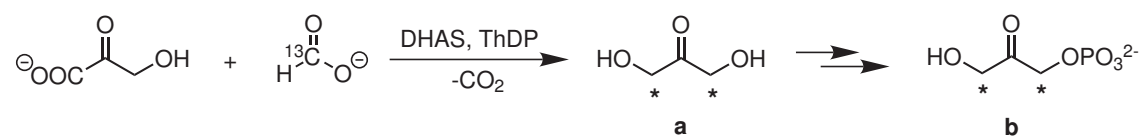


Abbildung 3.1: Dihydroxyaceton synthase katalysierte Bildung von ^{13}C markiertem Dihydroxyaceton (a) als Vorstufe für isotonenmarkiertes Dihydroxyacetonphosphat (b). Die ^{13}C angereicherten Positionen sind jeweils gekennzeichnet (*).

3.2.2 1-Deoxyxylulose-5-phosphat Synthase

Die 1-Deoxyxylulose-5-phosphat Synthase (DXPS; EC 2.2.1.7) ist ein mit der Pyruvatdehydrogenase und Transketolase verwandtes Enzym und wurde aus *E. coli* isoliert

(Sprenger et al. 1997). Durch die DXPS kann ein Acetylrest ausgehend von Pyruvat unter Abspaltung von CO₂ auf Glyceraldehyd bzw. Glyceraldehyd-3-phosphat übertragen werden. Als Produkt wird 1-Deoxyxylulose bzw. 1-Deoxyxylulose-5-phosphat gebildet (Taylor et al. 1998).

3.2.3 Transketolase

Die Transketolase (TK; EC 2.2.1.1) ist ein Enzym aus dem Pentosephosphatweg und katalysiert die Übertragung von Dihydroxyethylgruppen von Ketosen als Donorsubstrate auf Aldosen als Akzeptorsubstrate (Sprenger et al. 1997), (Schenk et al. 1998). Besonders interessant ist die Reaktionsführung beim Einsatz von α -Hydroxypyruvat als Substrat, da durch die gekoppelte CO₂-Abspaltung die Reaktionen quasi irreversibel werden. Da die TK nur 2-(*R*)-Hydroxyaldehyde als Akzeptorsubstrate akzeptiert, sind die entsprechenden 2-(*S*)-Hydroxyaldehyde durch eine kinetische Racematspaltung zugänglich (Kobori et al. 1992), (Effenberger et al. 1992).

Die durch TK zugänglichen Verbindungen dienen unter anderem als Intermediate für (+)-exo-Brevicomin, ein Pheromon des Borkenkäfers *Dendroctonus brevicomis*, oder für die Glycosidaseinhibitoren 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol und Fagomin (Myles et al. 1991), (Effenberger, Null 1992).

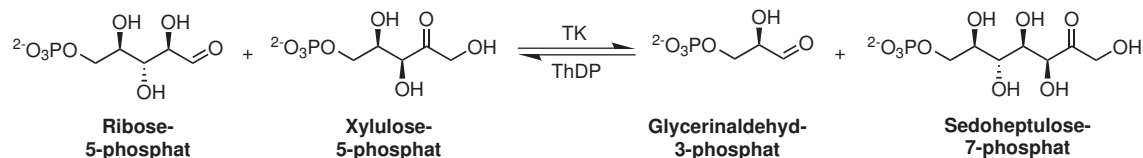


Abbildung 3.2: Transketolase katalysierte Transformation der C5-Zucker Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat in die C3- und C7-Einheiten Glycerin-3-phosphat und Sedoheptulose-7-phosphat aus dem Pentosephosphatweg.

3.2.4 Benzaldehydlyase

Das Enzym Benzaldehydlyase (BAL; EC 4.1.2.38) wurde aus dem Bakterium *Pseudomonas fluorescens* Biovar I isoliert und katalysiert in seiner physiologischen Reaktion die Spaltung von Benzoinen zu Benzaldehyden (Gonzalez, Vicuna 1989). Demir und Müller et al. konnten darüber hinaus die Rückreaktion von Aldehyden zu chiralen 2-Hydroxyketonen nachweisen, die hochselektiv als (*R*)-Enantiomere gebildet werden (Demir et al. 2002). Da bei der Benzoinspaltung ebenfalls nur (*R*)-Benzoin als Substrat akzeptiert wird, sind die entsprechenden (*S*)-Benzoinen durch kinetische Racematspaltung zugänglich (Demir et al. 2001). Als Akzeptorsubstrate werden neben aromatischen Aldehyden auch aliphatische Aldehyde akzeptiert, durch die im Falle von Acetaldehydderivaten als Akzeptorsubstrate die (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanonderivate ((*R*)-HPPs) gebildet werden (siehe Abbildung 3.3)

(Dominguez de Maria et al. 2006), (Dominguez de Maria et al. 2007), (Hildebrand et al. 2007).

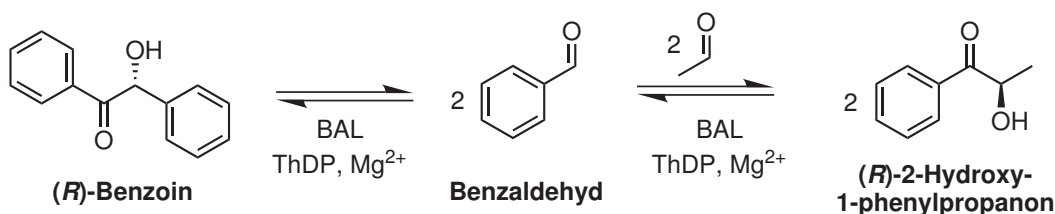


Abbildung 3.3: Benzaldehydlyase (BAL) katalysierte Spaltung von (R)-Benzoin zu Benzaldehyd sowie die Carboligationsreaktion mit Acetaldehyd zu (R)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon.

Die BAL eignet sich neben dem Einsatz in Enzym-Membran-Reaktoren (EMR) auch als Immobilisat im Festbettreaktor (Stillger et al. 2006), (Kurlemann, Liese 2004), (Hildebrand et al. 2007).

3.2.5 Pyruvatdecarboxylase

Die Pyruvatdecarboxylase (PDC; EC 4.1.1.1) ist ein seit langem bekanntes ThDP abhängiges Enzym. In seiner physiologischen Wirkung nimmt die PDC eine wichtige Rolle bei der alkoholischen Gärung ein, da sie die nicht oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd unter Abspaltung von CO_2 katalysiert. Der Acetaldehyd wird bei der weiteren Gärung von Alkoholdehydrogenasen zu Ethanol umgesetzt. Darüber hinaus ist die aus synthetischer Sicht wesentlich interessantere Carboligationsfähigkeit der PDC bekannt. Nach der Decarboxylierung des Pyruvat kann der noch am ThDP gebundene Acylrest auf einen weiteren Aldehyd, analog der BAL, übertragen werden. Im Falle von Benzaldehyd als Akzeptorsubstrat entsteht das (R)-1-Phenyl-1-hydroxypropanon ((R)-PAC; (R)-Phenylacetylcarbinol), welches ein Konformationsisomer des (R)-HPP ist.

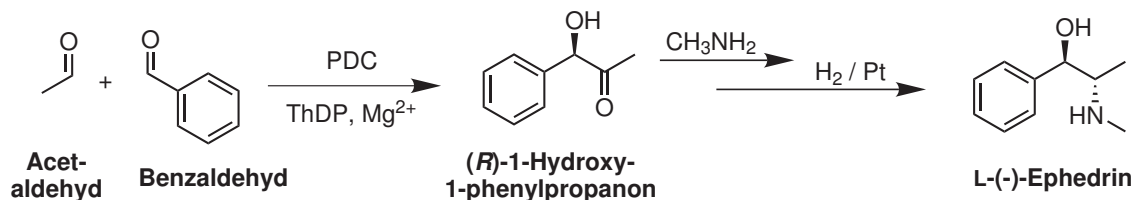


Abbildung 3.4: Synthese von L-(-)-Ephedrin. Im ersten Reaktionsschritt wird das chirale Intermediat (R)-PAC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd durch die PDC katalysiert gebildet. Nach Aminierung und Reduktion ist L-(-)-Ephedrin als Endprodukt zugänglich.

Diese Reaktion wurde 1921 zunächst mit den Substraten Pyruvat und Benzaldehyd sowie Hefe als Katalysator entdeckt (Neuberg, Hirsch 1921). (R)-PAC wird als Intermediat für die

Synthese von L-Ephedrin eingesetzt, welches leicht durch Aminierung und Reduktion zugänglich ist (siehe Abbildung 3.4). Dies ist eine der ersten industriellen Syntheserouten für Pharmaka, die einen biokatalytischen Schritt beinhalten und als Patent angemeldet wurden (Hildebrandt, Klavehn 1930). L-Ephedrin findet Anwendung bei der Behandlung asthmatischer Beschwerden und Bronchialerkrankungen.

3.2.6 Benzoylformiatdecarboxylase

Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD; EC 4.1.1.7) ist ein Enzym aus dem Mandelsäurekatabolismus, in dem Mandelsäure zu Benzoesäure umgewandelt wird (Abbildung 3.5). Im ersten Schritt wird die Mandelsäure durch die Mandelsäureracemase racemisiert, da lediglich die L-Mandelsäure durch die L-Mandelsäuredehydrogenase zu Benzoylformiat reduziert werden kann (Gunsalus et al. 1953b).

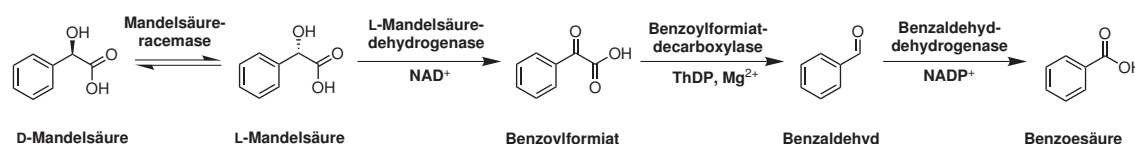


Abbildung 3.5: Übersicht der Reaktionsschritte im Mandelsäurekatabolismus.

Im dritten Schritt erfolgt die nicht oxidative Decarboxylierung des Benzoylformiats durch die BFD zu Benzaldehyd und CO_2 . Im letzten Schritt wird Benzoesäure durch die Benzaldehyddehydrogenase oxidativ gebildet. Die Benzoesäure wird anschließend weiter im β -Ketoacidweg metabolisiert und letztendlich zu Succinat und Acetyl-CoA verstoffwechselt (Gunsalus et al. 1953a), (Hegeman 1966), (Ornston, Stanier 1966).

Die BFD ist ein homotetrameres Enzym aus vier Untereinheiten zu jeweils 56,2 kDa, wobei das Homotetramer funktionell als Dimer von zwei dimeren Einheiten verstanden werden kann (Hasson et al. 1995), (Hasson et al. 1998). Neben ihrer physiologischen Decarboxylaseaktivität besitzt die BFD analog der PDC die Fähigkeit, Aldehyde zu chiralen 2-Hydroxyketonen zu verknüpfen.

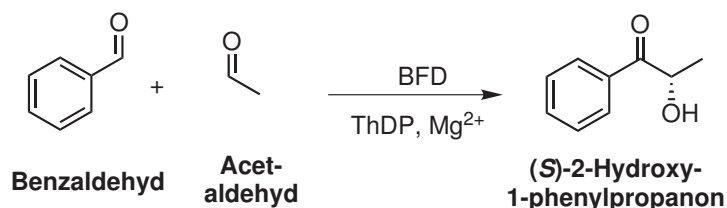


Abbildung 3.6: BFD katalysierte Bildung von (S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd.

Diese Fähigkeit wurde bei der BFD von Wilcocks et al. entdeckt, jedoch unterscheiden sich die PDC und die BFD hinsichtlich der Akzeptanz ihrer Substrate (Wilcocks et al. 1992). Bei der Decarboxylierung der 2-Ketosäuren ist Pyruvat das Substrat der PDC und Benzoylformiat das Substrat der BFD. Dementsprechend bevorzugt die PDC Pyruvat bzw. Acetaldehyd als Donorsubstrat und Benzaldehyd als Akzeptorsubstrat. Bei der BFD wird hingegen Benzoylformiat bzw. Benzaldehyd als Donorsubstrat und Acetaldehyd als Akzeptorsubstrat bevorzugt. Als Produkt wird (*S*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ((*S*)-HPP) gebildet (siehe Abbildung 3.6), welches ebenfalls wie das (*R*)-HPP ein Konformationsisomer des (*R*)-PAC ist. Vergleicht man die BFD mit der BAL, so erkennt man die gleiche Produktbildung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon (2-HPP), jedoch wird von der BFD das (*S*)-Enantiomer und von der BAL das (*R*)-Enantiomer gebildet.

Die BFD wurde bislang in verschiedenen Bakterienstämmen wie *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter calcoaceticus* gefunden, wobei in dieser Arbeit ausschließlich mit der BFD aus *Pseudomonas putida* gearbeitet wurde (Hegeman 1966), (Hegeman et al. 1970), (Barrowman et al. 1986), (Barrowman, Fewson 1985).

Die hier verwendete BFD (wild-type BFD; wtBFD) wurde von Iding et al. in *Escherichia coli* kloniert und mit einem Hexahistidin-tag versehen (Iding et al. 2000). In einer Mutagenesestudie der PDC aus *Zymomonas mobilis* und der BFD aus *Pseudomonas putida* wurden zum Vergleich von Siegert et al. die Varianten BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I generiert (Siegert 2000), (Siegert et al. 2005). Durch den selektiven Aminosäureaustausch von Alanin (A) und Phenylalanin (F) gegen Isoleucin (I) wurde das aktive Zentrum der BFD, dem aktiven Zentrum der PDC imitiert, was sich vor allem im Wechsel der Stereoselektivität auswirkt (Siegert et al. 2005). So verringert sich die Stereoselektivität von hoher (*S*)-Selektivität bei der wtBFD über eine verringerte (*S*)-Selektivität bei der BFD F464I zu einer nahezu nicht mehr vorhandenen Selektivität bei der BFD A460I und schließlich einer inversen (*R*)-Selektivität bei der BFD A460I-F464I. Diese (*R*)-Selektivität wird wie oben bereits erwähnt auch bei der PDC beobachtet (Siegert et al. 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die wtBFD sowie die drei Varianten mit Aminosäureaustausch BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I hinsichtlich ihrer biokatalytischen Eigenschaften näher bestimmt und vergleichend gegenübergestellt. Da diese Enzymvarianten nur minimale strukturelle Unterschiede, jedoch signifikante Änderungen in der Stereoselektivität aufweisen, eignen sie sich besonders gut für vergleichende, stereoselektive Untersuchungen.

3.3 Bereitstellung der Enzyme

3.3.1 Transformation der Plasmide in *E. coli* SG13009 und Stammerhaltung

Die benötigten Plasmide für die Bereitstellung der Enzyme wtBFD, BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I wurden freundlicher Weise von Frau Prof. Dr. Martina Pohl (AG

Biokatalyse und Biosensoren; Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

Die Transformation der Plasmide erfolgte nach einer Standardmethode, bei der mit DMSO kompetent gemachte Zellen verwendet wurden. Als Zellen wurden *E. coli* SG13009 Zellen der Firma Qiagen/ Hilden verwendet. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten angezogen und einzelne Kolonien in LB-Medium vermehrt. Um auszuschließen, dass fremde und nicht transformierte Zellen ebenfalls angezogen werden, wurden die Antibiotika Kanamycin (50 µg/mL; Stammresistenz) und Ampicillin (100 µg/mL; erworbene Plasmidresistenz) dem LB-Medium zugegeben.

Zur Stammerhaltung wurden die erzeugten Klone in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von $OD_{600} = 1$ bis 2 kultiviert. Nach dem Zentrifugieren der Zellen werden die Zellpellets in 20 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.3.2 Fermentation von *E. coli* SG13009

Für die Bereitstellung ausreichender Enzymmengen der Varianten wtBFD, BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I wurden alle Varianten im 2 L Maßstab bis zur Hochzelldichte fermentiert.

Als Fermentationsmedium wurde nach vorangegangenen Zellkulturtests ein komplexes Medium gewählt, welches aus Phosphatpuffer, Hefeextrakt und Glukose, sowie Spurenelementen und Vitaminen besteht (siehe Anhang A 2.3). Als Antibiotika wurden wiederum Kanamycin und Ampicillin zugegeben. Eine zu starke Schaumbildung während des Fermentationsprozesses wurde durch die Zugabe des Silikonöls Desmophen unterbunden.

Die Fermentationsstrategie bestand aus einer Batch-Phase sowie einer Fed Batch-Phase. Für die Batch-Phase wurde der Fermenter nach der Sterilisation mit 1 L Batch-Medium befüllt und der Gelöstsauerstoffgehalt auf ca. 70 % maximaler Sättigung durch Begasung mit Luft eingeregelt. Der pH Wert wurde durch Ammoniaklösung und Phosphorsäure konstant bei pH 7,1 gehalten sowie die Temperatur bei 38°C. Die Batch-Fermentationsphase wurde durch Animpfen mit einer Vorkultur aus LB-Medium gestartet und erst nach komplettem Verbrauch der Glukose und des Hefeextraktes auf die Fed Batch-Fermentationsphase umgestellt. Die Fütterung während der Fed Batch-Phase erfolgte manuell und Substrat limitiert, was über den Sauerstoffgehalt im Fermenter überprüft wurde. Die Proteinexpression wurde in der Regel nach etwa 16-18 h durch jeweilige Induktion mittels 1,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) gestartet und die fermentierten Zellen nach etwa 23 bis 24 h Gesamtfermentationsdauer geerntet, zentrifugiert und bei -20°C konserviert. Als Beispiel ist in Abbildung 3.7 ein Verlaufsdiagramm der Fermentation von *E. coli* SG13009-pBFD A460I dargestellt. Bei den Fermentationen wurden optische Dichten zwischen $OD_{600} = 120$ bis 160 erreicht sowie Ausbeuten zwischen 80 und 120 g Zelltrockenmasse.

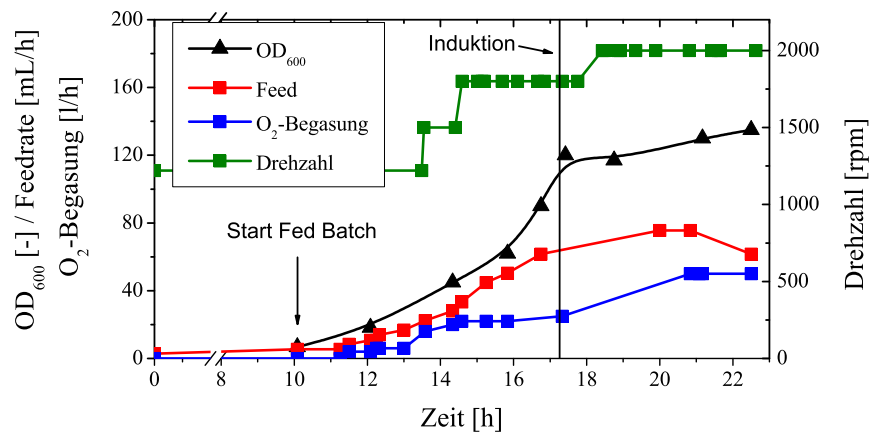


Abbildung 3.7: Übersicht der Fermentation von *E. coli* SG13009-pBFD A460I Zellen. Die Umstellung von der Batch- zur Fed Batch-Phase erfolgte nach etwa 10 h und die Induktion mittels 1,5 mM IPTG nach 17,2 h Fermentationsdauer.

3.3.3 Reinigung der wtBFD

Die in dieser Arbeit verwendete wtBFD lag als C-terminales Hexahistidininfusionsprotein vor und konnte daher über ein standardisiertes Reinigungsverfahren mittels Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt werden (Iding 1998). Die hier verwendete IMAC besteht aus einer 100 mL Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure Matrix (Ni-NTA) in einer Pharmacia XK26 Säule.

Die gefrorenen Zellen aus der Hochzelllichtfermentation werden dazu in Aufschlusspuffer aufgetaut und mit Lysozym versetzt. Nach einem 30 minütigen partiellen Verdau wird der erhaltene Rohextrakt mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert, um einen zellfreien Rohextrakt (ZFE) zu erhalten. Dieser kann direkt auf die Ni-NTA Matrix aufgetragen und schwach gebundene Proteine durch Waschpuffer eluiert werden. Nach diesem Waschschrift erfolgt die Elution der gewünschten wtBFD-Fraktion durch einen Stufengradienten von 50 mM auf 250 mM Imidazol. Das Imidazol wird in einem weiteren Schritt mittels Ultrafiltration entfernt. Das so erhaltene wtBFD Filtrat wird durch Lyophilisierung getrocknet und bei -20°C gelagert. Für die Versuche sowie die Enzymkristallisationen steht auf diesem Wege ein sehr gut handhabbares und pulveriges Enzympräparat zur Verfügung. Die Übersicht über eine wtBFD Reinigung mittels Ni-NTA Säule ist in Tabelle 3.1 gezeigt.

Tabelle 3.1: Reinigungsübersicht einer wtBFD Charge über eine Ni-NTA Säule. Eingesetzt wurden 48 g *E. coli* SG13009 Zellen mit dem Plasmid pBFDwt-His. Das Enzym wurde als zellfreier Extrakt (ZFE) mittels Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) sowie Ultra-(UF) gereinigt.

	V [mL]	Gesamtprotein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Gesamt- aktivität [U]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
ZFE	65	4774	0,7	3342	1	100
IMAC	90	252	11,1	2797	15,9	84
UF	63	214	11,4	2440	16,3	73

3.3.4 Reinigung der BFD Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I

Die drei BFD Varianten mit eingefügten Mutationen verfügen nicht wie die wtBFD über einen His-tag und müssen daher mit einer anderen Reinigungsstrategie präpariert werden. Eine alternative Reinigungsstrategie wurde bereits von Siegert et al. entwickelt, die zur Reinigung eine Anionenaustauschchromatographie, Ultrafiltration, hydrophobe Interaktionschromatographie, Ultrafiltration und Gelfiltration kombinierten (Siegert et al. 2005). Diese Aufreinigungsstrategie wurde dahingehend modifiziert, dass nach der Anionenaustauschchromatographie (ANX) und Volumenreduktion per Ultrafiltration direkt eine Gelfiltration durchgeführt wurde.

Für die ANX mittels Q-Sepharose (500 mL) wurde zur Elution ein linearer Chloridgradient von 150 mM zu 300 mM NaCl bei pH 7,5 verwendet, wobei die gewünschten Enzymfraktionen zwischen 250 mM und 280 mM NaCl von der Säule eluiert werden (siehe Abbildung 3.8). Für die weitere Reinigung wurden nur Fraktionen höchster Aktivität verwendet. Ein typisches Elutionsprofil für die Variante BFD A460I-F464I ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Die Gelfiltration mittels einer Superdex 200 Säule (300 mL) hat hierbei nur einen Reinigungsfaktor von ca. 2, jedoch wird die Enzymlösung gleichzeitig entsalzt. Eine charakteristische Reinigungstabelle für die Variante BFD F464I ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

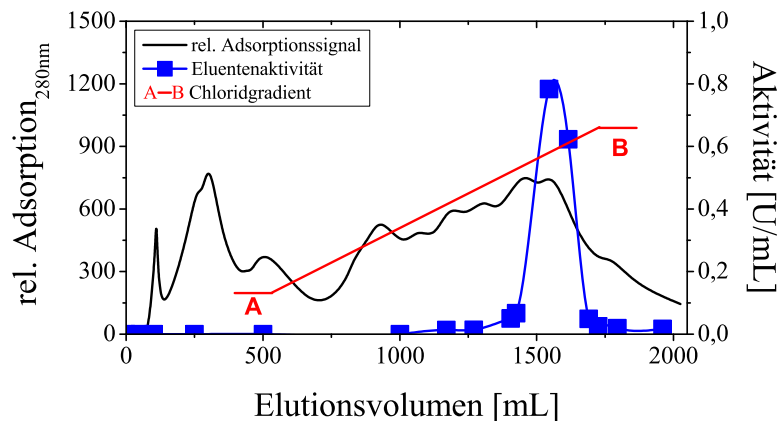


Abbildung 3.8: Elutionsprofil der Variante BFD A460I-F464I über eine Q-Sepharose Säule. Die Elution erfolgt über einen linearen Chloridgradienten von 150 mM (A) zu 300 mM (B) NaCl.

Tabelle 3.2: Reinigungsübersicht einer BFD F464I Charge aus 84 g *E. coli* SG13009. Das Enzym wurde als zellfreier Extrakt (ZFE) über Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) sowie Ultra-(UF) und Gelfiltration (GF) gereinigt.

	V [mL]	Gesamt- protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Reinigungs faktor	Ausbeute [%]
ZFE	180	4587	0,3	1376	1	100
ANX	230	489	1,9	930	6,3	68
UF	10	397	2,1	833	7	61
GF	50	183	4,5	824	15	60

Die große Zahl an Versuchen zur Charakterisierung erforderte hohe Enzymmengen, sodass alle Varianten mehrfach fermentiert und gereinigt werden mussten. Die Reinheit und Aktivität der präparierten Enzymchargen unterlag dabei Schwankungen, die vor allem durch die Güte der Überexpression während der Fermentation gegeben waren. Die durchschnittlich erzielten Enzymaktivitäten nach der Gefriertrocknung sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Durchschnittlich erzielte Enzymaktivitäten nach der Gefriertrocknung für die verwendeten BFD Varianten (Aktivitäten unter Standardbedingungen).

	Aktivitätsbereich [U/mg]
wtBFD	10,2 - 19,7
BFD F464I	1,6 – 4,5
BFD A460I	0,6 - 1,2
BFD F464I-A460I	1,8 – 3,6

3.3.5 Reinigung der Variante BFD A460I-F464I für die Enzymkristallisation

Für die Kristallisation der BFD Variante BFD A460I-F464I ist die oben beschriebene Reinigungsstrategie nicht ausreichend, da sich noch in geringen Mengen Fremdproteine in der Präparation befinden. Für eine Feinreinigung ThDP-abhängiger Enzyme ist der Farbstoff Cibacron blue bekannt, der zwar eine sehr hohe Spezifität gegenüber ThDP abhängigen Enzymen besitzt, jedoch nur eine sehr geringe Kapazität aufweist (Iding et al. 2000). Aus diesem Grund wurde für den Zellaufschluss ThDP freier Aufschlusspuffer verwendet. Die Enzymreinigung erfolgte über eine Blue Sepharose Fast Flow Säule (100 mL; auf Sepharose gebundenes Cibacron blue), auf die der zellfreie Extrakt direkt aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte wie bei der IMAC mittels eines Stufengradienten, jedoch hier durch Zusatz von 5 mM ThDP im Elutionspuffer. Das Reinigungsprofil ist in Tabelle 3.4 gezeigt. Auf Grund der sehr geringen Enzymausbeuten mittels Farbstoffaffinitätschromatographie wurde hier zur Aktivitätsbestimmung die sensitivere Decarboxylaseaktivität gewählt.

Tabelle 3.4: Reinigungsübersicht einer BFD A460I-F464I Charge mittels Farbstoffaffinitätschromatographie zur Proteinkristallisation. Die Aktivitäten (U_{BF}) beziehen sich hier auf die Decarboxylierung von Benzoylformiat.

	Gesamt-protein [mg]	spez. Aktivität [U_{BF}/mg]	Gesamtaktivität [U_{BF}]	Reinigungs-faktor	Ausbeute [%]
ZFE	890	14,5	12879	1	100
Blue-Sepharose	9	251	2263	17,3	18

Eine übergreifende Übersicht aller Reinigungsstrategien kann qualitativ in der SDS-PAGE in Abbildung 3.9 verfolgt werden.

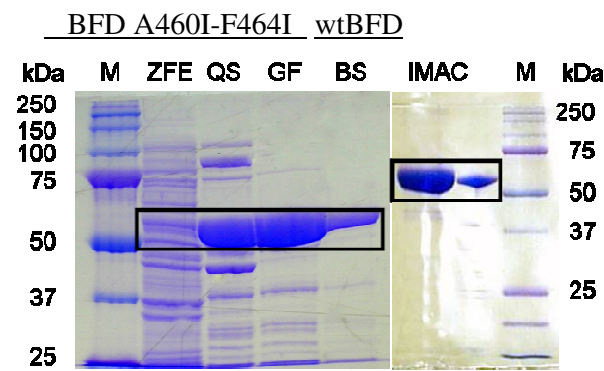


Abbildung 3.9: SDS-PAGE der Aufreinigungen von BFD A460I-F464I (links) und wtBFD (rechts). Aufgetragen sind der Marker (M), zellfreier Extrakt (ZFE), Elutionsfraktion nach der Anionenaustauschchromatographie (QS), Gelfiltrat (GF), Elutionsfraktion nach der Farbstoffaffinitätschromatographie (BS) und die Elutionsfraktion nach der Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC). Markiert sind die Banden der BFD mit einer Größe von 52,6 kDa.

3.4 Kurzzusammenfassung

Durch die verschiedenen ThDP-abhängigen Enzyme kann eine Reihe von Reaktionen katalysiert werden, die hohes Potential für die pharmazeutische Industrie besitzen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Varianten der BFD lässt sich bezüglich ihrer Bereitstellung zusammenfassen:

- Durch die Transformation der BFD-Plasmide mit einer Ampicillin Resistenz in den Stamm *E. coli* SG13009 (enthält eine Kanamycinresistenz) und einer Substrat limitierten Fermentation bzw. IPTG-iduzierten Überexpression ist die Herstellung größerer Mengen der benötigten Enzyme möglich.
- Die wtBFD kann durch ihren C-terminalen Hexahistidinrest effektiv mittels Metallionenaffinitätschromatographie isoliert werden.

- Die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I können durch eine kombinierte Reinigungsstrategie mittels Anionenaustauschchromatographie, Ultra- sowie Gelfiltration erhalten werden.
- Die Reinigung der Variante BFD A460I-F464I für die Enzymkristallisation erfolgte mittels Farbstoffaffinitätschromatographie über eine Blue Sepharose Matrix.

4. Charakterisierung der BFD Varianten*

4.1 Stabilitätsuntersuchungen

Zur Überprüfung der Lagerstabilität von BFD-Lösungen wurden die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I als Lyophilisate in 100 mM KP_i -Puffer mit den beiden Cofaktoren ThDP (0,5 mM) und Mg^{2+} (2 mM) bei pH 7,5 gelöst und bei 25°C inkubiert. Die Präparation der Enzymlösungen erfolgte steril, um eine Kontamination durch Mikroorganismen zu unterbinden. Die Aktivität der Enzymlösungen wurde in regelmäßigen Abständen durch Produktbildung von 2-HPP ausgehend von 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd überprüft (siehe Abbildung 4.1).

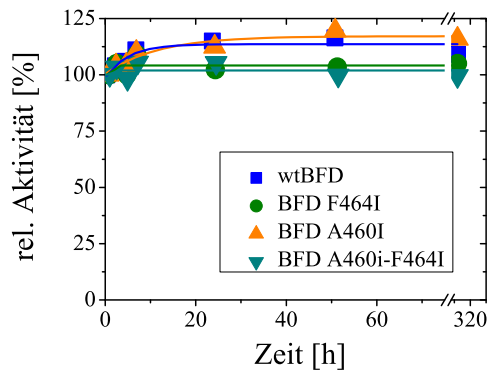


Abbildung 4.1: Untersuchung der Lagerstabilität von wtBFD sowie der Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I in 100 mM KP_i -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}) bei pH 7,5 und 25°C.

Für die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I konnte über den beobachteten Zeitraum von 13 Tagen keine Abnahme der Aktivität beobachtet werden. Bei den Enzympräparationen der wtBFD sowie der BFD A460I wurde hingegen während der ersten 48 h (besonders über die ersten 10 h) eine Steigerung der relativen Aktivität bis zu 120 % im Vergleich zu Beginn der Untersuchung festgestellt. Die Ursache hierfür liegt vermutlich im Einsatz von Lyophilisaten begründet, da diese erst wieder komplett in Puffer gelöst werden müssen, bevor die volle Aktivität erreicht werden kann. Da bei der Gefriertrocknung sowohl Magnesium- wie auch Phosphatsalze vorhanden sind, ist auch eine Kopräzipitation von schwer löslichen Phosphatsalzen mit Enzymliganden/Enzymeinschlüssen denkbar. Ein erneutes Lösen solcher Salze würde einen solchen Zeitrahmen der Aktivitätssteigerung über mehrere Stunden erklären. Für die Stabilität der wtBFD in 50 mM KP_i -Puffer (0,5 mM ThDP und 0,5 mM Mg^{2+}) bei pH 7 und 20°C wird eine Halbwertszeit von 36 ± 7 Tagen berichtet (Iding et al. 2000).

*Auszüge dieses Kapitels sind veröffentlicht in:

Marco Berheide, Stephanie Peper, Selin Kara, Wei Sing Long, Steffen Schenkel, Martina Pohl, Bernd Niemeyer, Andreas Liese; in: Influence of the hydrostatic pressure and pH on the asymmetric 2-hydroxyketone formation catalyzed by *Pseudomonas putida* benzoylformate decarboxylase and variants thereof.

Veröffentlicht in: Biotechnology and Bioengineering; DOI: 10.1002/bit.22650

Da hier über den betrachteten Zeitraum keine Abnahme der Aktivität beobachtet werden kann sowie der Zerfall biologischer Systeme einer exponentiellen Funktion gehorcht, muss die Halbwertszeit noch deutlich über den berichteten 36 Tagen liegen. Eine Halbwertszeit kann hier allerdings auf Grund der fehlenden Aktivitätsabnahme nicht bestimmt werden. Eine deutlich verringerte Stabilität zeigt die wtBFD hingegen bei Zugabe der Substrate Acetaldehyd bzw. Benzaldehyd sowie durch Entfernen des Cofaktors ThDP (Iding et al. 2000).

4.2. Reaktivität der Benzoylformiatdecarboxylase

Während für die wtBFD bereits vielen Publikationen mit zahlreichen Daten zur Reaktivität und Kinetik vorhanden sind, ist die Datenmenge für die drei BFD Varianten von Siegert et al. sehr begrenzt (siehe Tabellen 4.1 und 4.2) (Siegert et al. 2005).

Tabelle 4.1: Kinetische Parameter zur Decarboxylierung von Benzoylformiat (BF) durch BFD Varianten nach Iding et al.^a und Siegert et al.^b (Iding et al. 2000), (Siegert et al. 2005).

	$K_{M,BF}$ [mM]	v_{max} [U/mg]
wtBFD	0,7 ^a / 0,8 ^b	320 ^a / 362 ^b
BFD F464I ^b	0,2	39
BFD A460I ^b	1,1	16
BFD A460I-F464I ^b	2,3	5,6

Tabelle 4.2: Publierte kinetische Parameter der 2-HPP Bildung sowie der Enantioselektivität für die Carboligationsprodukte 2-HPP, Acetoin und Benzoin aus Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA) durch BFD Varianten nach Iding et al.^a und Siegert et al.^b (Iding et al. 2000), (Siegert et al. 2005). n.b. = nicht bestimmt.

	$K_{M,BA}$ [mM]	$K_{M,AA}$ [mM]	v_{max} [U/mg]	ee_{2-HPP} [%]	$ee_{Acetoin}$ [%]	$ee_{Benzoin}$ [%]
wtBFD	77 ± 19 ^a	310 ± 88 ^a	48 ± 10 ^a	92 (S) ^a	14 (R) ^b	>98 (R) ^b
BFD F464I	n.b.	n.b.	n.b.	42 (S) ^b	71 (R) ^b	>98 (R) ^b
BFD A460I	n.b.	n.b.	n.b.	10 (S) ^b	53 (R) ^b	>98 (R) ^b
BFD A460I-F464I	n.b.	n.b.	n.b.	50 (R) ^b	82 (R) ^b	>98 (R) ^b

Benzoin wird bei der 2-HPP Synthese nur als Nebenprodukt gebildet, wobei der Anteil des gebildeten Benzoins bei der wtBFD je nach Substratverhältnis von Benzaldehyd und Acetaldehyd etwa zwischen 1 % und 10 % variiert (Siegert 2000), (Dünnwald et al. 2000). Acetoin und PAC werden bei der 2-HPP Synthese nicht beobachtet, wohingegen geringe Mengen Acetoin beim alleinigen Einsatz von Acetaldehyd als Substrat detektierbar sind (Siegert 2000). Die Bildung von Benzoin verläuft hochselektiv, sodass ausschließlich (R)-Benzoin als Nebenprodukt detektiert werden kann. Die Bildung von Acetoin aus

Acetaldehyd verläuft im Vergleich dazu mit geringerer Selektivität ab, wobei eine Präferenz für das (*R*)-Enantiomer vorhanden ist. Bei der Bildung von 2-HPP erhält man von der wtBFD über die Varianten BFD F464I und BFD A460I hin zur Variante BFD A460I-F464I hingegen eine Inversion der Enantioselektivität vom (*S*)-HPP zum (*R*)-HPP. Für die weiteren Untersuchungen ist daher speziell die Bildung der Hauptprodukte (*S*)- und (*R*)-HPP relevant, sowie des Nebenproduktes (*R*)-Benzoin.

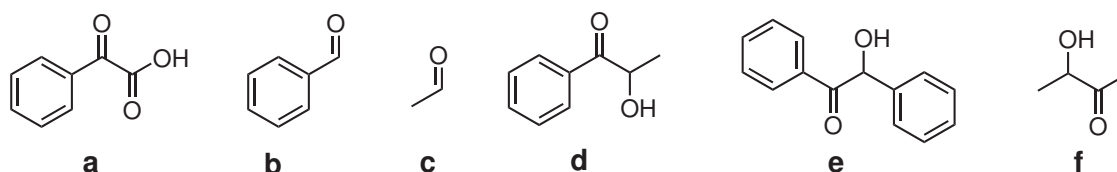


Abbildung 4.2: Übersicht der Substrate und Carboligationsprodukte der BFD: Benzoylformiat (a), Benzaldehyd (b), Acetaldehyd (c), 2-HPP (d), Benzoin (e) und Acetoin (f).

4.3 BFD katalysierte 2-HPP Bildung

Die Bildung von 2-HPP erfolgt aus den beiden Substraten Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA). Da zunächst Benzaldehyd als Donorsubstrat in der *active site* gebunden werden muss, bevor es auf das Akzeptorsubstrat Acetaldehyd übertragen werden kann, folgt diese Reaktion formell einem ordered-bi-uni Mechanismus (Wilcocks, Ward 1992), (Iding et al. 2000), (Bisswanger 2008). Aus kinetischer Sicht kann diese Reaktion durch eine Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik der Form:

$$v = \frac{v_{\max} * [BA] * [AA]}{(K_{M,BA} + [BA]) * (K_{M,AA} + [AA])}$$

angenähert werden. Die Kinetiken wurden mit dem Programm Matlab 7.4.0 (R2007a) berechnet.

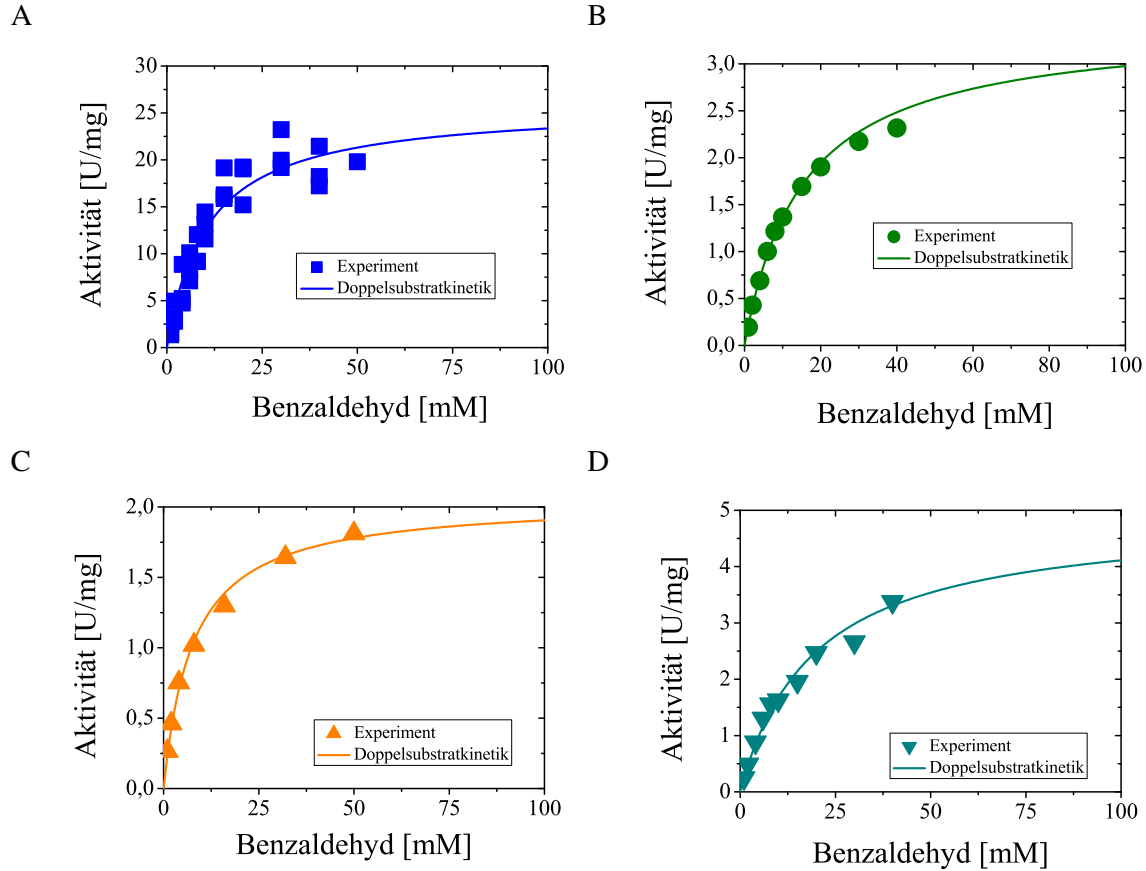


Abbildung 4.3: 2-HPP Bildung ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd durch wtBFD (A; 400 mM Acetaldehyd), BFD F464I (B; 300 mM Acetaldehyd), BFD A460I (C; 500 mM Acetaldehyd) und BFD A460I-F464I (D; 300 mM Acetaldehyd). 50 mM KPi -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), 30°C, pH 7,5.

Da Benzaldehyd nur begrenzt in wässrigen Medien löslich ist, können die Reaktionsraten nur bis zu einer maximalen Konzentration von 50 mM bestimmt werden. Wie in Abbildung 4.3 jedoch zu erkennen ist, wird innerhalb dieses Konzentrationsbereichs noch keine vollständige Sättigungskinetik erreicht. Für das Substrat Acetaldehyd zeigt sich hingegen eine komplexere Kinetik, da die Aktivität nach einem lokalen Maximalwert mit zunehmend steigender Acetaldehydkonzentration wieder abnimmt (siehe Abbildung 4.4).

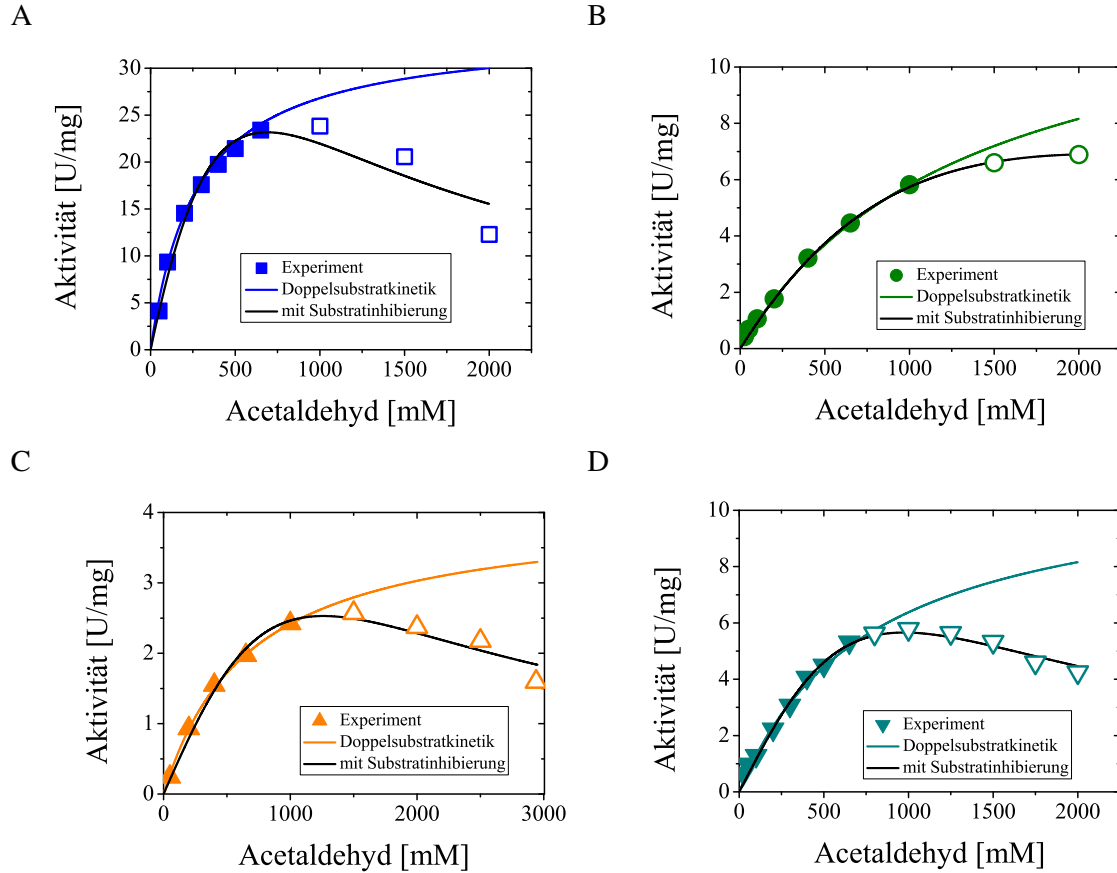


Abbildung 4.4: 2-HPP Bildung ausgehend von Benzaldehyd (40 mM) und Acetaldehyd durch wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Zur Bestimmung der Doppelsubstratkinetik ohne Inhibierung wurden nur Aktivitäten von 0 bis 750-1000 mM Acetaldehyd verwendet (ausgefüllte Symbole). 50 mM KP_i -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), 30°C, pH 7,5.

Die Messwerte für die Acetaldehydkinetik werden daher nur bedingt durch eine einfache Doppelsubstratkinetik wieder gegeben. Die Abnahme der Aktivität für höhere Acetaldehydkonzentrationen (etwa > 1000 mM) kann durch Berücksichtigung eines Inhibierungsterms jedoch gut interpretiert werden. Da die Inhibierung mit zunehmender Konzentration des Substrats Acetaldehyd erfolgt, wurde für die Angleichung der Messwerte eine Substratinhibierung durch Acetaldehyd angenommen:

$$v = \frac{v_{\max} * [BA] * [AA]}{(K_{M,BA} + [BA]) * (K_{M,AA} + [AA] * (1 + \frac{[AA]}{K_{i,AA}}))}$$

Die Berücksichtigung dieser Substratinhibierung zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Messwerten. Die kinetischen Parameter für die Doppelsubstratkinetik (bei der Acetaldehydkinetik wurden nur Werte bis etwa 1000 mM Acetaldehyd berücksichtigt; voll

ausgefüllte Symbole) sowie die Doppelsubstratkinetik mit Substratinhibierung sind in den Tabellen 4.3 und 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.3: Kinetische Parameter für die 2-HPP Bildung bestimmt durch eine Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik. Im Vergleich sind für die wtBFD Werte nach Iding et al.^a angegeben (Iding et al. 2000).

Variante	$v_{\max}$ [U/mg]	$K_{M,BA}$ [mM]	$K_{M,AA}$ [mM]
wtBFD	$43,3 \pm 12 / (48 \pm 10)^a$	$10,6 \pm 2,9 / (77 \pm 19)^a$	$271,4 \pm 173 (310 \pm 80)^a$
BFD F464I	$18,9 \pm 2,7$	$15,2 \pm 3,7$	1350 ± 308
BFD A460I	$4,8 \pm 0,6$	$7,7 \pm 1,3$	678 ± 156
BFD A460I-F464I	$17,6 \pm 3,4$	$19,4 \pm 6,7$	775 ± 235

Tabelle 4.4: Kinetische Parameter für die 2-HPP Bildung bestimmt durch eine Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik mit Substratinhibierung durch Acetaldehyd.

Variante	$v_{\max}$ [U/mg]	$K_{M,BA}$ [mM]	$K_{M,AA}$ [mM]	$K_{i,AA}$ [mM]
wtBFD	$140,7 \pm 241,2$	$11,2 \pm 3,2$	1280 ± 2680	371 ± 784
BFD F464I	$29,9 \pm 14,1$	$15,2 \pm 3,9$	2270 ± 1320	2000 ± 1860
BFD A460I	167 ± 270	8 ± 0	34100 ± 55920	47 ± 77
BFD A460I-F464I	1305 ± 34500	20 ± 0	71000 ± 1886200	13 ± 400

Für das Substrat Benzaldehyd ergeben sich nach der Doppelsubstratkinetik ohne Substratinhibierung $K_{M,BA}$ -Werte zwischen 7,7 mM für die BFD A460I und 19,4 mM für die BFD A460I-F464I. Der $K_{M,BA}$ -Wert von 10,6 mM für die wtBFD ist deutlich geringer als der ermittelte Literaturwert von Iding et al. mit 77 mM (Iding et al. 2000). Insgesamt korrelieren die $K_{M,BA}$ -Werte für die Doppelsubstratkinetik sehr gut mit denen der Doppelsubstratkinetik mit Substratinhibierung, die sich nur minimal voneinander unterscheiden. Bei den ermittelten maximalen Reaktionsraten sowie den $K_{M,AA}$ -Werten unterscheiden sich beide Kinetiken jedoch sehr stark voneinander. Als maximale Reaktionsraten erhält man nach der Doppelsubstratkinetik für die wtBFD einen Wert von $v_{\max} = 43$ U/mg, der sehr gut mit dem Literaturwert übereinstimmt. Die maximalen Reaktionsraten sind für die beiden Varianten mit Phenylalaninsubstitution BFD F464I und BFD A460I-F464I in etwa gleich groß mit einem Wert von 18,9 bzw. 17,6 U/mg. Die Variante BFD A460I ist hingegen wesentlich weniger aktiv mit einem Wert von $v_{\max} = 4,8$ U/mg. Bei der Betrachtung dieser Werte muss man jedoch berücksichtigen, dass das Substrat Benzaldehyd nur bis etwa 50 mM löslich ist und eine Inhibierung durch Acetaldehyd in diesen Werten nicht berücksichtigt wird. Von daher haben diese Werte eher einen vergleichenden Charakter als eine praktische Relevanz für die Auslegung einer Biotransformation. Für Acetaldehyd ergibt sich ein $K_{M,AA}$ -Wert von 271 ± 173 mM, der mit dem Literaturwert von $K_{M,AA}$ von 310 ± 80 gut korreliert. Die $K_{M,AA}$ -Werte für die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I liegen mit 678 bis 1350 mM hingegen deutlich höher.

Auffällig beim Vergleich der kinetischen Parameter zwischen Literatur und den hier ermittelten ist die Diskrepanz der Michaelis-Menten Konstanten für Benzaldehyd, da hierzu gegensätzlich sowohl die maximalen Reaktionsraten wie auch die Michaelis-Menten Konstanten für Acetaldehyd gut miteinander korrelieren. Eine mögliche Ursache liegt im Gebrauch von nicht destilliertem Benzaldehyd, da dieser eine verringerte Aktivität besitzt (siehe Abbildung 4.5). Die hier durchgeführten Experimente wurden mit redestilliertem Benzaldehyd durchgeführt.

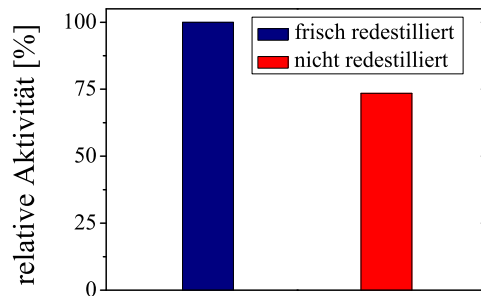


Abbildung 4.5: Vergleich der Aktivitäten der 2-HPP Bildung von frisch redestilliertem und nicht redestilliertem, kommerziellem Benzaldehyd. Reaktionsbedingungen: 40 mM Benzaldehyd, 400 mM Acetaldehyd, 50 mM KPi -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), 30°C, pH 7,5.

Zum einen neigt Benzaldehyd zu einer schnellen Oxidation zu Benzoesäure durch Luftsauerstoff, was allerdings keinen inhibierenden Effekt, zumindest auf die Decarboxylaseaktivität, der BFD zur Folge hat (Weiss et al. 1988). Eine Erklärung könnte allerdings die Selbstpolymerisation des Benzaldehyds zu Oligomeren sein, durch die eine Verringerung der Aktivität verursacht werden könnte. Auch wenn hier der Grund des Aktivitätsverlusts beim Einsatz von nicht frisch destilliertem Benzaldehyd eindeutig geklärt werden kann, so zeigt sich dennoch ein Verlust der Aktivität um ca. 25 %. Eine Testreihe zu verschiedenen Chargen nicht redestilliertem Benzaldehyd würde sicherlich noch weitere Erkenntnisse liefern, ob diese Aktivitätsabnahme noch höher ausfallen kann. Die Bildung eines reversibel wirkenden Inhibitors würde den erhöhten $K_{M,BA}$ -Wert aus Iding et al. erklären.

Vergleicht man die Doppelsubstratkinetiken mit und ohne Substratinhibierung untereinander, so fallen die stark unterschiedlichen kinetischen Parameter bezüglich $v_{\max}$ und $K_{M,AA}$ auf. Zwar werden die experimentell ermittelten Werte sehr gut durch den Inhibierungsterm wieder gegeben, die erhaltenen Parameter sind jedoch nicht realistisch, was auch an der Varianz der Werte deutlich wird (siehe Tabelle 4.4). Dies lässt vermuten, dass zwar die Aktivität durch die hohen Acetaldehydkonzentrationen herabgesetzt wird, dass in dem Sinne jedoch keine reine Substratinhibierung vorliegt. Wahrscheinlicher ist eine Enzymdeaktivierung der BFD-Varianten, die durch den Acetaldehyd hervorgerufen wird. Der drastische Stabilitätsverlust der BFD bei Zugabe von 200 mM Acetaldehyd, wie von Iding et al.

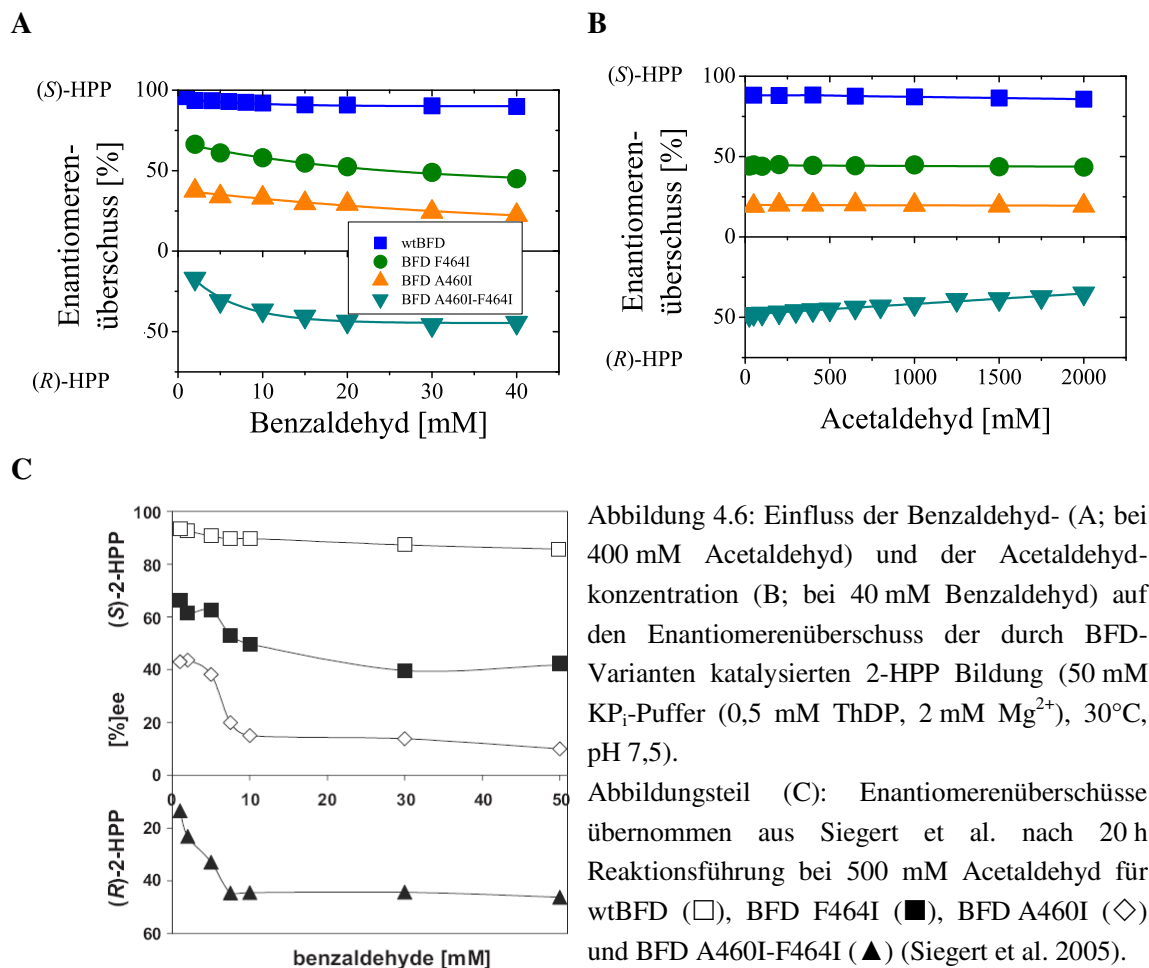
beobachtet, würde mit solch einer Deaktivierung bei sehr hohen Acetaldehydkonzentrationen > 1000 mM gut übereinstimmen (Iding et al. 2000).

4.4 Einfluss der Substratkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss

Durch die Arbeiten von Iding et al., Greiner et al. sowie Siegert et al. ist bereits bekannt, dass die 2-HPP Bildung durch die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I von den Substratkonzentrationen (Benzaldehyd und Acetaldehyd) beeinflusst wird (Iding et al. 2000), (Greiner 1999), (Siegert et al. 2005). Die Aktivitäten folgen dabei einer Doppelsubstratkinetik, wie bereits zuvor diskutiert wurde (Kapitel 4.3). Neben der Aktivität wird jedoch auch die Enantioselektivität des gebildeten 2-HPP durch die Substratkonzentrationen beeinflusst. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den verschiedenen Arbeiten wurde daher der Einfluss der Benz- und Acetaldehydkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss des gebildeten 2-HPP wiederholt überprüft (Abbildung 4.6). Um jedoch eine möglichst gute Korrelation der Ergebnisse innerhalb einer Messreihe zu erzielen wurden die Enantioselektivitäten nicht nach 20 h Reaktionszeit bestimmt (wie bei Iding et al. und Siegert et al.), sondern für jeweils 5 % Umsatz der vorgelegten Benzaldehydkonzentration.

Der in den folgenden Kapiteln diskutierte Enantiomerenüberschuss verhält sich nicht linear zu den entsprechenden Enantiomerenverhältnissen (siehe Kapitel 10 und Abbildung 10.1), was bei der Fehlerbetrachtung grundsätzlich berücksichtigt werden muss. Durch eine Veränderung im Bereich von kleinen Enantiomerenverhältnissen (racemischer Bereich) erfolgt somit eine wesentlich stärkere Veränderung des Enantiomerenüberschusses als im Bereich von großen Enantiomerenverhältnissen (z.B. enantiomerenreiner Bereich). Daher ist die Angabe der Enantiomerenüberschüsse im racemischen Bereich mit einem deutlich höheren Fehler belastet als im Bereich hoher Enantioselektivität. Experimentell bestimmt ergibt sich beispielsweise eine Fehler für racemisches 2-HPP von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 0 \pm 3 \%$ sowie für weitgehend reines (S)-HPP von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 95 \pm 0,2 \%$.

Beim Vergleich der beiden Abbildungsteile (Abbildung 4.6 A+C) ist der gleiche Trend zu einer signifikanten Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses von der eingesetzten Benzaldehydkonzentration zu erkennen. Dabei ist mit zunehmender Benzaldehydkonzentration eine Verschiebung des *ee*-Wertes zu geringeren (S)-HPP Werten bzw. für die Variante BFD A460I-F464I zu steigenden (R)-HPP Werten erkennbar. Dieser Effekt ist für die drei Varianten mit Mutation wesentlich stärker ausgeprägt als für die wtBFD, jedoch ist die Verschiebung des *ee*-Wertes zugunsten des gebildeten (R)-HPP für alle Varianten tendenziell gleich.



Bei der Variation der Acetaldehydkonzentration ist für die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I und BFD A460I kein Effekt erkennbar, für die Variante BFD A460I-F464I jedoch eine Tendenz zu geringeren *ee*-Werten für (*R*)-HPP mit steigender Acetaldehydkonzentration. Vergleicht man bei der Variante BFD A460I-F464I die Effekte für Benzaldehyd und Acetaldehyd miteinander, so ist der Effekt durch Benzaldehyd mit einem Δee von 27 % über den beobachteten Konzentrationsbereich im Vergleich zum Acetaldehyd mit einem Δee von 13 % doppelt so groß.

Betrachtet man diese Effekte mit dem Reaktionsmechanismus der BFD, so ist der stärkere Effekt durch Benzaldehyd in dieser Form bislang nicht erklärbar. Zwar haben Iding et al. die verschiedenen Substratbindungsmodi in der *active site* durch Computersimulation nachgestellt und mögliche Erklärungen für die Bildung von (*S*)- und (*R*)-HPP aufgezeigt, jedoch sind mit dem Modell die Effekte durch die Substratkonzentrationen nicht eindeutig erklärbar (Iding et al. 2000).

Ergebnisse aus der Literatur zu Kristallisationsexperimenten und Computersimulationen belegen mit hoher Wahrscheinlichkeit die feste Ausrichtung des Phenylrestes des intermediär gebildeten Enamin-Carbanions (siehe Reaktionsmechanismus), sodass als selektivitätsbestimmender Schritt die Anbindung des Akzeptoraldehyds an das Enamin-

Carbanion gilt. Eine stärkere Abhängigkeit der Enantioselektivität durch die Akzeptoraldehydkonzentration wäre daher wahrscheinlicher.

Die potentielle Ausrichtung des Akzeptoraldehyds wurde von Pohl et al. und Gocke et al. näher betrachtet, wobei die Region um die Aminosäureposition 461 als entscheidend für die Akzeptorsubstratausrichtung identifiziert wurde (Knoll et al. 2006), (Gocke et al. 2008). Zwar ist durch die Ausbildung einer Substratbindungstasche (auch als *S*-Pocket in der Literatur beschrieben) das Verhalten der Enantioselektivitäten innerhalb der unterschiedlichen Varianten erklärbar, jedoch nicht der Einfluss der Substratkonzentrationen.

4.5 Einfluss des pH-Wertes auf den Enantiomerenüberschuss

Als weiterer reaktionstechnischer Parameter ist der pH Wert von Bedeutung, da Enzyme bezüglich ihrer Aktivität in der Regel eine deutliche Abhängigkeit zeigen. Die Aktivität der wtBFD wurde in Abhängigkeit des pH-Wertes von Iding et al. untersucht (Iding et al. 2000). Für die Decarboxylierung von Benzoylformiat wurde ein Aktivitätsmaximum bei pH 6,2 ermittelt, für die Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu 2-HPP hingegen maximale Aktivitäten im leicht alkalischen Bereich ($\text{pH} > 7,5$). Für geringere pH Werte als pH 5 verliert die BFD hingegen ihre Aktivität in einer sigmoidalen Abhängigkeit.

Über den Einfluss des pH-Wertes auf die Enantioselektivität von BFD katalysierten Carboligationsreaktionen wird bislang nur in einer Literaturstelle berichtet. So schildern Gocke et al. bei der zur 2-HPP analogen Carboligation von Benzaldehyd und Propanal zum chiralen Produkt (*S*)-2-Hydroxy-1-phenylbutan-1-on ((*S*)-HPB) eine Steigerung der Enantioselektivität bei den Varianten BFD L461A bzw. BFD L461G von $ee_{(S)\text{-HPB}} = 88\%$ bzw. 93 % auf $ee_{(S)\text{-HPB}} = 93\%$ bzw. 97 % bei einem pH-Wechsel von pH 7,0 auf pH 7,9 (Gocke et al. 2008). Eine systematische Untersuchung von pH-Effekten gibt es bislang allerdings noch nicht.

Für die Enantioselektivität der 2-HPP Bildung wurden die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I bezüglich des pH-Wertes und der Benzaldehydkonzentration kombinatorisch untersucht. Dazu wurde die 2-HPP Bildung für alle Varianten im Konzentrationsbereich von 2-30 mM Benzaldehyd im pH-Bereich zwischen pH 6,0 und pH 7,5 verfolgt und der Enantiomerenüberschuss für Umsatzpunkte jeweils zwischen 2 und 5 % bestimmt.

Bei der wtBFD ist nur eine sehr geringe Abhängigkeit des ee -Wertes vom pH-Wert zu erkennen, jedoch erhält man tendenziell leicht höhere ee -Werte für (*S*)-HPP bei höheren pH-Werten (Abbildung 4.7 (A)). Die höchsten ee -Werte können bei geringen Benzaldehydkonzentrationen (hier 2 mM) und pH 7,5 erreicht werden. So hat der Enantiomerenüberschuss bei diesen Bedingungen einen maximalen Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 94\%$ wohingegen er bei 30 mM Benzaldehyd und pH 6,0 auf einen Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 89\%$ abfällt.

Bei der wtBFD zeigt sich nur ein äußerst geringer Einfluss von pH-Wert und Benzaldehydkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss. Die höchste Stereoselektivität

wird bei 2 mM Benzaldehyd und pH 7,5 mit einem $ee_{(S)\text{-HPP}}$ -Wert von 94 % erreicht (Abbildung 4.7 (A)). Bei den drei Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I zeigen sich für die (S)-HPP Bildung maximale Enantioselektivitäten im Bereich von pH 6,5-7,0 und geringen Benzaldehydkonzentrationen (hier 2 mM). Im Umkehrschluss bedeutet dies für die Variante BFD A460I-F464I eine minimale Selektivität bezüglich des (R)-Enantiomers von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 6$ %. Ausgehend von diesen lokalen $ee_{(S)\text{-HPP}}$ -Maxima verringert sich der erzielte $ee_{(S)\text{-HPP}}$ -Wert durch Erhöhung bzw. Erniedrigung des pH-Wertes sowie in einem stärkeren Maß durch Erhöhung der Benzaldehydkonzentration. Die geringsten $ee_{(S)\text{-HPP}}$ -Werte werden folglich bei hohen Benzaldehydkonzentrationen (hier 30 mM) und hohen pH-Werten erreicht. Generell konnten für pH-Werte > pH 7,5 keine Veränderungen des Enantiomerenüberschusses detektiert werden, sodass die Veränderung hier vor allem auf den leicht sauren Bereich bis maximal pH 7,5 beschränkt ist.

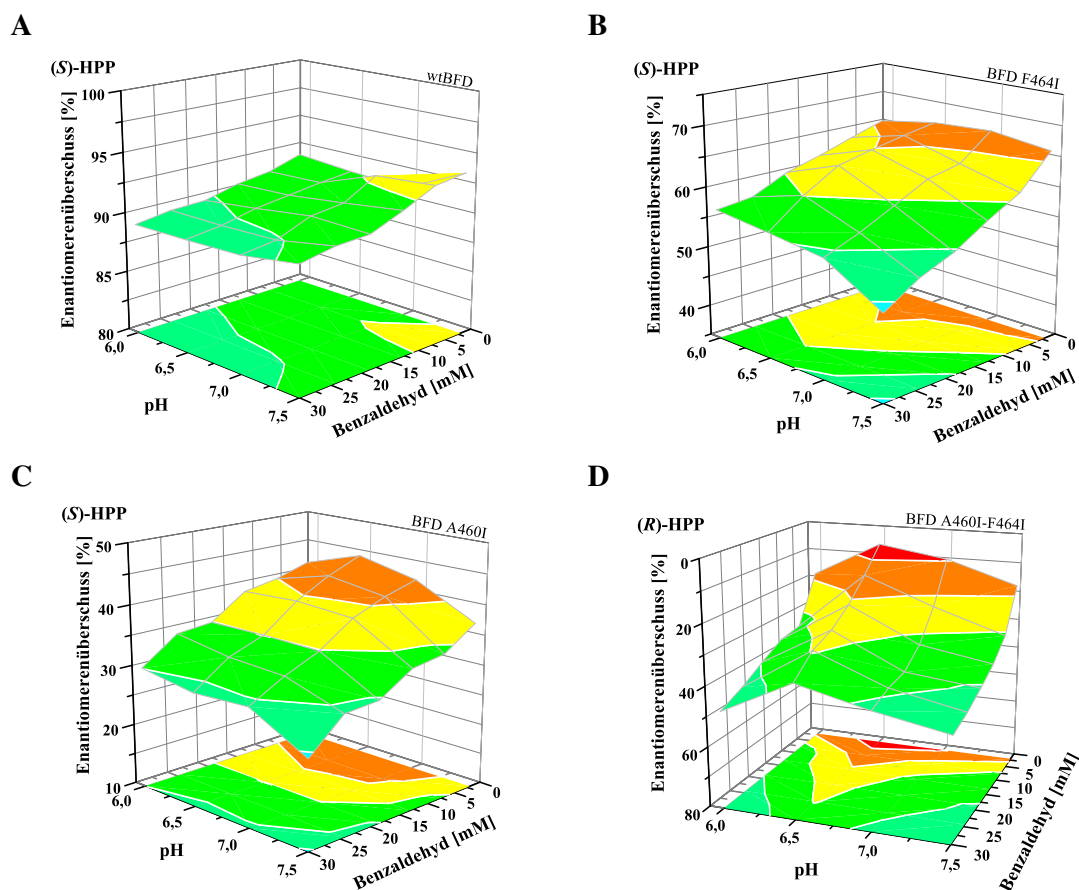


Abbildung 4.7: Einfluss des pH-Wertes und der Benzaldehydkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss der 2-HPP Bildung für wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Reaktionsbedingungen: 400 mM Acetaldehyd in 100 mM KP_1 -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), 30°C, pH 7,5.

Tabelle 4.5: Höchste und niedrigste erzielte Enantiomerenüberschüsse für 2-HPP durch Variation des pH-Wertes und der Benzaldehydkonzentration.

	max. $ee_{2\text{-HPP}}$ [%]	min. $ee_{2\text{-HPP}}$ [%]	Δee [%]
wtBFD	94 (<i>S</i>)	89 (<i>S</i>)	5
BFD F464I	68 (<i>S</i>)	49 (<i>S</i>)	19
BFD A460I	45 (<i>S</i>)	24 (<i>S</i>)	21
BFD A460I-F464I	48 (<i>R</i>)	6 (<i>R</i>)	42

Über den Einfluss des pH-Wertes auf die Enantioselektivität einer enzymatischen Reaktion gibt es bislang nur äußerst wenige Literaturstellen. Lummer et al. berichten von einer Beeinflussung bei der Penicillinamidase katalysierten Hydrolyse von racemischen Substraten (kinetische Racematspaltung) (Lummer et al. 1999). Als Ursache für solche Effekte werden katalytisch relevante Aminosäuren genannt, deren pK_S -Wert um den betrachteten pH-Bereich liegt, in dem die Änderungen des ee beobachtet werden. Neben der Enantioselektivität tritt demzufolge auch eine Veränderung in der katalytischen Aktivität auf (Lummer et al. 1999). Bei dem hier betrachteten System der BFD treffen diese beiden Punkte ebenfalls zusammen, da bei der wtBFD nur Veränderungen in der Aktivität in einem Bereich zwischen pH 5,0 und pH 7,5 beobachtet werden (Iding et al. 2000). Bei höheren pH-Werten bleibt die Carboligationsaktivität hingegen konstant, bei niedrigeren Werten wird kein 2-HPP mehr gebildet.

In der *active site* der BFD bzw. der unmittelbaren Umgebung befinden sich verschiedene Aminosäuren, die prinzipiell protoniert/deprotoniert werden können und somit einen potenziellen Einfluss auf die Aktivität der BFD besitzen. Bei der Betrachtung von Aminosäuren muss man zwischen den freien Aminosäuren in wässriger Lösung und gebundenen Aminosäuren in Proteinstrukturen differenzieren, da das jeweilige Umgebungsmilieu unterschiedlich ist. So können sich beispielsweise die pK_S -Werte der Aminosäureseitenketten in einer polaren wässriger Lösung stark von denen in einer hydrophoben Proteinumgebung unterscheiden. Dieser Effekt ist beispielsweise auch beim ThDP selbst zu beobachten, da das Proton an C2- des Thiazolrings in Wasser einen pK_S -Wert von 15,4 hat, die enzymkatalysierten Reaktionen jedoch bei pH 6,0 abläuft. Für diese ist eine vorherige Deprotonierung des ThDP unumgänglich, sodass der pK_S -Wert in der Proteinumgebung stark verringert werden muss (Jordan et al. 1999).

Für die Berechnung der pK_S -Werte in einer Proteinumgebung stehen momentan verschiedenen Softwareprogramme zur Verfügung, die den Einfluss von benachbarten Aminosäuren sowie die Polarität des Protein umgebenden Lösungsmittels berücksichtigen. Mit dem Programm H^{++} können so alle theoretischen pK_S -Werte der Aminosäuren eines Proteins bestimmt werden (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++/index.php>). Bei dieser Bestimmung wird der pK_S -Wert aller titrierbaren Gruppen mit Hilfe der Poisson-Boltzmann Gleichung bestimmt. Als äußere Parameter werden dabei die Dielektrizitätskonstanten der

Lösung und der Proteinumgebung benötigt, sowie der Salzanteil in der Lösung. Für die Dielektrizitätskonstante der Lösung wurde der Wert von destilliertem Wasser (80) verwendet, bei der Dielektrizitätskonstanten des Proteins muss eine Abschätzung getroffen werden. Für Aminosäuren, die sehr weit im Inneren eines Proteins liegen, werden Werte von etwa 4-5 verwendet, für Aminosäuren die in der peripheren Umgebung des Proteins und somit nah am Lösungsmittel sind, dementsprechend höhere Werte um etwa 20. Da die *active site* der BFD in einer Proteintasche direkt am Rande des Proteins liegt, wurde als Wert für die Dielektrizitätskonstante der Wert 15 ausgewählt. Der Salzgehalt wurde auf 50 mM eingestellt, da dies der Phosphatkonzentration der verwendeten Puffer entspricht. Als Struktur wurde die wtBFD aus der *Protein-Data-Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) mit der Bezeichnung 3FZN benutzt (tetramere Struktur), die von Bruning et al. mit einer Auflösung von 1,62 Å bestimmt wurde (Bruning et al. 2009). Als Ergebnis der pK_S-Wert Berechnung stellt sich heraus, dass lediglich Histidine in der Proteinstruktur die gesuchten pK_S-Werte zwischen 5 und 7 haben. In der *active site* befinden sich zwei unterschiedliche Histidine und zwar His70 sowie His281. Die Ergebnisse der pK_S Bestimmung sind in Tabelle 4.6 angegeben. Auf Grund der homotetrameren Struktur der BFD werden alle vier pK_S-Werte der jeweiligen Histidine der BFD-Monomere berechnet. Als gemittelte pK_S-Werte (da formal die Histidine äquivalent sind) ergibt sich für His70 ein Wert von 11 und für His281 ein Wert von 5,9. Der pK_S-Wert von freiem Histidin beträgt zum Vergleich 6,0 (Koolman, Röhm 1997). Als Fehler werden Schwankungen des pK_S-Wertes von ± 1 angegeben. Neben den pK_S-Werten erfolgt auch eine mathematische Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IP) des Proteins, welcher bei dieser Berechnung zu IP = 6,67 bestimmt wurde und gut mit dem experimentell bestimmten Literaturwert von IP = 6,5 übereinstimmt (Hasson et al. 1995).

Tabelle 4.6: pK_S-Wert Berechnung für die Aminosäuren His70 und His281 der einzelnen BFD-Monomere mit dem Programm H⁺⁺. Bedingungen: 50 mM Salzgehalt, Dielektrizitätskonstante/Lösung = 80, Dielektrizitätskonstante/Protein = 15.

Aminosäure	pK _S -Wert 1	pK _S -Wert 2	pK _S -Wert 3	pK _S -Wert 4	Mittel pK _S -Werte
His 70	11,5	9,9	11,6	11,0	11
His 281	6,1	5,7	5,9	6,0	5,9

Für beide Histidine gibt es bereits Untersuchungen durch gerichtete und Sättigungsmutagenese sowie quantenmechanische Berechnungen, aus denen hervorgeht, dass der Austausch der Histidine gegen andere Aminosäuren mit einem Verlust an Aktivität verbunden ist (Sergienko et al. 2000), (Polovnikova et al. 2003), (Yep et al. 2008), (Topal et al. 2010). Die Enantioselektivität verringert sich bei der Mutagenese ebenfalls, wobei für die Variante BFD H70A ein Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 57$ und für die Variante BFD H281A ein Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 50$ angegeben wird (Siegert 2000). Für den pH-Effekt bezüglich der Aktivität und auch der Enantioselektivität könnte damit die Aminosäure His281 verantwortlich sein.

Der berechnete pK_S -Wert für His70 liegt bei dieser Bestimmung bei 11, sodass His70 bei Reaktionsbedingungen in einer eher dauerhaft protonierten Form vorliegen muss. Ein expliziter Nachweis kann an dieser Stelle jedoch nicht gegeben werden.

4.6 Einfluss der Temperatur auf Aktivität und Stereoselektivität

Als weiterer reaktionstechnischer Parameter spielt auch die Temperatur eine entscheidende Rolle für das Reaktionssystem bezüglich

- a) Aktivität und
- b) Selektivität.

Für die Aktivität der meisten chemischen Reaktionen gilt formal gesehen, dass sich die Aktivität mit zunehmender Temperatur erhöht. Diese Aktivitätserhöhung verläuft jedoch nicht linear mit der Temperaturerhöhung, sondern folgt in erster Näherung dem exponentiellen Ansatz, der 1889 von Arrhenius entdeckt wurde (Wedler 1985):

$$k_n = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}}$$

Hierin enthalten sind die Parameter:

k_n	= Geschwindigkeitskonstante der Reaktion	$[s^{-1}]$
A	= präexponentieller Faktor	$[s^{-1}]$
E_A	= Aktivierungsenergie der Reaktion	$[kJ/mol]$
R	= universelle Gaskonstante = 8,3145	$[J/K/mol]$
T	= absolute Temperatur	$[K]$

Für enzymatische Reaktionen gilt dieser Ansatz meist nur in einem sehr begrenzten Temperaturbereich, da die Enzymaktivität durch die Sekundär- und Tertiär- (sowie bei der BFD ebenfalls durch die Quartär-) Struktur bedingt ist. Bei einer wärmeinduzierten Denaturierung und dem damit verbundenen Verlust dieser Strukturelemente verlieren die Enzyme daher bei zu hohen Temperaturen ihre Aktivität. Durch Logarithmieren der Arrheniusbeziehung erhält man eine Gleichung in linearer Form, bei deren Auftragung von $\ln(k_n)$ gegen T^{-1} die Aktivierungsenergie des Reaktionssystems aus der Steigung berechnet werden kann:

$$\ln(k_n) = \ln(A) - \frac{E_A}{RT}$$

Der Temperatureinfluss für die wtBFD wurde bezüglich ihrer Decarboxylase- sowie Carboligaseaktivität bereits von Iding et al. und Greiner et al. untersucht (Abbildung 4.8) (Iding et al. 2000), (Greiner 1999).

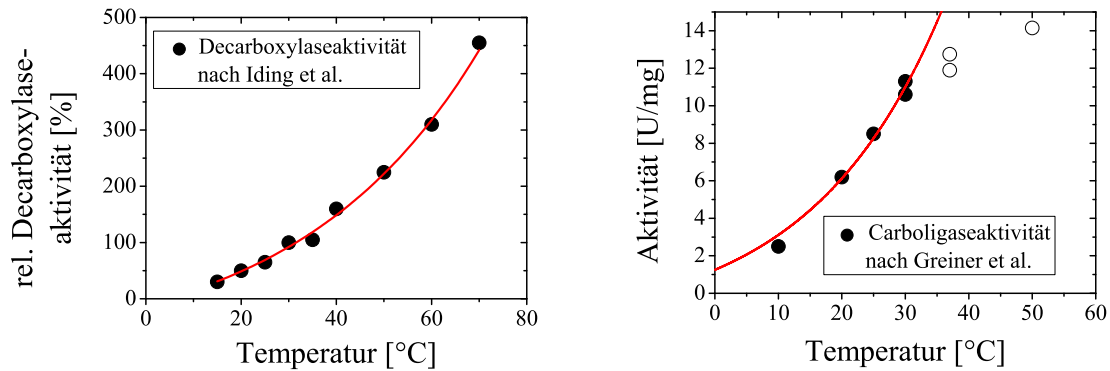


Abbildung 4.8: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Decarboxylierung von Benzoylformiat (links) nach Iding et al. sowie der 2-HPP Bildung nach Greiner et al. (rechts) für wtBFD (für die exponentielle Annäherung wurden nur Messwerte mit voll ausgefüllten Symbolen verwendet) (Iding et al. 2000), (Greiner 1999).

Die Aktivierungsenergie der Decarboxylaseaktivität wurde dabei zu 38 kJ/mol bestimmt, die Aktivierungsenergie der 2-HPP Bildung zu 45 ± 2 kJ/mol (Iding et al. 2000), (Greiner 1999). Zum Vergleich der Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I mit der wtBFD wurde ebenfalls ein Temperaturprofil für die Carboligaseaktivität von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu 2-HPP erstellt (Abbildung 4.9). Zum direkten Vergleich der Temperaturprofile wurden die relativen Aktivitäten (Aktivität bei 30°C = 1) gegen die Temperatur aufgetragen (rechter Abbildungsteil).

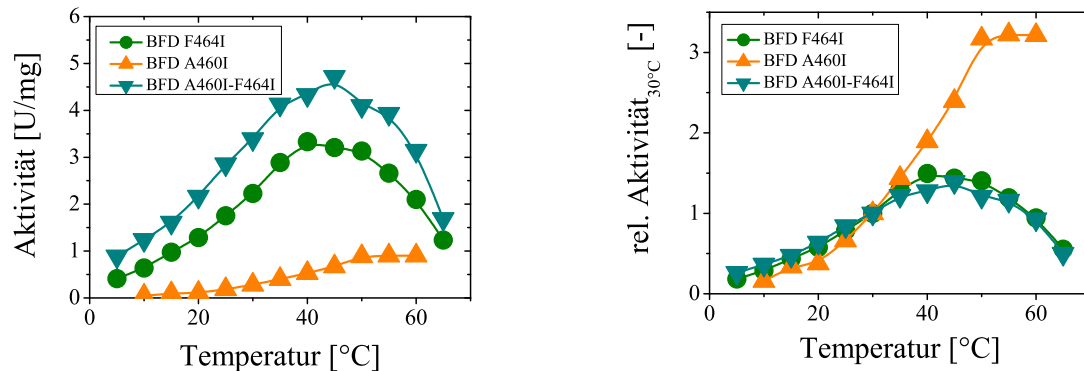


Abbildung 4.9: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der 2-HPP Bildung für wtBFD. Links: absolute Aktivitäten. Rechts: relative Aktivitäten bezogen auf die Standardtemperatur 30°C. Reaktionsbedingungen: 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd in Standardreaktionspuffer: 50 mM KP_i -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), pH 7,5.

Aus der Arrhenius-Auflistung lassen sich Aktivierungsenergien für die Varianten zwischen 40 und 55,6 kJ/mol bestimmen (Abbildung 4.10, Tabelle 4.7). Bezüglich der Größenordnung liegen die BFD F464I und BFD A460I-F464I damit im Bereich, der auch für die wtBFD bestimmt wurde (Greiner 1999). Bei der Variante BFD A460I ist die Aktivierungsenergie um

etwa 10 kJ/mol höher als bei der wtBFD und mit 55,6 kJ/mol sogar über dem Durchschnitt von 40 – 50 kJ/mol, der für die meisten Enzyme beobachtet wird (Bisswanger 2008).

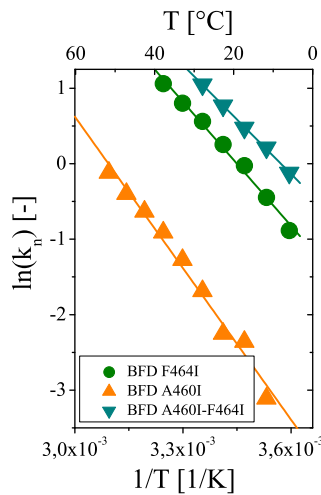


Abbildung 4.10: Auftragung der logarithmierten Aktivität und der reziproken absoluten Temperatur nach Arrhenius zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der 2-HPP Bildung.

Tabelle 4.7: Aktivierungsenergien für die 2-HPP Synthese ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd.

^aNach Greiner et al. (Greiner 1999).

	E_A [kJ/mol]
wtBFD ^a	45 ± 2
BFD F464I	$45,6 \pm 1,8$
BFD A460I	$55,6 \pm 2,5$
BFD A460I-F464I	$40,0 \pm 0,6$

Der Vergleich des Temperaturprofils von wtBFD mit den Phenylalanin-Varianten BFD F464I und BFD A460I zeigt den gleichen Trend einer exponentiellen Aktivitätssteigerung im Temperaturbereich von etwa 30–40°C (siehe Abbildung 4.9). Zwischen 40 und 45°C liegt bei diesen Varianten ein Aktivitätsmaximum, nach dem die Aktivität bei weiterer Erhöhung der Temperatur jedoch wieder abnimmt. Bei der wtBFD konnten Greiner et al. diese Abnahme nicht beobachten, wobei sie eine Aktivitätserhöhung bis 50°C erhielten (Greiner 1999). Der Aktivitätsverlauf der Variante BFD A460I ähnelt sehr stark dem der wtBFD, da für diese Variante ebenfalls kein Aktivitätsverlust für Temperaturen >50°C beobachtet werden konnte (Abbildung 4.9). Besonders deutlich wird dieses unterschiedliche Verhalten der einzelnen Varianten im Vergleich der relativen Aktivitäten, die auf die Aktivität bei 30°C normiert wurden (Abbildung 4.9, rechter Teil). Hier kann das Aktivitätsverhalten der Varianten sehr gut ab einer Temperatur von etwa 35°C unterschieden werden, da sich das Temperaturprofil der BFD A460I deutlich von denen der beiden anderen Varianten abhebt.

Bei der Betrachtung der Aktivitätsassays fällt auf, dass der Aktivitätsverlauf der Varianten unterschiedlich ist. Innerhalb der einzelnen Assays (Dauer bis max. 4 min) kommt es bis 65°C zu keiner Abnahme der Enzymaktivität. Ein Maß dafür sind die Standardabweichungen der linearen Regressionen innerhalb der Assays (Abbildung 4.11). Dies bedeutet, dass die temperaturabhängige Abnahme der Aktivität für Temperaturen > 40°C bei den Varianten BFD F464I und BFD A460I-F464I nicht durch einen Denaturierungsvorgang innerhalb der Assayzeitspanne hervorgerufen wird, sondern dass die tatsächliche katalytische Aktivität bei diesen Temperaturen wieder abnimmt. Eine irreversible Proteindenaturierung würde einer exponentiellen Zerfallsfunktion gehorchen, und somit könnten, wie in den Assays beobachtet, die gebildeten Produktmengen nicht linear zunehmen.

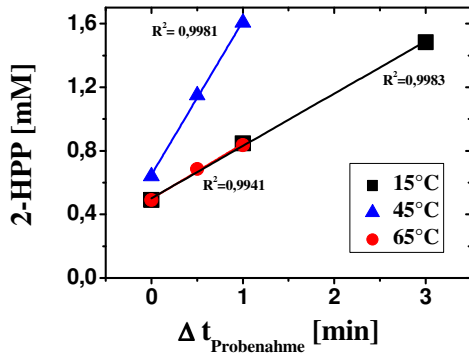


Abbildung 4.11: Vergleich der Aktivitätsassays für die BFD A460I-F464I. Eine Abnahme der Enzymaktivität innerhalb eines Assays kann nicht beobachtet werden. Aufgetragen ist die gebildete Produktmenge an 2-HPP gegen die absoluten Zeitintervalle nach der ersten Probenahme ($t = 0$).

Für die wtBFD und die BFD A460I kann im Gegensatz zu den Varianten BFD F464I und BFD A460I-F464I dieser Aktivitätsverlust nicht beobachtet werden. Ein Vergleich der Mutationen lässt vermuten, dass die Position 464 bzw. deren Phenylalaninaustausch gegen Isoleucin einen entscheidenden Einfluss auf den Temperatureffekt hat. Ein Grund für den Verlust an Aktivität könnte in der Ausrichtung des Cofaktors ThDP liegen. Dieser liegt nicht vollkommen zentral im Proteingerüst sondern am Rande der Proteinstruktur, wo er durch eine Helix abgeschirmt wird. Die Aminosäure Phenylalanin an Position 464 nimmt bei dieser Abschirmung zum Proteinäußeren eine entscheidende Rolle ein, da sie sich direkt zwischen dem Cofaktor und dem äußeren Raum befindet (siehe Abbildung 4.12). Der Austausch des Phenylalanins gegen das sterisch kleinere Isoleucin verringert den Grad dieser Abschirmung. Da es durch die Erhöhung der Temperatur auch zu einer Erhöhung der Energie des Systems und damit zur Erhöhung der molekularen Bewegung kommt, kann eine geringere Abschirmung des Cofaktors eine für die Katalyse weniger geeignete Ausrichtung begünstigen. Im Extremfall würde dies die Diffusion des Cofaktors aus dem Protein bedeuten.

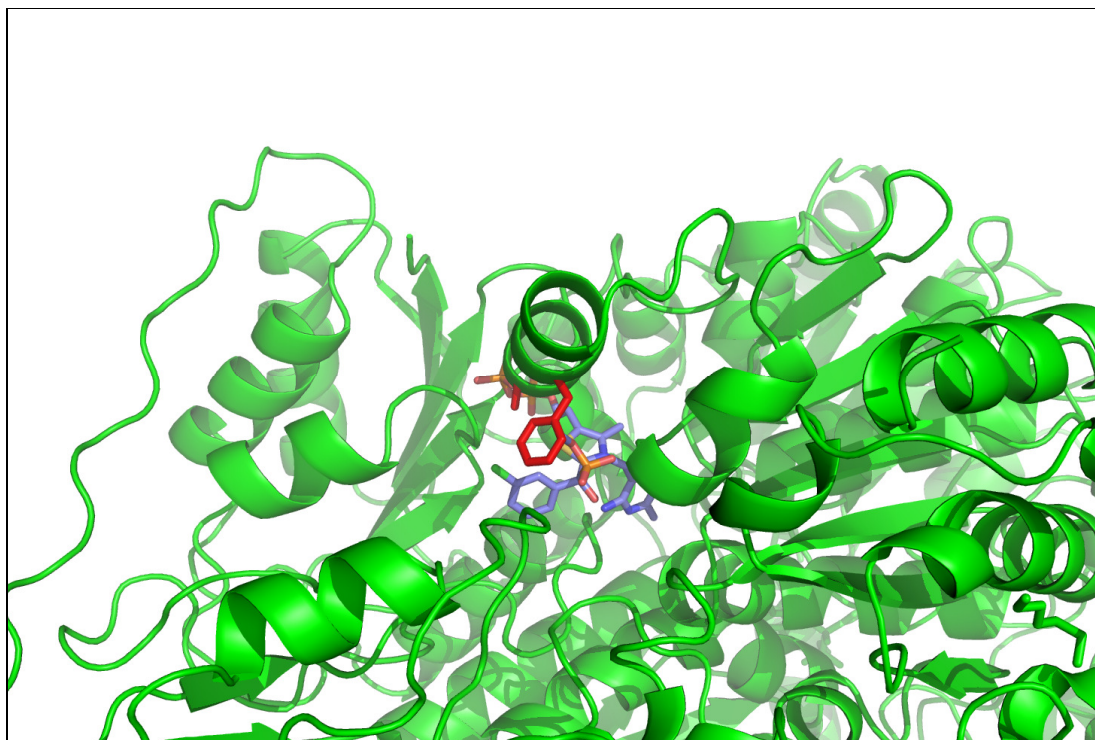


Abbildung 4.12: Aufsicht auf den peripheren Bereich der wtBFD (grün). Der Cofaktor ThDP (blau; hier als kovalenter Komplex mit dem Inhibitor 3-Chloro-MBP) wird vom Proteinrand durch eine Helix abgeschirmt. Die Aminosäure Phenylalanin 464 (rot) ist hieran beteiligt.

Bei der Analyse der *ee*-Werte des gebildeten 2-HPP erkennt man, dass sie mit zunehmender Temperatur abnehmen (siehe Abbildung 4.13). Besonders deutlich geschieht dies bei der Variante BFD A460I-F464I, bei der der *ee*-Wert von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 64\%$ bei 5°C auf 24 % bei 65°C absinkt. Etwas geringer ist dieser Effekt bei der Variante BFD F464I, hier erfolgt eine Abnahme des *ee*-Wertes über den gleichen Temperaturbereich von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 49\%$ auf 29 %. Bei der Variante BFD A460I kann über den Temperaturbereich bis 40°C keine Abnahme des *ee*-Wertes beobachtet werden. Hier bleibt der Wert im Rahmen der Messgenauigkeit bei $ee_{(S)\text{-HPP}} = 12\%$. Erst bei höheren Temperaturen bis 60°C kann eine leichte Abnahme zu $ee_{(S)\text{-HPP}} = 8\%$ beobachtet werden. Dieser Trend zu abnehmenden Enantioselektivitäten mit steigender Temperatur wurde für die wtBFD bereits von Iding et al. gezeigt, jedoch verläuft hier die Abnahme der Enantioselektivität eher moderat wie bei der BFD A460I mit einer Abnahme von $\Delta ee_{(S)\text{-HPP}} = 3\text{--}4\%$ bei einer Temperaturerhöhung von 1 auf 30°C (Iding et al. 2000). Dabei wird beobachtet, dass der Temperatureffekt bezüglich des Enantiomerenüberschusses bei den beiden Varianten mit der Phenylalanin-Mutation anders (in diesem Fall ausgeprägter) ist, als bei der wtBFD und der BFD A460I.

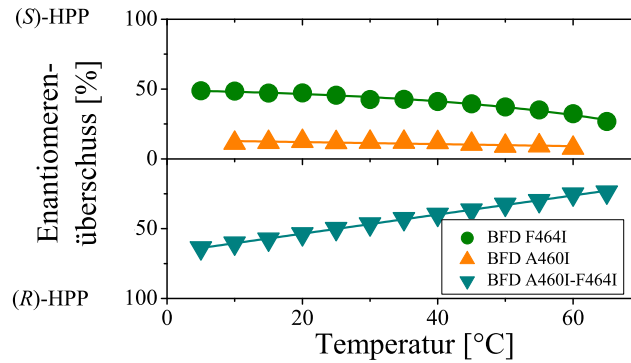


Abbildung 4.13: Einfluss der Temperatur auf den Enantiomerenüberschuss der 2-HPP Bildung für die BFD-Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Reaktionsbedingungen: 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd in Standardreaktionspuffer: 50 mM KP_i -Puffer (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), pH 7,5.

4.7 Kurzzusammenfassung

Zur Charakterisierung der BFD Varianten lassen sich folgende Punkte zusammenfassen:

- Bei der Stabilitätsüberprüfung im verwendeten Phosphatpuffersystem konnte über einen Zeitraum von mehr als 13 Tagen keine Abnahme der Enzymaktivität festgestellt werden.
- Die BFD katalysierte Bildung von 2-HPP ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd folgt formal einer Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik, die für den Konzentrationsbereich $>1\text{ M}$ Acetaldehyd sehr gut durch eine Substratüberschussinhibierung simuliert werden kann.
- Durch die Erhöhung der Benzaldehydkonzentration bei der 2-HPP Bildung erfolgt eine Verschiebung der Enantioselektivität zu Gunsten des gebildeten (R)-HPPs.
- Der Enantiomerenüberschuss bei der 2-HPP Synthese wird besonders bei den Varianten mit Mutation signifikant durch den pH-Wert beeinflusst, wobei höchste Selektivitäten für das gebildete (S)-HPP im leicht sauren Bereich zwischen pH 6,5-7,0 erzielt werden. Die Berechnung der proteinogenen Säurekonstanten relevanter Aminosäuren legt nahe, dass besonders die Aminosäure His281 an diesem Effekt beteiligt sein könnte.
- Für die BFD-Varianten mit Phenylalaninsubstitution lässt sich durch Temperaturerhöhung die Aktivität der 2-HPP Bildung bis etwa 40°C steigern, wobei sie bei einer

weiteren Temperaturerhöhung wieder erniedrigt wird. Für die wtBFD sowie die BFD A460I lässt sich eine Aktivitätserhöhung bis etwa 60°C beobachten.

- Der Enantiomerenüberschuss des gebildeten 2-HPPs verringert sich bei allen Varianten mit steigender Synthesetemperatur.

5. Einfluss des hydrostatischen Drucks*

5.1 Einfluss hoher Drücke auf Proteine

In der artifiziellen Biokatalyse spielt der Druck des Reaktionssystems bislang eine äußerst untergeordnete Rolle, da nahezu alle Reaktionen bei Atmosphärendruck durchgeführt werden. Dies ist nicht verwunderlich, da es letztendlich einer der großen Vorteile der Biokatalyse im Vergleich zur herkömmlichen chemischen Synthese ist, Reaktionen unter physiologischen Bedingungen durchführen zu können. Einen Spezialfall bilden die Reaktionen, bei denen das Reaktionsmedium einen erhöhten Druck bedingt. Dies sind z.B. superkritische Medien wie superkritisches Kohlenstoffdioxid (scCO_2). Superkritische Flüssigkeiten bieten bei der Katalyse oftmals den Vorteil, dass die Produktaufarbeitung erleichtert wird und unter superkritischen Bedingungen oftmals eine höhere Substratlöslichkeit als in wässrigen Medien vorliegt. scCO_2 kann somit zugleich als Lösungs- wie auch Extraktionsmittel dienen (Eggers, Jaeger 2003). In der Natur existieren Lebensformen, deren Biotope extremen Drücken ausgesetzt sind, wie beispielsweise Mikroorganismen der Tiefsee (Antranikian 1998). Diese müssen zwangsläufig ihre Stoffwechselreaktionen unter hohen Drücken katalysieren, wobei diese bislang nicht unter den entsprechenden Bedingungen analysiert werden konnten. Hohe Drücke werden industriell in Kombination mit Proteinen bzw. Mikroorganismen in der Regel nur zu deren Denaturierung bzw. Abtötung wie z.B. im Hochdrucksterilisationsverfahren eingesetzt.

Untersuchungen zum Einfluss des Drucks auf Proteine sind dabei zahlreich, die besonders anschaulich in den Reviews von Heremans und Smeller sowie Gross und Jaenicke wiedergegeben werden (Heremans 1982), (Heremans, Smeller 1998), (Gross, Jaenicke 1994). Proteine zeigen dabei ein individuelles Verhalten gegenüber einer Druckerhöhung des Umgebungsmediums, das vor allem in strukturellen Veränderungen sowie bei Enzymen auch in Aktivitätsveränderungen besteht. Ein Hauptanwendungsfeld des hydrostatischen Drucks in der Proteinforschung bilden druckinduzierte Konformationsänderungen. Die Anwendung hoher Drücke reicht dabei von der Bestimmung einfacher Deformationskinetiken zur Proteindenaturierung bis hin zur kompletten Proteinhydrolyse (Marchal et al. 2005), (Vazquez-Perez, Fernandez-Velasco 2007), (van der Plancken et al. 2004). Bei einigen enzymatischen Verfahren, die höhere Temperaturen benötigen hat man herausgefunden, dass eine gleichzeitige Erhöhung des Drucks die Stabilität der Enzyme verbessert. Bei der Stärkespaltung durch Amylasen werden bei der Produktion von Fructose-Glucose-Sirup (High Fructose Corn Sirup; HFCS) Temperaturen von mehr als 100°C eingesetzt (Liese et al. 2006), wobei eine gleichzeitige Druckerhöhung bis 200 MPa die Stabilität der Amylasen erheblich erhöht (Buckow et al. 2007).

*Auszüge dieses Kapitels sind veröffentlicht in:

Marco Berheide, Stephanie Peper, Selin Kara, Wei Sing Long, Steffen Schenkel, Martina Pohl, Bernd Niemeyer, Andreas Liese; in: Influence of the hydrostatic pressure and pH on the asymmetric 2-hydroxyketone formation catalyzed by *Pseudomonas putida* benzoylformate decarboxylase and variants thereof. 45

Veröffentlicht in: Biotechnology and Bioengineering; DOI: 10.1002/bit.22650

Aus ökonomischen Gründen wird auf solch eine Druckerhöhung allerdings verzichtet. Für die klassisch präparative Enzymkatalyse in wässrigen Medien unter Anwendung hoher hydrostatischer Drücke gibt es bislang keine Veröffentlichungen. Ein Beispiel für eine biokatalytische Umsetzung in organischen Lösungsmitteln unter Anwendung hoher Drücke ist die von Kahlow et al. berichtete Veresterung von Menthol mit Propionsäureanhydrid in Chloroform durch *Candida rugosa* Lipase (Kahlow et al. 2001). Hier konnte durch Erhöhung des Drucks eine Abnahme der Enantioselektivität sowie Aktivität mit zunehmendem Druck beobachtet werden (Kahlow et al. 2001).

5.2 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf die Benzoylformiatdecarboxylase

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unter Anwendung hoher Drücke wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Bernd Niemeyer an der Helmut-Schmidt-Universität, Universität der Bundeswehr im Institut für Verfahrenstechnik, insbesondere Stofftrennung, durchgeführt. Für die Versuche wurde eine Hochdruckanlage verwendet, die primär aus miteinander verbundenen Edelstahlkapillaren sowie einer Boxerspindelpresse besteht (Niemeyer, Jansen 2007), (Jansen, Niemeyer 2005). Durch diese kann das Reaktionsmedium innerhalb des Reaktors zirkuliert werden, wodurch eine Durchmischung ohne zusätzliche Misch- bzw. Rührvorrichtung ermöglicht wird. Die Anlage kann durch eine Hochdruckmembranpumpe bis zu einem Betriebsdruck von 380 MPa betrieben werden (Jansen, Niemeyer 2005), (Niemeyer, Jansen 2007). Das Fließschema ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Für die Reaktionen werden zuerst die Substratvorlagebehälter mit Substratpuffer befüllt und anschließend die gesamte Anlage bis auf die Enzymvorlage mit Substratpuffer gespült und befüllt. Die BFD wird in Puffer ohne Substrate gelöst und in die Enzymvorlage gefüllt. Die Ventile an der Enzymvorlage bleiben dabei geschlossen. Der gewünschte Druck wird mit Hilfe der Hochdruckmembranpumpe eingestellt und das System danach hinter den Substratvorlagebehältern geschlossen. Durch die Boxerspindelpresse wird der Substratpuffer in der Anlage zirkuliert und zum Starten der Reaktion werden die Ventile der Enzymvorlage geöffnet. Gleichzeitig wird die parallel zur Enzymvorlage verlaufende Spülschleife geschlossen. Die reaktorspezifischen Parameter sind in Tabelle 5.1 angegeben.

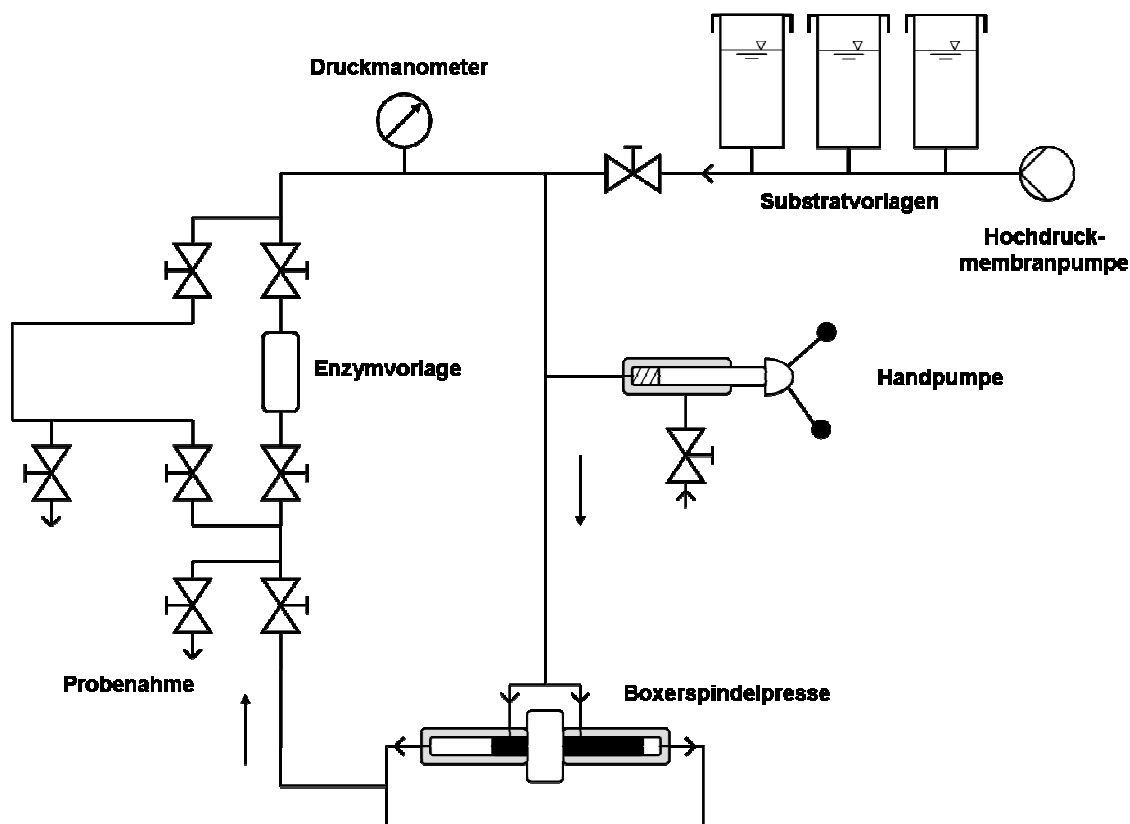


Abbildung 5.1: Fließschema der Hochdruckzirkulationsanlage im Institut für Verfahrenstechnik, insbesondere Stofftrennung, nach Jansen et al. und Niemeyer et al. (Jansen, Niemeyer 2005), (Niemeyer, Jansen 2007). Der Druck kann mittels einer Hochdruckmembranpumpe sowie einer Handpumpe eingestellt werden.

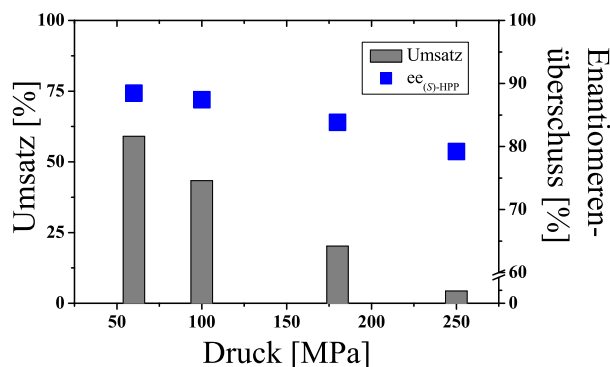
Tabelle 5.1: Reaktorspezifische Parameter der Hochdruckzirkulationsanlage.

Druckbereich Hochdruckmembranpumpe	0-380 MPa
Reaktorvolumen	37,5 mL
Volumen Enzymvorlage	1,7 mL
Volumen Substratvorlagen	3*50 mL
Pumprate Boxerspindelpresse	8,75 mL/min

Zur Überprüfung der Reaktivität unter steigendem hydrostatischem Druck wurde die 2-HPP Bildung aus 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd mit der wtBFD überprüft. Hierzu wurden jeweils 55 U wtBFD in der Enzymvorlage vorgelegt und der Hochdruckreaktor für 20 min betrieben. Nach den Probenahmen wurden die Reaktionslösungen auf Umsatz und Enantiomerenüberschuss des gebildeten 2-HPP untersucht (siehe Abbildung 5.2).

Abbildung 5.2:

Umsätze und Enantiomerenüberschüsse für die wtBFD katalysierte (*S*)-HPP Bildung bei steigendem hydrostatischem Druck. Reaktionsbedingungen: 30 mM Benzaldehyd, 300 mM Acetaldehyd, 20 min, 100 mM KP_i (2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP), Umgebungstemperatur (20–24°C), pH 8,0.



Deutlich erkennbar ist der abnehmende Umsatz für jeweils 20 min Reaktionszeit mit steigendem Druck. Bei 60 MPa konnte ein Umsatz von 59 % erreicht werden, der jedoch signifikant auf 4,4 % bei 250 MPa abfällt. Der Enantiomerenüberschuss des gebildeten (*S*)-HPP verringert sich dabei ebenfalls von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 89\%$ bei 60 MPa auf $ee_{(S)\text{-HPP}} = 79\%$ bei 250 MPa. Im Vergleich mit der existierenden Literatur zu anderen Systemen korreliert dieses Ergebnis sehr gut, da dieser Trend auch in dem zuvor beschriebenen Reaktionssystem zur Veresterung von Menthol beschrieben wurde (Kahlow et al. 2001).

Da Benzoylformiatdecarboxylasen bislang noch nicht unter hohen hydrostatischen Drücken untersucht wurden, wurden vier weitere Versuchsreihen zum Druckeinfluss auf die Enantioselektivität der 2-HPP Bildung für alle BFD-Varianten durchgeführt. Auch hier wurden 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd als Substrate eingesetzt. Durch die Kenntnis der Aktivitätsabnahme unter hohen Drücken (siehe Abbildung 5.2) für die wtBFD wurden für diese Versuche die Reaktionszeiten für die wtBFD und die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I abgeschätzt, um in etwa gleiche Umsätze von 3 – 6 % zu erzielen. Für die wtBFD konnten die Ergebnisse zur Abnahme des Enantiomerenüberschusses für das gebildete (*S*)-HPP sehr gut reproduziert werden, wobei eine wiederholte Abnahme von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 90\%$ bei 0,1 MPa zu $ee_{(S)\text{-HPP}} = 79\%$ bei 250 MPa erreicht wurde (siehe Abbildung 5.3). Diese ee -Veränderung konnte darüber hinaus auch für alle drei Varianten beobachtet werden, wobei die Veränderung des ee -Wertes noch stärker ist. Für die Variante BFD F464I verringert sich der ee von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 49\%$ bei 0,1 MPa auf $ee_{(S)\text{-HPP}} = 26\%$ bei 255 MPa, womit der Effekt in etwa doppelt so groß ist wie für die wtBFD. Für die Variante BFD A460I zeigt sich ein besonderer Fall, da bei Atmosphärendruck (*S*)-HPP mit einem Enantiomerenüberschuss von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 24\%$ gebildet wird und bei Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf 250 MPa eine Inversion des bevorzugt gebildeten Enantiomers hin zum (*R*)-HPP mit einem $ee_{(R)\text{-HPP}} = 17\%$ erfolgt. Durch lineare Regression erhält man einen Druck zu ca. 145 MPa, bei dem 2-HPP als Racemat gebildet wird. Für die Variante BFD A460I-F464I zeigt sich ebenfalls eine Verschiebung des ee zu niedrigeren $ee_{(S)\text{-HPP}}$ – Werten bzw. hier zu höheren $ee_{(R)\text{-HPP}}$ -Werten. Hier erhöht sich der Enantiomerenüberschuss von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 51\%$ bei 0,1 MPa auf $ee_{(R)\text{-HPP}} = 79\%$ bei 280 MPa.

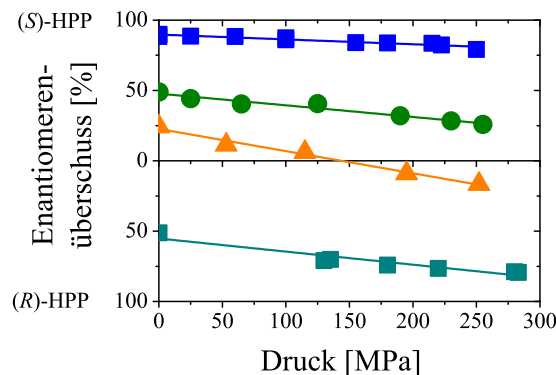


Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Enantiomerenüberschüsse der Produkte (S)- und (R)-HPP vom angewandten hydrostatischen Druck für wtBFD (blau), BFD F464I (grün), BFD A460I (gelb) und BFD A460I-F464I (türkis). Reaktionsbedingungen: 30 mM Benzaldehyd, 300 mM Acetaldehyd, 3-6 % Umsatz, 100 mM KP_i , (2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP), Umgebungstemperatur (20-24°C), pH 8,0.

Neben der bereits bekannten Abnahme des Enantiomerenüberschusses durch Anwendung hoher hydrostatischer Drücke zeigt sich für dieses System ein bislang noch nicht beschriebener Effekt der druckabhängigen Inversion des Enantiomerenüberschusses eines enzymatisch gebildeten Produktes katalysiert durch die BFD A460I sowie der druckabhängigen Erhöhung bei der BFD A460I-F464I. Bei den bislang in der Literatur beschriebenen Verringerungen des ee bei Druckerhöhung war keine Aussage darüber möglich, ob es sich um einen rein racemisierenden Prozess handelt oder nicht. Durch die Beispiele der BFD A460I und BFD A460I-F464I kann nun belegt werden, dass es sich zumindest bei der BFD nicht um einen solch rein racemisierenden Effekt handelt. Es zeigt sich, dass die Bildung der Enantiomere unterschiedlich stark durch den Druck diskriminiert wird und zwar über die Bildung eines Racemates hinaus.

Zur weiteren Charakterisierung der beobachteten Effekte unter hohen Drücken wurde die Variante BFD A460I-F464I für unterschiedliche Zeitperioden bei 250 MPa inkubiert und anschließend die Aktivität sowie die Enantioselektivität unter standardisierten Bedingungen bei Atmosphärendruck überprüft. Durch die Inkubation bei 250 MPa zeigt sich kein Aktivitätsverlust sowie keine Veränderung des Enantiomerenüberschusses des gebildeten (R)-HPP (siehe Abbildung 5.4). Die Aktivität bleibt im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit konstant bei $1,6 \pm 0,2$ U/mg mit einem ebenfalls konstanten Enantiomerenüberschuss von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 49\%$. Die Effekte, die unter Hochdruck zu beobachten sind scheinen damit explizit druckabhängig zu sein, da eine vorzeitige Hochdruckbehandlung (bei 250 MPa) der BFD keinen späteren Effekt mehr bei Atmosphärendruck zeigt.

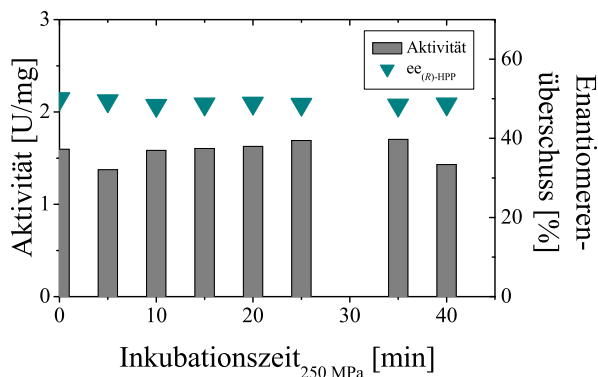


Abbildung 5.4: Aktivität sowie Enantioselektivität der (*R*)-HPP Bildung durch die BFD A460I-F464I nach Druckinkubation bei 250 MPa. Reaktionsbedingungen: 30 mM Benzaldehyd, 300 mM Acetaldehyd, 100 mM KP_i , (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+}), 30°C, pH 8,0.

Der Nachweis der Reversibilität der Druckeffekte kann bezüglich der Aktivität nur indirekt erfolgen, da lediglich die Aktivitäten vor und nach der Druckinkubation der BFD sowie die unterschiedlichen Umsätze bei verschiedenen Drücken miteinander verglichen werden können. Mit der Hochdruckanlage wie sie hier verwendet wurde, sind keine Reaktionen bei Normaldruck durchführbar.

Für die Enantioselektivität ergibt sich hingegen die Möglichkeit eines direkten Nachweises zur Reversibilität, da die Enantioselektivität der 2-HPP Bildung vom Druck abhängig ist. Verfolgt man demnach eine Umsatzkurve mit einem Druck-Stufengradienten von höherem zu niedrigerem Druck, so muss sich der Enantiomerenüberschuss bei Reversibilität nach dem Druck-Stufengradienten verändern. Da bei höherem Druck mehr (*R*)-HPP gebildet wird im Vergleich zu niedrigerem Druck, muss nach dem Druck-Stufengradienten (also dann bei niedrigerem Druck) wieder mehr (*S*)-HPP gebildet werden und somit der Enantiomerenüberschuss zu Gunsten des (*S*)-HPP ansteigen.

Für die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I sowie BFD A460I-F464I wurden jeweils Druck-Stufengradientenversuche durchgeführt, wobei die ersten 5 % Umsatz unter Hochdruck (HD) erzielt wurden und danach die Reaktionssysteme unmittelbar auf Atmosphärendruck (Atm) dekomprimiert wurden (siehe Abbildung 5.5). Da bei den Probenahmen unter Hochdruck der hydrostatische Druck des Systems drastisch abfällt, kann für den Umsatz unter Hochdruck jeweils nur ein Wert angegeben werden. Dieser ist gleichzeitig der Endwert für den Hochdruckumsatz (schwarz umrandete Symbole). Nach der Dekompression werden die Reaktionssysteme weiter bei Atmosphärendruck verfolgt und in regelmäßigen Abständen Proben analysiert (halb ausgefüllte Symbole). Zum Vergleich von Druck-Stufengradientenversuchen und herkömmlichen Versuchen sind Umsatzkurven bei Laborbedingungen (ausschließlich Atmosphärendruck) zum Vergleich abgebildet (nicht ausgefüllte Symbole).

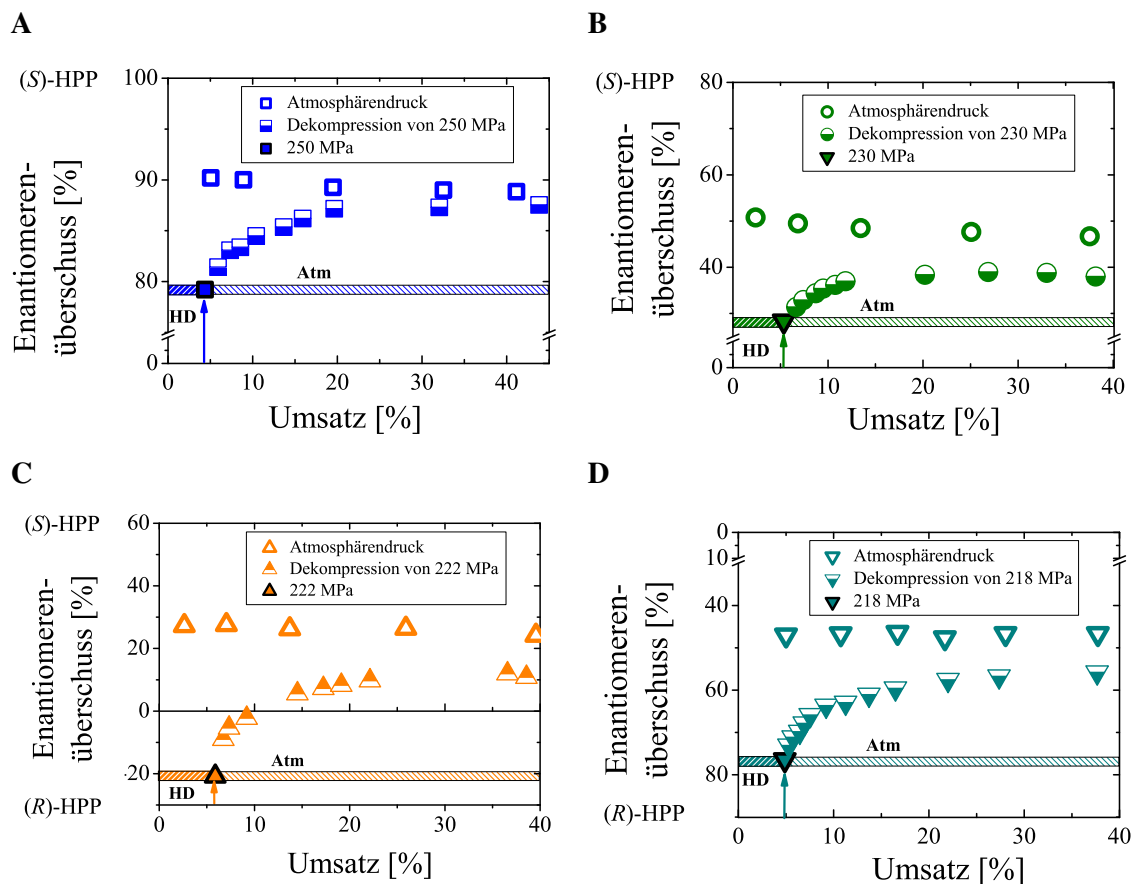


Abbildung 5.5: Druck-Stufengradient Versuche zum Nachweis der Reversibilität des Druckeinflusses auf die Enantioselektivität der 2-HPP Bildung für wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die ersten 5 % Umsatz wurden unter Hochdruck (HD) erzielt (schwarz umrandete Symbole) und die Systeme danach auf Atmosphärendruck (Atm) dekomprimiert (halb ausgefüllte Symbole). Zum Vergleich sind Umsatzkurven bei ausschließlich Atmosphärendruck abgebildet (nicht ausgefüllte Symbole).

Nach der Dekompression der Reaktionssysteme ist für die wtBFD sowie für alle drei Varianten eine eindeutige Veränderung des Enantiomerenüberschusses mit weiterlaufendem Umsatz zugunsten des (S)-HPP zu erkennen. Dies beweist direkt eine Relaxation vom „Hochdruckzustand“ zurück zum „Atmosphärendruckzustand“ bezüglich der Enantioselektivität. Vergleicht man darüber hinaus die Enantiomerenüberschüsse unter Hochdruck (etwa 5 % Umsatz) mit denen bei Atmosphärendruck und mittelt sie, so erhält man in etwa die Enantiomerenüberschüsse der Umsatzkurve nach Dekompression bei etwa 10 % Gesamtumsatz. Dies entspricht also genau einer Mischung aus 5 % Umsatz bei jeweils Hochdruck und Atmosphärendruck (siehe Tabelle 5.2). Da diese Umsätze in einer Zeitperiode von einigen Minuten (bei der BFD A460I-F464I z.B. 5 % Umsatz unter HD nach 21 min; 10 % Umsatz nach Dekompression nach 36 min; $\rightarrow \Delta t = 15 \text{ min}$) geschehen, muss die Relaxation entsprechend schneller verlaufen ($< 5 \text{ min}$), da es sonst nicht zu den genauen ee -Mittelwerten zwischen Hochdruck und Atmosphärendruck kommen würde.

Tabelle 5.2: Übersicht der Daten nach dem Hochdruckumsatz sowie der Daten für die Umsatzkurven nach der Dekompression und unter reinem Atmosphärendruck für Umsätze, die in etwa zweimal dem Hochdruckumsatz entsprechen.

	Hochdruck			nach Dekompression			Atmosphärendruck	
	Zeit [min]	Umsatz [%]	$ee_{2\text{-HPP}}$ [%]	Zeit [min]	Umsatz [%]	$ee_{2\text{-HPP}}$ [%]	Umsatz [%]	$ee_{2\text{-HPP}}$ [%]
wtBFD	20	4,4	79 (S)	34	8,6	83 (S)	8,9	90 (S)
BFD F464I	39	5,4	28 (S)	93	10,8	36 (S)	13,4	49 (S)
BFD A460I	37	5,9	21 (R)	60	9,2	2 (R)	13,7	26 (S)
BFD A460I-F464I	21	4,9	76 (R)	36	9,2	64 (R)	10,8	47 (R)

Für den Einfluss des Drucks auf die BFD katalysierte 2-HPP Bildung lässt sich somit zusammenfassen, dass bei den Umsetzungen unter Hochdruck zum Einen die katalytische Aktivität abnimmt und zum Anderen der Enantiomerenüberschuss bezüglich des gebildeten (S)-Enantiomers abnimmt bzw. des (R)-Enantiomers zunimmt. Beide Effekte sind für den betrachteten Druckbereich bis etwa 250 MPa reversibel, was für die Aktivität indirekt und für die Enantioselektivität direkt nachgewiesen werden konnte.

Führt man Reaktionen in wässrigen/gepufferten Systemen unter hohen Drücken durch, so muss berücksichtigt werden, dass der pH-Wert selbst eine Funktion des Drucks ist. Dies liegt zum Einen an der Druck abhängigen Eigendissoziation des Wassers in H^+ und OH^- sowie bei gepufferten Systemen zusätzlich an der Dissoziation der konjugierten Säure-Base Paare der Puffersubstanzen (Kitamura, Itoh 1987). Experimentell sind pH Werte bei hohen Drücken nur schwierig zu bestimmen, da die oftmals eingesetzten Indikatoren selbst Dissoziationsabhängigkeiten vom Druck zeigen. Phosphatpuffer sind in einem besonderen Maße vom Druck abhängig, da Phosphorsäure drei potentielle Deprotonierungsstufen von H_3PO_4 zu PO_4^{3-} und $3H^+$ hat. Für den Einsatz von Phosphatpuffern finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich der pH-Verschiebung bei hohen Drücken, die von $\Delta pH = -3,14/GPa$ bis $\Delta pH = -0,37/GPa$ reichen (Neuman et al. 1973), (Raghuraman et al. 2006). Einigkeit besteht jedoch darin, dass der pH-Wert bei steigendem Druck in Phosphatpuffern abnimmt. Vergleicht man dementsprechend die Abhängigkeit der Enantioselektivität der 2-HPP Bildung vom Druck mit der Abhängigkeit vom pH-Wert, so erkennt man zwei gegenläufige Tendenzen: durch die Erniedrigung des pH-Wertes wurden tendenziell bei der wtBFD sowie den Varianten BFD F464I und BFD A460I höhere $ee_{(S)\text{-HPP}}$ -Werte erreicht. Durch die Erhöhung des Drucks (und einer damit einhergehenden Verringerung des pH-Wertes) wurden hingegen niedrigere $ee_{(S)\text{-HPP}}$ -Werte erzielt. Indirekt beweist dies, dass beide Effekte unabhängig voneinander existieren.

Die Verringerung des pH-Wertes durch die hohen Drücke kann allerdings Einfluss auf die Aktivität der BFD haben, da diese im leicht sauren Bereich stark abnimmt (Iding et al. 2000). Eine weitere Erklärung der Aktivitätsabnahme kann allerdings auch strukturelle Ursachen haben, die durch den Druck hervorgerufen werden. Triebkraft für Veränderungen in

Gleichgewichtsreaktionen unter Druck ist immer die Verringerung des Reaktionsvolumens ΔV nach der Gleichung:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = -\frac{\Delta V}{RT}$$

Für ein Protein in wässriger Lösung hat dies vor allem zwei Effekte: zum Einen kann Wasser in die Proteinstruktur (besonders Hohlräume) eindringen, wobei das resultierende Gesamtvolumen geringer ist im Vergleich zu den beiden Einzelvolumina aus Proteinstruktur und Wasser. Zum anderen besteht die Möglichkeit einer Kompression der Proteinstruktur selbst (Heremans, Smeller 1998), (Collins et al. 2005). Eine durch Druck induzierte Wasseransammlung einer hydrophilen Proteintasche in T4 Lysozym konnte bislang durch Hochdruckkristallisation nachgewiesen werden (Collins et al. 2005). In einem Review von Marchal et al. zu Konformationsstudien unter Hochdruck wird als letztendlich zu beobachtender Effekt des Drucks die Fehl- bzw. Umordnung der Proteinstruktur genannt (Marchal et al. 2005). Ursache dieser Umordnung sind unter anderem die beiden oben genannten Effekte. Je nachdem, wie hoch der angewandte Druck ist, erfolgen diese strukturellen Umordnungen reversibel bzw. bei extremen Drücken irreversibel als vollständige Denaturierung. Von einer reversiblen Enzyminaktivierung bis 400 MPa wird von Tschirret-Guth et al. für ein thermophiles Cytochrom P450 aus *Sulfolobus solfataricus* berichtet (Tschirret-Guth et al. 2001). In beiden Fällen haben jedoch die Effekte und die damit verbundenen strukturellen Änderungen des Proteins einen signifikanten Einfluss auf alle Strukturelemente, zu denen generell auch die Substratbindungstaschen gehören. Dies übertragen auf die BFD bedeutet, dass eine Ansammlung von Wasser in der *active site* (beispielsweise in der von Pohl et al. beschriebenen (S)-Pocket (Knoll et al. 2006)) sowie auch eine Kompression oder Deformation dergleichen, entscheidende Veränderungen für die Substratbindung hervorrufen können, sei es eine Veränderung der Polarität oder des Volumens der *active site*. Eine logische Schlussfolgerung dessen ist auch eine diversifizierte Ausrichtung der Substrate zum Cofaktor und somit auch eine Veränderung der Aktivität. Betrachtet man die Enzyme als durch die Evolution maßgeschneiderte und perfektionierte Systeme, so erscheint ein Aktivitätsverlust durch Modifikation von Strukturelementen (hier hervorgerufen durch den Druck) als durchaus plausibel. Teilt man die 2-HPP Bildung weiter in zwei Unterreaktionen ein, von denen die eine (S)-HPP und die andere (R)-HPP bildet, so können beide Reaktionswege unterschiedlich stark durch die druckinduzierte Strukturänderung diskriminiert werden, was letztendlich eine Veränderung des Enantiomerenüberschusses zur Folge hat.

Betrachtet man die Kompressibilität des Reaktionsmediums, so muss auch eine daraus hervorgerufen Substratkonzentrationserhöhung berücksichtigt werden. Für wässrige Lösungen ergibt sich eine Volumenreduktion bei 250 MPa von knapp 10 % im Vergleich zum Atmosphärendruck (siehe Abbildung 5.6). Dies bedeutet gleichzeitig auch eine Erhöhung der

Substratkonzentration um 10 %. Aus Abbildung 4.6 geht hervor, dass bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von 30 mM Benzaldehyd um 10 % keine relevante Erhöhung der Enantioselektivität des gebildeten (*R*)-HPP erfolgt. Somit spielt die Konzentrationserhöhung durch Kompression des Reaktionsmediums keine Rolle.

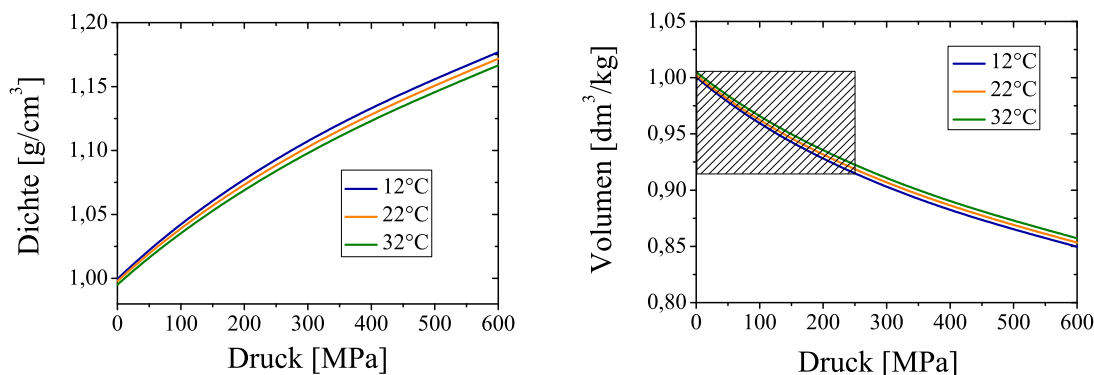


Abbildung 5.6: Einfluss des Drucks auf die Dichte und Volumenveränderung von wässrigen Medien (der für die Veruche signifikante Bereich ist schraffiert). Die Grafiken wurden erstellt aus Daten der *International Association for the Properties of Water and Steam: Formulation 1995* nach Wagner und Pruß (Wagner, Pruß 2002).

5.3 Kurzzusammenfassung

Für den Einfluss des hydrostatischen Drucks ergeben sich folgende Ergebnisse für die durch die BFD-Varianten katalysierte asymmetrische 2-HPP Bildung:

- Die Carboligaseaktivität der BFD-Varianten bezüglich 2-HPP nimmt mit zunehmendem hydrostatischem Druck im Bereich bis 250 MPa stark ab.
- Durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks verschiebt sich die Enantioselektivität des gebildeten 2-HPP zugunsten des (*R*)-HPP, wobei sich für die Variante BFD A460I eine Inversion und für die Variante BFD A460I-F464I eine ausschließliche Erhöhung der Enantioselektivität ergibt.
- Der Effekt des hydrostatischen Drucks auf die Aktivität und Enantioselektivität sind reversibel und nur unter erhöhtem Druck zu beobachten.

6. Reversibilität des Reaktionssystems

6.1 C-C Bindungsbildung ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd

Bei der BFD katalysierten Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd entstehen neben dem Hauptprodukt 2-HPP auch geringe Mengen der Nebenprodukte Benzoin und Acetoin (siehe Abbildung 6.1)(Siegert et al. 2005). Der Wechsel in der Enantioselektivität des gebildeten 2-HPP von einer hohen (*S*)-Selektivität bei der wtBFD über verminderte (*S*)-Selektivität bei den Varianten BFD F464I und BFD A460I hin zu einer hohen (*R*)-Selektivität bei der Variante BFD A460I-F464I kann bei der Bildung von Benzoin und Acetoin hingegen nicht beobachtet werden.

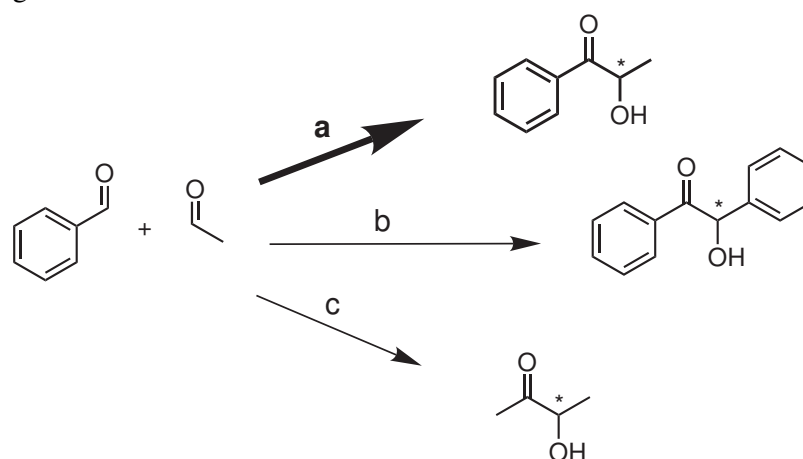


Abbildung 6.1: Bildung der chiralen 2-Hydroxyketone 2-HPP (a), Benzoin (b) und Acetoin (c) ausgehend von den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd.

Das gebildete Benzoin wird bei allen bislang untersuchten BFD Varianten nahezu ausschließlich in (*R*)-Konfiguration gebildet und auch beim Acetoin überwiegt das (*R*)-Enantiomer (siehe Tabelle 4.9) (Siegert et al. 2005), (Siegert 2000). Da Acetoin auf Grund des niedrigen Extinktionskoeffizienten mittels UV-Detektion quantitativ nur schwierig zu bestimmen ist und nur in sehr geringen Mengen gebildet wird, wird auf dessen Bestimmung im Folgenden verzichtet und nur die Bildung von 2-HPP und Benzoin betrachtet.

6.2 Carboligation mit BFD-Varianten

6.2.1 Carboligation der wtBFD

Für den Reaktionsverlauf mit der wtBFD wurden in einem 2 mL Ansatz 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd als Substrate eingesetzt sowie 425 U_{2-HPP} wtBFD.

Im Reaktionsverlauf ist die rasche Bildung des Produktes 2-HPP sowie die Abnahme des Substrates Benzaldehyd deutlich erkennbar, wobei nach etwa 20 Minuten Vollumsatz des

Benzaldehyds erreicht wird. Typisch für den Reaktionsverlauf ist die Bildung des Nebenproduktes (*R*)-Benzoin, dessen Konzentration im weiteren Reaktionsverlauf jedoch wieder abnimmt und nach 2 h Reaktionsdauer nicht mehr im Reaktionsansatz detektiert werden kann. Bei genauerer Betrachtung des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP fällt auf, dass dieser im Zeitraum bis zum Vollumsatz bei einem nahezu konstanten Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 90\%$ bleibt, bei deutlich längerer Reaktionsführung jedoch signifikant abfällt. Nach 146 h Reaktionsdauer wurde hier ein Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 35\%$ erreicht.

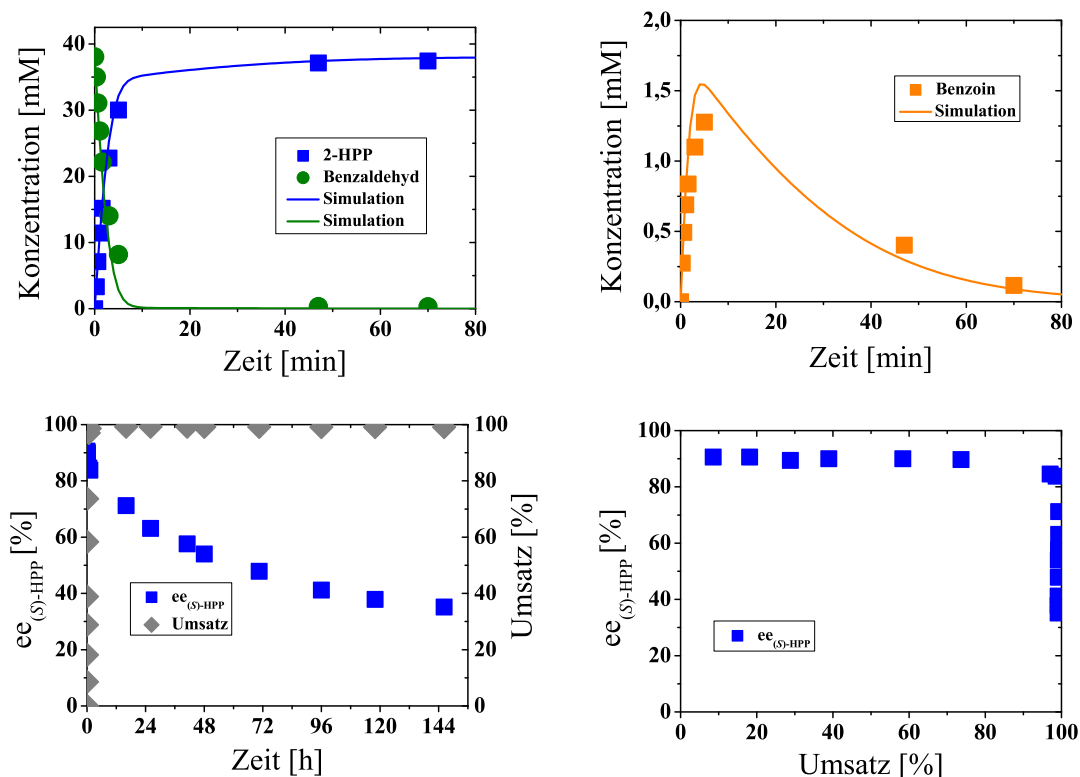


Abbildung 6.2: Reaktionsverlauf der Carbolygation von 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd durch wtBFD (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+} , 50 mM TEA, 25°C, pH 7,5). Oben: Konzentrations-/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (*R*)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.

Die Konzentrationsverläufe von Benzaldehyd, 2-HPP sowie Benzoin zeigen deutlich, dass es neben der Bildung von 2-HPP und Benzoin auch zur Spaltung von Benzoin kommt (Nachweis siehe Kapitel 6.3). Auf Grund der bereits bekannten Kinetik der BFD wird daher für die Bildungsgeschwindigkeit von 2-HPP ($v_{2\text{-HPP}}$) aus Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA) angenommen:

$$v_{2-HPP} = \frac{v_{\max,2-HPP} * [BA] * [AA]}{(K_{M,BADon} + [BA]) * (K_{M,AA} + [AA])}$$

Da Benzaldehyd im Falle der 2-HPP Bildung als Donorsubstrat fungiert und bei der Bildung von Benzoin ebenfalls als Akzeptor, muss dies auch in der Kinetik berücksichtigt werden. Daher werden für Benzaldehyd sowohl die Werte als Donorsubstrat ($K_{M,BADon}$) wie auch als Akzeptorsubstrat ($K_{M,BAAkz}$) unterschieden.

Für die Bildung von Benzoin (Bz) aus zwei Molekülen Benzaldehyd wird angenommen:

$$v_{Bz,Bildung} = \frac{v_{\max,Bz,Bildung} * [BA] * [BA]}{(K_{M,BADon} + [BA]) * (K_{M,BAAkz} + [BA])}$$

Für die Benzoinspaltung wird angenommen:

$$v_{Bz,Spaltung} = \frac{v_{\max,Bz,Spaltung} * [Bz]}{(K_{M,Bz} + [Bz])}$$

Durch Kombination der Benzoinbildung und Spaltung ergibt sich somit eine Gesamtreaktionsgeschwindigkeit zu:

$$v_{Bz} = v_{Bz,Bildung} - v_{Bz,Spaltung}$$

Für die Stoffbilanzen gilt:

$$\frac{dc_{2-HPP}}{dt} = [BFD] * v_{2-HPP}$$

$$\frac{dc_{Benzoin}}{dt} = [BFD] * (v_{Bz,Bildung} - v_{Bz,Spaltung})$$

$$\frac{dc_{Benzaldehyd}}{dt} = [BFD] * (-2 * v_{Bz,Bildung} - v_{2-HPP})$$

$$\frac{dc_{Acetaldehyd}}{dt} = [BFD] * (-v_{2-HPP})$$

Die Konzentrationsverläufe können auf Grundlage dieser Betrachtung und der bereits bestimmten kinetischen Parameter (siehe Kapitel 4.3) weitgehend mit dem Programm MATLAB R2007a simuliert werden, wie es in den Abbildungen 6.2-6.5 zu sehen ist. In

Tabelle 6.1 sind die für das Modell verwendeten Grenzen der Parameter angegeben, sowie die durch Anpassung ermittelten Werte (fit).

Die Skripte für alle Varianten sind im Anhang als ein für MATLAB lesbares Protokoll angegeben. Man muss jedoch berücksichtigen, dass es sich bei diesen Simulationen um eine Vereinfachung des gesamten Reaktionsmechanismus handelt, da in diesem Modell Inhibierungen jeglicher Art sowie eventuelle Enzymdeaktivierungen nicht berücksichtigt sind. Zum einen soll damit verhindert werden, dass das gesamte Modell überparametrisiert wird und zum Anderen ist die Berücksichtigung von Inhibierungen und Deaktivierungen erst sinnvoll, wenn diese vollständig und möglichst genau charakterisiert worden sind. Bei der Bildung von Benzoin wurden beispielsweise noch keine Produktinhibierung bzw. Inhibierung und Deaktivierung durch Acetaldehyd detailliert charakterisiert. Ebenso verhält es sich mit der Inhibierung der 2-HPP Bildung durch Benzoin und Acetaldehyd.

6.2.2 Carboligation der BFD F464I

Bei der Reaktion von Benzaldehyd und Acetaldehyd mit der Variante BFD F464I zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei der wtBFD. Zwar verläuft die Reaktion langsamer, jedoch wird auch hier nach relativ kurzer Reaktionsdauer (2,5 h) ein Umsatz von $X_{BA} > 99\%$ erreicht. Als Substrate wurden Benzaldehyd und Acetaldehyd in einer Konzentration von 30 bzw. 300 mM eingesetzt und die Reaktion in einem Volumen von 10 mL in Phosphatpuffer bei 30°C durchgeführt. Die eingesetzte Enzymmenge betrug hier 19,2 U_{2-HPP} BFD F464I. Auffallend ist auch hier der Konzentrationsverlauf des Nebenproduktes (*R*)-Benzoin. Nach einer intermediär maximalen Konzentration von 0,25 mM nach 2 h sinkt die Konzentration im weiteren Reaktionsverlauf mit etwa 1,4 mM nach 40 h wieder auf die Hälfte ab. Der Enantiomerenüberschuss des Hauptproduktes 2-HPP sinkt während des Reaktionsverlaufs signifikant von einem anfänglichen Wert von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 51\%$ auf 40% nach 1 h ab. Im weiteren Reaktionsverlauf bei nahezu vollständigem Umsatz kann jedoch keine weitere Veränderung des *ee*-Wertes im beobachteten Zeitraum detektiert werden.

In Tabelle 6.2 sind die für die Simulation verwendeten Grenzen der Parameter angegeben, sowie die durch Anpassung ermittelten Werte (fit).

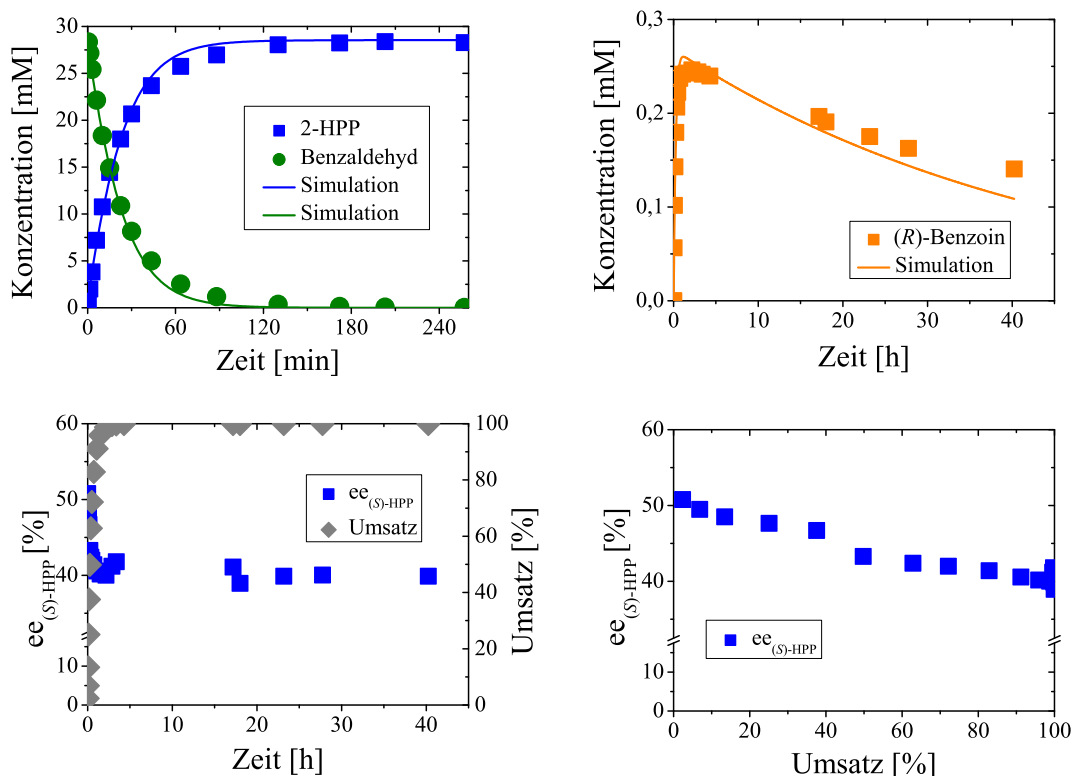


Abbildung 6.3: Reaktionsverlauf der Carboligations von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durch BFD F464I (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+} , 50 mM KP_i , 30°C, pH 7,5). Oben: Konzentrations-/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.

6.2.3 Carboligations der BFD A460I

Wie bei der BFD F464I wurde die Carboligations bei der BFD A460I in Phosphatpuffer mit den Substratkonzentrationen 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durchgeführt. Eingesetzt wurde hier eine Enzymmenge von 11 $\text{U}_{2\text{-HPP}}$ BFD A460I in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 mL. Der Gesamtreaktionsverlauf ist im Vergleich zur wtBFD und BFD F464I nochmals verlangsamt, sodass ein Umsatz $X_{\text{BA}} > 99\%$ erst nach 16 h Reaktionszeit erreicht wurde. Jedoch kann auch hier die Bildung des Nebenproduktes (R)-Benzoin bis zu einer Konzentration von etwa 1 mM nach 4 h beobachtet werden. Im weiteren Reaktionsverlauf nimmt die Konzentration jedoch nur marginal ab, sodass nach 20 h noch 0,9 mM im Reaktionsansatz enthalten sind. Charakteristisch für das Hauptprodukt 2-HPP ist auch hier die Abnahme des Enantiomerenüberschusses über den beobachteten Zeitraum bzw. die gemessenen Umsatzpunkte. Die Absolutabnahme von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 27\%$ auf 21 % bei Vollumsatz beträgt in diesem Versuch $\Delta ee = 6\%$.

In Tabelle 6.3 sind die für die Simulation verwendeten Grenzen der Parameter angegeben, sowie die durch Anpassung ermittelten Werte (fit).

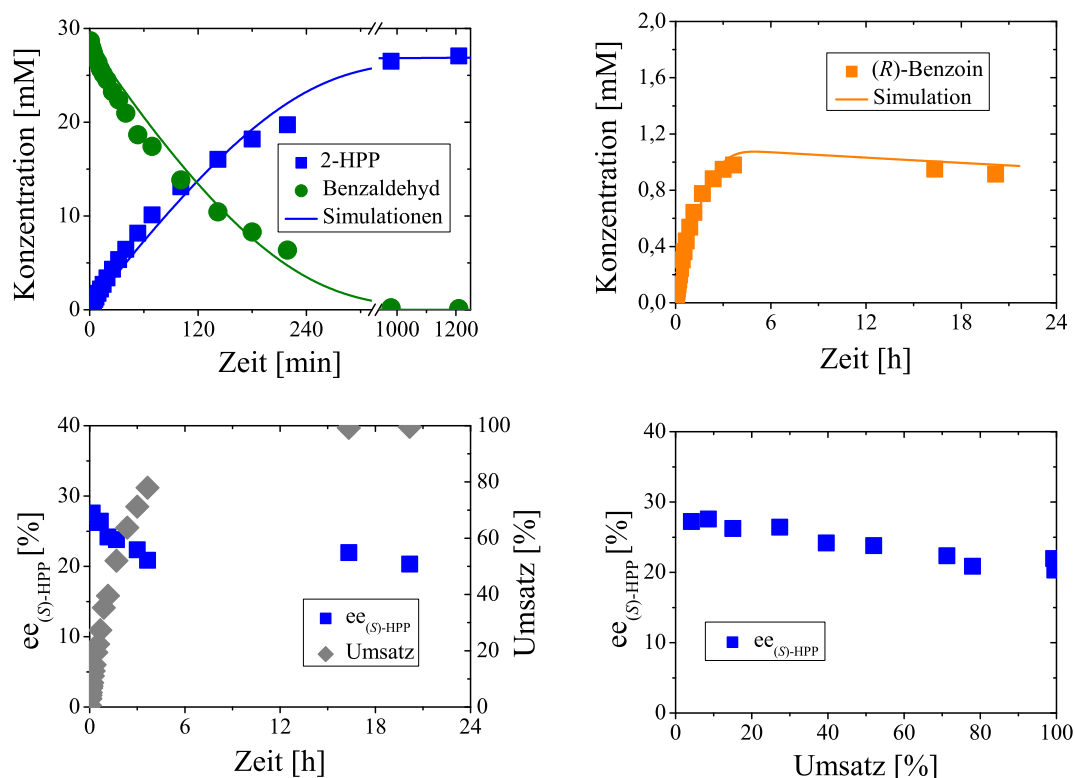


Abbildung 6.4: Reaktionsverlauf der Carboligations von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durch BFD A460I (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+} , 50 mM KP_i , 30°C, pH 7,5). Oben: Konzentrations/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.

6.2.4 Carboligations der BFD A460I-F464I

Die asymmetrische Verknüpfung der Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd durch die Variante BFD A460I-F464I wurde ebenfalls bei Substratkonzentrationen von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 10 mL wurden hierbei 26,3 U_{2-HPP} BFD A460I-F464I bei einer Reaktionstemperatur von 30°C in Phosphatpuffer eingesetzt. Annähernd vollständiger Umsatz des eingesetzten Benzaldehyds wurde nach 30 Minuten ($X_{\text{BA}} > 99\%$) erreicht, wobei auch hier neben dem Hauptprodukt 2-HPP das Nebenprodukt (R)-Benzoin in einer Konzentration von 0,4 mM gebildet wurde. Auffällig ist auch hier die anschließende Abnahme des (R)-Benzoins über den beobachteten Zeitraum. Der Enantiomerenüberschuss des gebildeten 2-HPP bleibt bis zum Erreichen des Vollumsatzes mit einem Wert von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 47\%$ nahezu konstant und fällt erst im weiteren Reaktionsverlauf über die folgenden 26 h auf einen Wert von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 43\%$ ab.

In Tabelle 6.4 sind die für die Simulation verwendeten Grenzen der Parameter angegeben, sowie die durch Anpassung ermittelten Werte (fit).

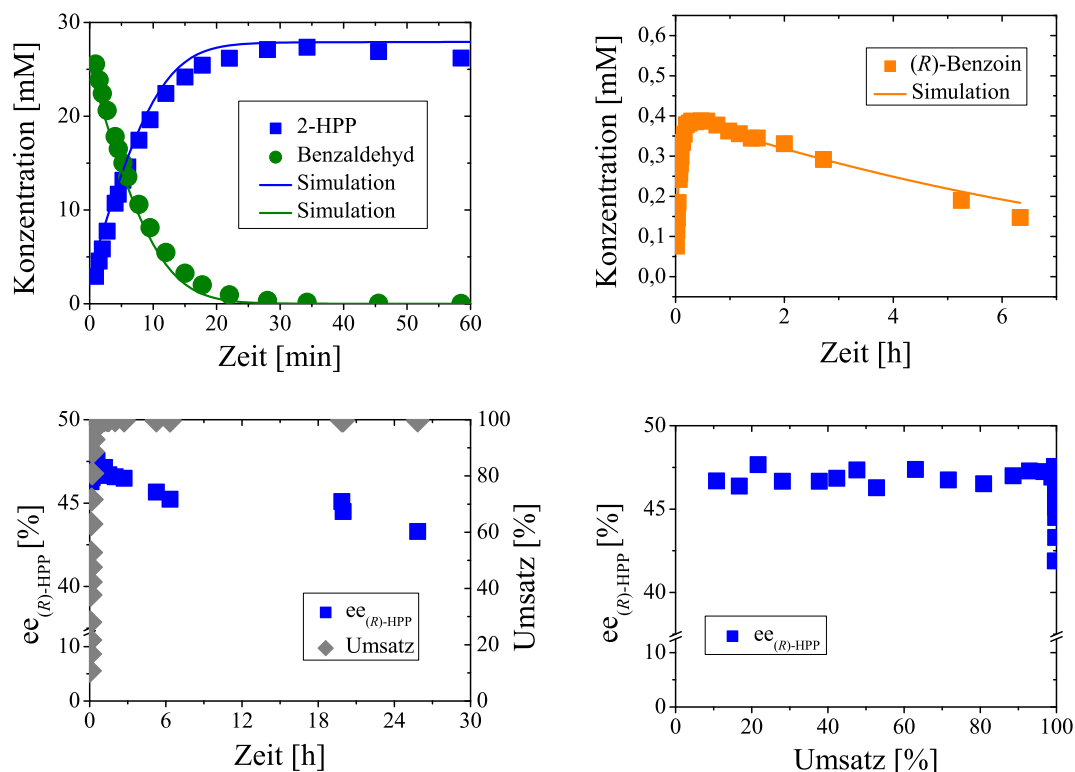


Abbildung 6.5: Reaktionsverlauf der Carboligations von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durch BFD A460I-F464I (0,5 mM ThDP, 2 mM Mg^{2+} , 50 mM KPi , 30°C, pH 7,5). Oben: Konzentrations-/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.

Der Reaktionsverlauf der Carboligations von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu 2-HPP kann für alle vier Varianten, sowohl der wtBFD wie auch der BFD F464I, BFD A460I und der BFD A460I-F464I verallgemeinert werden. Wie zu erwarten, wird das 2-HPP als Hauptprodukt gebildet, wobei die Enantiomerenüberschüsse bei geringen Umsätzen gut mit denen der Enzymcharakterisierungen übereinstimmen (siehe Kapitel 4.4). Auffällig für die Reaktionsverläufe sind jedoch zwei Merkmale: zum Einen nimmt der Enantiomerenüberschuss des gebildeten 2-HPP nach Erreichen des Vollumsatzes (wtBFD & BFD A460I-F464I) bzw. während der 2-HPP Synthese (BFD F464I & BFD A460I) ab und zum Anderen wird nach Erreichen einer lokalen, maximalen (R)-Benzoinkonzentration dessen Abnahme im weiteren Reaktionsverlauf beobachtet.

Für die Veränderung im Enantiomerenverhältnis von (S)- zu (R)-HPP gilt, dass sich das Produktgemisch in Richtung eines Racemats verschiebt, da sowohl bei den (S)-selektiveren Varianten wtBFD, BFD F464I und BFD A460I, wie auch bei der (R)-selektiveren Variante BFD A460I-F464I eine Abnahme des ee -Wertes zu beobachten ist. Prinzipiell kann eine Racemisierung von Enantiomeren auf verschiedene Arten erfolgen, wobei dies sowohl enzymatisch durch eine Racemaseaktivität des Enzyms, wie auch chemisch (z.B. Säure-Base katalysiert) geschehen kann.

Eine Abnahme von Benzoin aus dem Reaktionsgemisch kann verschiedene Ursachen haben. Benzoin hat nur eine geringe Löslichkeit in Wasser (300 mg/L bei 25°C; entspricht 1,4 mM; Gestis/Stoffdatenbank 2009) und kann daher in anorganischen Puffern auch bei geringeren Konzentrationen als Feststoff ausfallen. Da jedoch keine Trübungen in den Reaktionsansätzen beobachtet werden konnte, kann solch eine Konzentrationsabnahme durch Ausfällung ausgeschlossen werden. Daneben besteht die Möglichkeit, dass Benzoin durch die BFD-Varianten abgebaut wird, wenn Benzoin nicht nur als Nebenprodukt, sondern auch als Substrat fungiert.

Mit dem beschriebenen kinetischen Modell, was neben der Bildung auch die Spaltung von Benzoin berücksichtigt, können die Experimente relativ gut simuliert werden. Die Skripte für die Simulationen sind im Anhang als für MATLAB lesbare Protokolle angegeben. Für die Simulationen wurden zunächst streng die Grenzen ausgewählt, die in den Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetiken ermittelt wurden ($v_{\max,2\text{-HPP}}$; $K_{M,BADon}$; $K_{M,AA}$). Eine gute Übereinstimmung von Simulation und Experiment konnte auf diesem Weg jedoch nur für die wtBFD sowie die Variante BFD A460I erzielt werden. Bei der Variante BFD A460I-F464I mussten darüber hinaus die Grenze für $K_{M,AA}$ weiter herabgesetzt werden. Bei der Variante BFD F464I mussten alle Grenzen weiter ausgedehnt werden, um eine akzeptable Übereinstimmung von Simulation und Experiment zu erhalten. Aus diesem Grund handelt es sich nicht um eine reine Simulation der Ergebnisse, sondern ebenfalls um eine Anpassung der vorgegebenen Parameter besonders bezüglich der $K_{M,AA}$ -Werte. Man muss jedoch berücksichtigen, dass es sich bei diesem Modell um eine Vereinfachung des gesamten Reaktionsmechanismus handelt, da Inhibierungen jeglicher Art, eine reversible 2-HPP Bildung sowie eventuelle Enzymdeaktivierungen nicht berücksichtigt sind. Zum einen soll damit verhindert werden, dass das gesamte Modell bei der gegebenen Datendichte überparametrisiert wird und zum Anderen ist die Berücksichtigung von Inhibierungen und Deaktivierungen erst sinnvoll, wenn diese vollständig und möglichst genau charakterisiert worden sind. Bei der Bildung von Benzoin wurden beispielsweise noch keine Produktinhibierung bzw. Inhibierung und Deaktivierung durch Acetaldehyd detailliert charakterisiert. Ebenso verhält es sich mit der Inhibierung der 2-HPP Bildung durch Benzoin und Acetaldehyd.

Tabelle 6.1: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für wtBFD. Zusätzlich sind die aus der Doppelsubstratkinetik bestimmten Parameter (siehe Kapitel 4.3) für $K_{M,BA}$, $K_{M,AA}$ und $v_{\max,2-HPP}$ angegeben.

Parameter	Min	Max	Wert (fit)	Einheit
$K_{M,BADon}$	5	17,5	16,3	mM
$K_{M,BAAkz}$	0	150	146	mM
$K_{M,AA}$	250	750	505	mM
$K_{M,Bz}$	0	50	2,0	mM
$v_{\max,2-HPP}$	40	45	43,6	U/mg
$v_{\max,Bz,Bildung}$	1,5	3	1,8	U/mg
$v_{\max,Bz,Spaltung}$	0	0,055	0,03	U/mg

Tabelle 6.2: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für BFD F464I. Zusätzlich sind die aus der Doppelsubstratkinetik bestimmten Parameter (siehe Kapitel 4.3) für $K_{M,BA}$, $K_{M,AA}$ und $v_{\max,2-HPP}$ angegeben.

Parameter	Min	Max	Wert (fit)	Einheit
$K_{M,BADon}$	0	75	74	mM
$K_{M,BAAkz}$	10	75	10,7	mM
$K_{M,AA}$	200	600	307	mM
$K_{M,Bz}$	0	10	9,4	mM
$v_{\max,2-HPP}$	0	30	26,9	U/mg
$v_{\max,Bz,Bildung}$	0	0,25	0,24	U/mg
$v_{\max,Bz,Spaltung}$	0	0,1	0,01	U/mg

Tabelle 6.3: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für BFD A460I. Zusätzlich sind die aus der Doppelsubstratkinetik bestimmten Parameter (siehe Kapitel 4.3) für $K_{M,BA}$, $K_{M,AA}$ und $v_{\max,2-HPP}$ angegeben.

Parameter	Min	Max	Wert (fit)	Einheit
$K_{M,BADon}$	6,4	9	8,9	mM
$K_{M,BAAkz}$	0	300	6,4	mM
$K_{M,AA}$	300	834	381	mM
$K_{M,Bz}$	0	3	0,53	mM
$v_{\max,2-HPP}$	4,2	5,4	5,3	U/mg
$v_{\max,Bz,Bildung}$	0	0,2	0,19	U/mg
$v_{\max,Bz,Spaltung}$	0	0,002	0,001	U/mg

Tabelle 6.4: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für BFD A460I-F464I. Zusätzlich sind die aus der Doppelsubstratkinetik bestimmten Parameter (siehe Kapitel 4.3) für $K_{M,BA}$, $K_{M,AA}$ und $v_{max,2-HPP}$ angegeben.

Parameter	Min	Max	Wert (fit)	Einheit
$K_{M,BADon}$	7,75	30	11,6	mM
$K_{M,BAAkz}$	50	75	52	mM
$K_{M,AA}$	200	1000	234	mM
$K_{M,Bz}$	0	1	0,91	mM
$v_{max,2-HPP}$	0	25	24,9	U/mg
$v_{max,Bz,Bildung}$	0	1	0,97	U/mg
$v_{max,Bz,Spaltung}$	0,005	0,05	0,0098	U/mg

Auffällig ist, dass die Racemisierung des 2-HPP und der Abbau des Benzoin bei der Reaktionsführung mit der wtBFD am schnellsten verlaufen. Zum einen wurde hier die mit Abstand größte Menge an Enzym eingesetzt (425 U_{2-HPP} wtBFD im Vergleich zu 26,3 U_{2-HPP} bei der BFD A460I-F464I), jedoch auch TEA-Puffer anstelle von Phosphatpuffer verwendet. Die Abnahme der Benzoinkonzentration wird qualitativ gut durch die Berücksichtigung der Benzoinspaltung im Modell wiedergegeben.

Eine Racemaseaktivität bzw. die Fähigkeit auch Benzoin als Substrat zu akzeptieren konnte für die BFD bislang nicht nachgewiesen werden (Knoll et al. 2006), wird aber theoretisch für möglich gehalten (Kneen et al. 2005). Im Folgenden gilt es, diese Fragestellungen weiter zu untersuchen.

6.3 Umsetzung von Benzoin mit BFD Varianten

6.3.1 Vergleich von Phosphat- und TEA-Puffer

Um eine potentielle Lyaseaktivität der BFD Varianten bezüglich des Benzoin nachzuweisen, muss das Reaktionssystem näher betrachtet werden. Das direkte Spaltprodukt des Benzoin wäre bei einer reversiblen Benzoinbildung Benzaldehyd. Versuche, Benzoin als einziges Substrat einzusetzen und die Bildung von Benzaldehyd zu verfolgen verliefen jedoch sehr schwierig, da zwar Benzaldehyd nachgewiesen werden konnte, dieses aber nur in sehr geringen Mengen und daher nur schwer quantifizierbar. Die Menge des eingesetzten Benzoin blieb hingegen nahezu konstant. Da möglicherweise das thermodynamische Gleichgewicht auf Seiten des Benzoin liegt, wurde in einer weiteren Reaktionsreihe versucht, dass gebildete Benzaldehyd aus der Reaktion zu entfernen und somit eine weitere Umsetzung des Benzoin zu erreichen. Hierzu wurde Acetaldehyd zugegeben, welcher mit dem gebildeten Benzaldehyd zu 2-HPP umgesetzt wird.

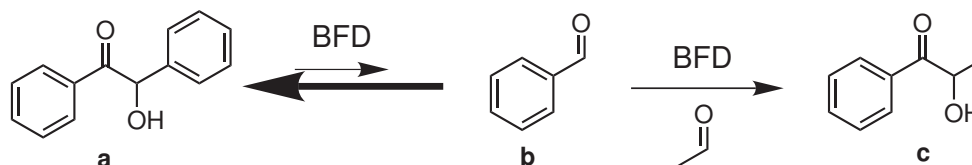


Abbildung 6.6: Postulierte Reaktionssequenz der Spaltung von Benzoin (a) zu Benzaldehyd (b) und Weiterreaktion zu 2-HPP (c) durch BFD.

In nahezu der gesamten Literatur zur Carboligaseaktivität der BFD wird Phosphatpuffer (KP_i -Puffer) verwendet, in dem jedoch bislang keine Lyaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Daher wird zum Vergleich auch Triethanolaminpuffer (TEA-Puffer) getestet, der bei Umsetzungen mit Benzaldehydlyase verwendet wird (Kurlemann, Liese 2004).

Die Substrate rac-Benzoin und Acetaldehyd wurden in DMSO gelöst und diese Substratlösung mit Phosphat- bzw. TEA-Puffer verdünnt. Das DMSO fungiert hierbei als Lösungsvermittler, um ein Ausfallen von Benzoin zu verhindern (Stillger et al. 2006).

Die Endkonzentrationen der Reaktanden betrugen 1,5 mM rac-Benzoin und 100 mM Acetaldehyd sowie jeweils 0,5 mM der beiden Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} . DMSO wurde in einer Menge von 30 % (v/v) verwendet sowie 50 mM der zu testenden Puffer. Die Reaktionsansätze wurden durch Zugabe von jeweils 4,3 U_{2-HPP} BFD A460I gestartet und in einem pH Bereich zwischen 6,0 und 8,0 verfolgt.

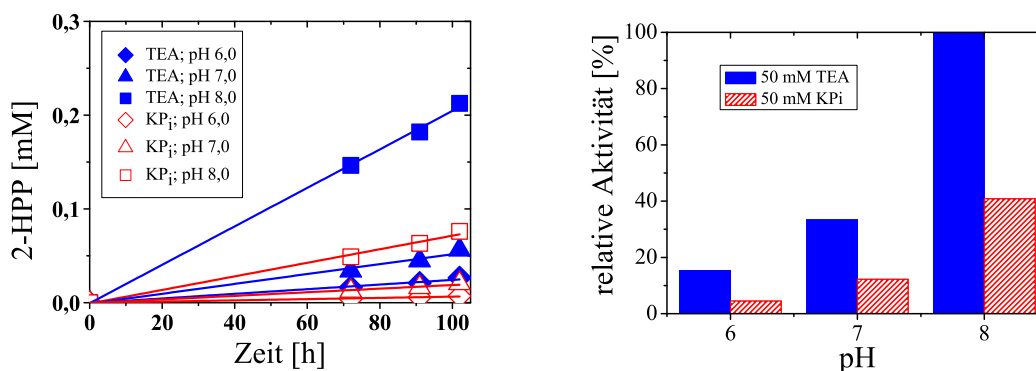


Abbildung 6.7: Bildung von 2-HPP aus rac-Benzoin und Acetaldehyd durch BFD A460I in TEA- und KP_i -Puffer im pH-Bereich 6,0-8,0. Versuchsbedingungen: 1,5 mM rac-Benzoin, 100 mM Acetaldehyd, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg^{2+} , 50 mM Pufferstärke, 25°C.

Bei den Umsetzungen von rac-Benzoin zu 2-HPP kann man deutlich erkennen, dass die Bildung von 2-HPP zum Einen von der Art des Puffers abhängt und zum Anderen vom pH Wert des Reaktionssystems. Die Bildung des 2-HPP ist im TEA-Puffer somit deutlich erhöht gegenüber dem KP_i -Puffer, wobei die Bildungsrate bei pH 6,0 um den Faktor 3,4 und bei pH 8,0 um den Faktor 2,4 erhöht ist. Bei beiden Puffersystemen ist im leicht alkalischen Bereich bei pH 8,0 die Bildungsrate des 2-HPP stark erhöht im Vergleich zu neutralem bzw. leicht saurem pH. Dieses Ergebnis kongruiert mit der Carboligaseaktivität der wtBFD von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu 2-HPP, da auch hier die höchsten Bildungsraten in leicht alkalischem Milieu beobachtet werden (Iding et al. 2000).

Durch die Betrachtung der Ergebnisse aus dem Vergleich von TEA- und Phosphatpuffer zur 2-HPP Bildung aus rac-Benzoin sowie der Simulation der Umsatzverläufe zur 2-HPP Bildung (mit integrierter Benzoinspaltung) liegt die Vermutung nahe, dass die Umsetzung des Benzoin tatsächlich durch die BFD katalysiert ist. Dies würde bedeuten, dass die BFD neben der Spaltung von 2-Ketocarbonsäuren und der Carboligation von Aldehyden auch die Spaltung von 2-Hydroxyketonen katalysieren kann, was der reversiblen Reaktivität entspricht. Dies soll im Folgenden näher untersucht werden.

6.3.2 Kinetische Racematspaltung von Benzoin

Da die BFD Benzoin lediglich als (*R*)-Benzoin bildet, liegt die Vermutung nahe, dass im Falle einer Benzoinspaltung auch nur (*R*)-Benzoin als Substrat akzeptiert wird. Dies soll durch den Einsatz von racemischem Benzoin als Substrat überprüft werden.

Die Versuche zur kinetischen Racematspaltung wurden bei pH 7,5 in 50 mM TEA-Puffer, unter Zugabe der beiden Cofaktoren ThDP (0,5 mM) und Mg^{2+} (2 mM) durchgeführt. Die Substrate rac-Benzoin und Acetaldehyd wurden in Endkonzentrationen von 1,6 mM bzw. 50 mM verwendet sowie DMSO zu 30 % (v/v) als Cosolvent. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von wtBFD (157 U_{2-HPP}), BFD F464I (106 U_{2-HPP}), BFD A460I (20 U_{2-HPP}) bzw. BFD A460I-F464I (92 U_{2-HPP}) gestartet.

Wie in den Abbildungen 6.8 bis 6.11 zu sehen ist, nimmt die Benzoinkonzentration (jeweils Abbildungsausschnitte A+C) bei allen Varianten mit der Reaktionszeit ab. Bei der wtBFD und der BFD A460I-F464I wird nach 2 h bzw. 40 h eine konstante Benzoinkonzentration von 0,8 mM erreicht, wobei nur noch (*S*)-Benzoin in den Reaktionsansätzen detektierbar ist (siehe Abbildungsausschnitte B). Bei den Varianten BFD F464I und BFD A460I verläuft die Abnahme des Benzoin wesentlich langsamer, wobei auch hier nach 72 h Reaktionszeit ein deutlicher Überschuss des (*S*)-Enantiomers vorliegt ($ee_{(S)\text{-Benzoin}} = 59\%$ bzw. 28%). Ähnlich verhält sich die Bildung des Produktes 2-HPP, welches bei der wtBFD und der BFD A460I-F464I eine konstante Konzentration nach 2 h bzw. 40 h von 1,6 mM bzw. 1,4 mM erreicht. Dies entspricht bei einer klassischen Racematspaltung von 1,6 mM rac-Benzoin in etwa dem Vollumsatz zu 2-HPP, da aus jedem Molekül (*R*)-Benzoin zwei Moleküle 2-HPP gebildet werden können. Auffällig ist, dass das 2-HPP hierbei nicht mit den gewohnten Enantiomerenüberschüssen von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 92\%$ für wtBFD und $ee_{(R)\text{-HPP}} = 40\%$ für BFD A460I-F464I gebildet wird, sondern als nahezu racemische Mischung vorliegt (jeweils Abbildungsausschnitte B+D). Bei den Varianten BFD F464I und BFD A460I verläuft analog zum Substratverbrauch auch die Bildung des 2-HPP langsamer, wobei hier Enantiomerenüberschüsse von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 40\%$ für BFD F464I und $ee_{(S)\text{-HPP}} = 22\%$ für BFD A460I zu beobachten sind.

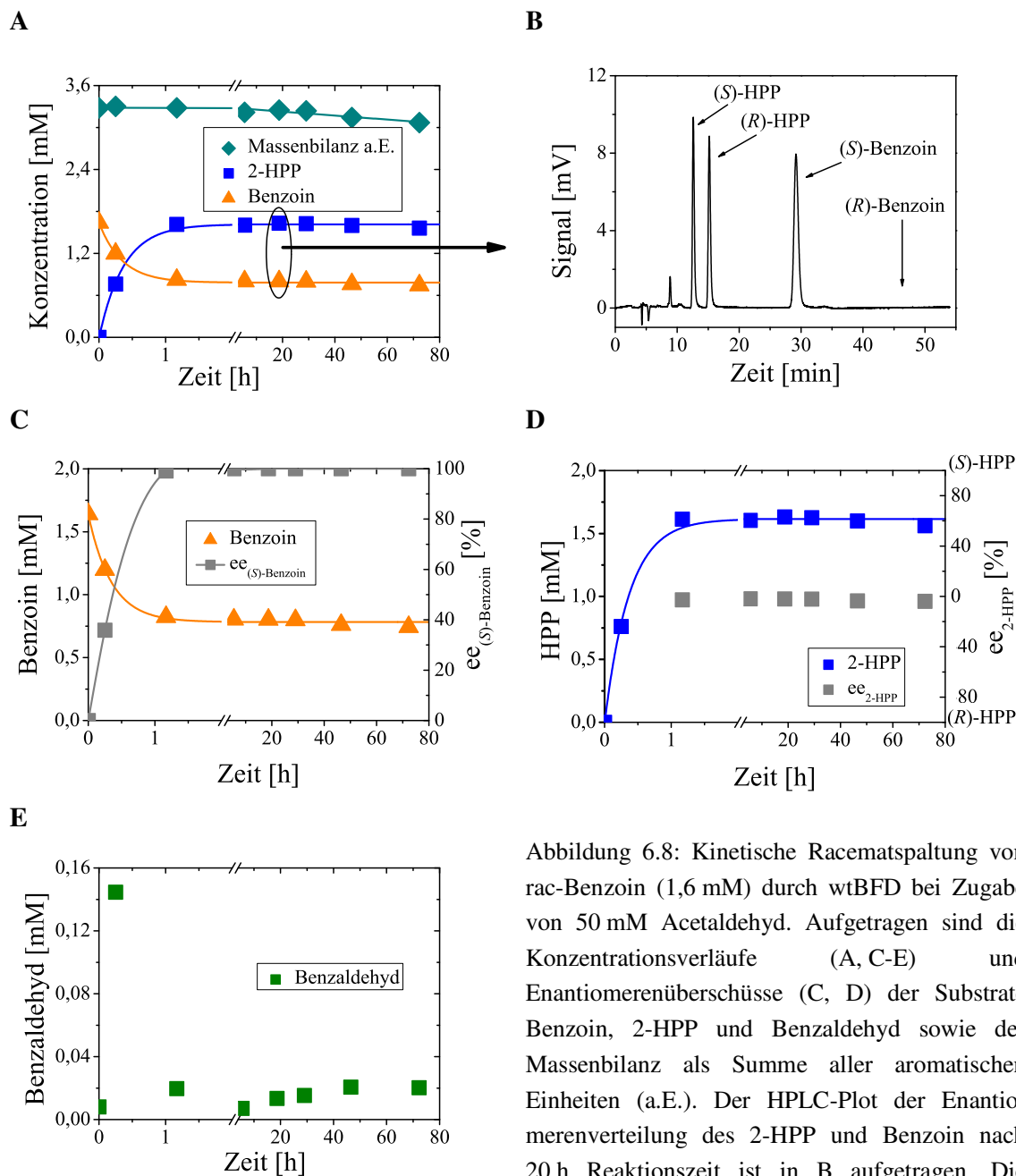


Abbildung 6.8: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch wtBFD bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 20 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA, 30 % DMSO (v/v), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C, pH 7,5.

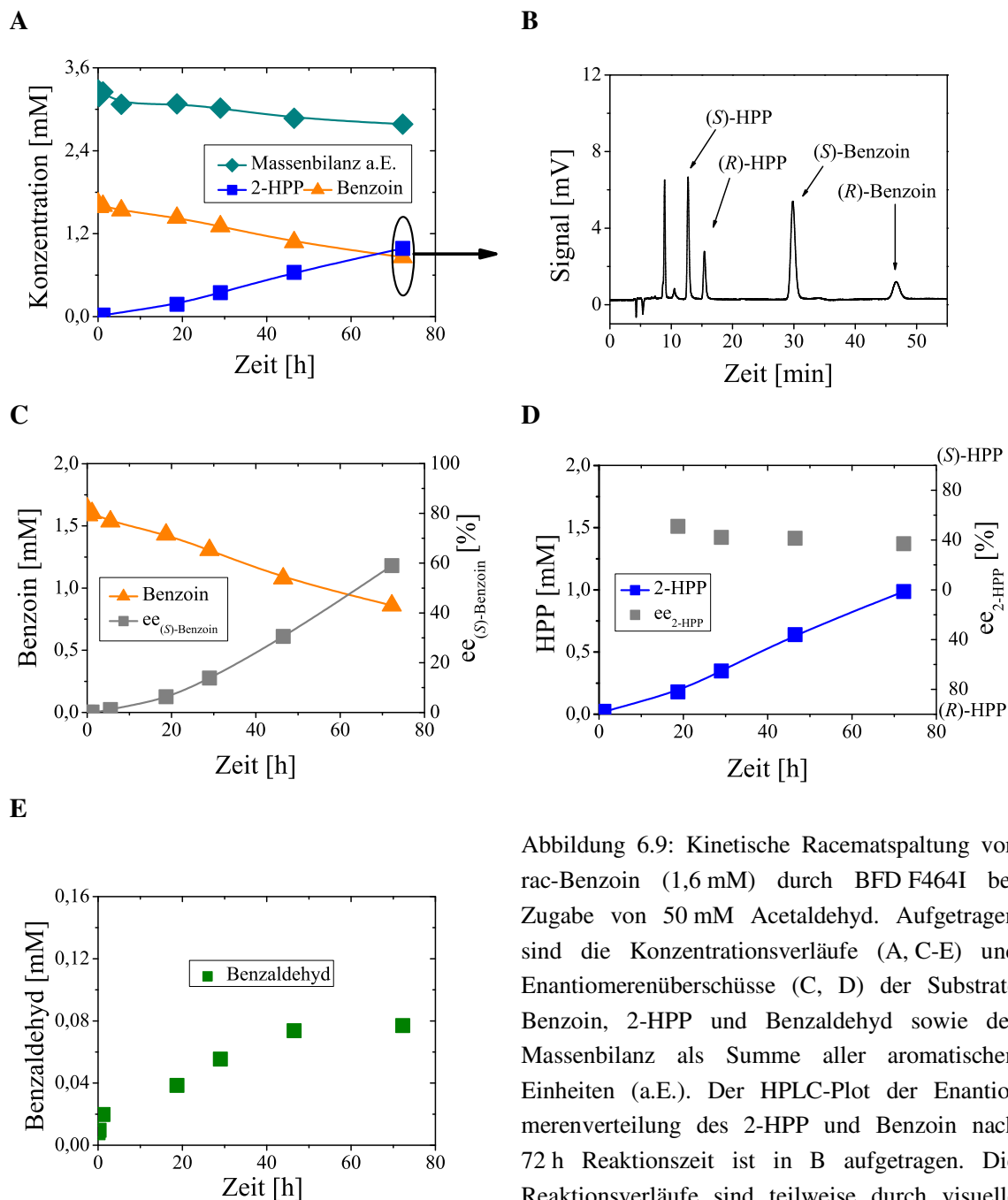


Abbildung 6.9: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch BFD F464I bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA, 30 % DMSO (v/v), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C, pH 7,5.

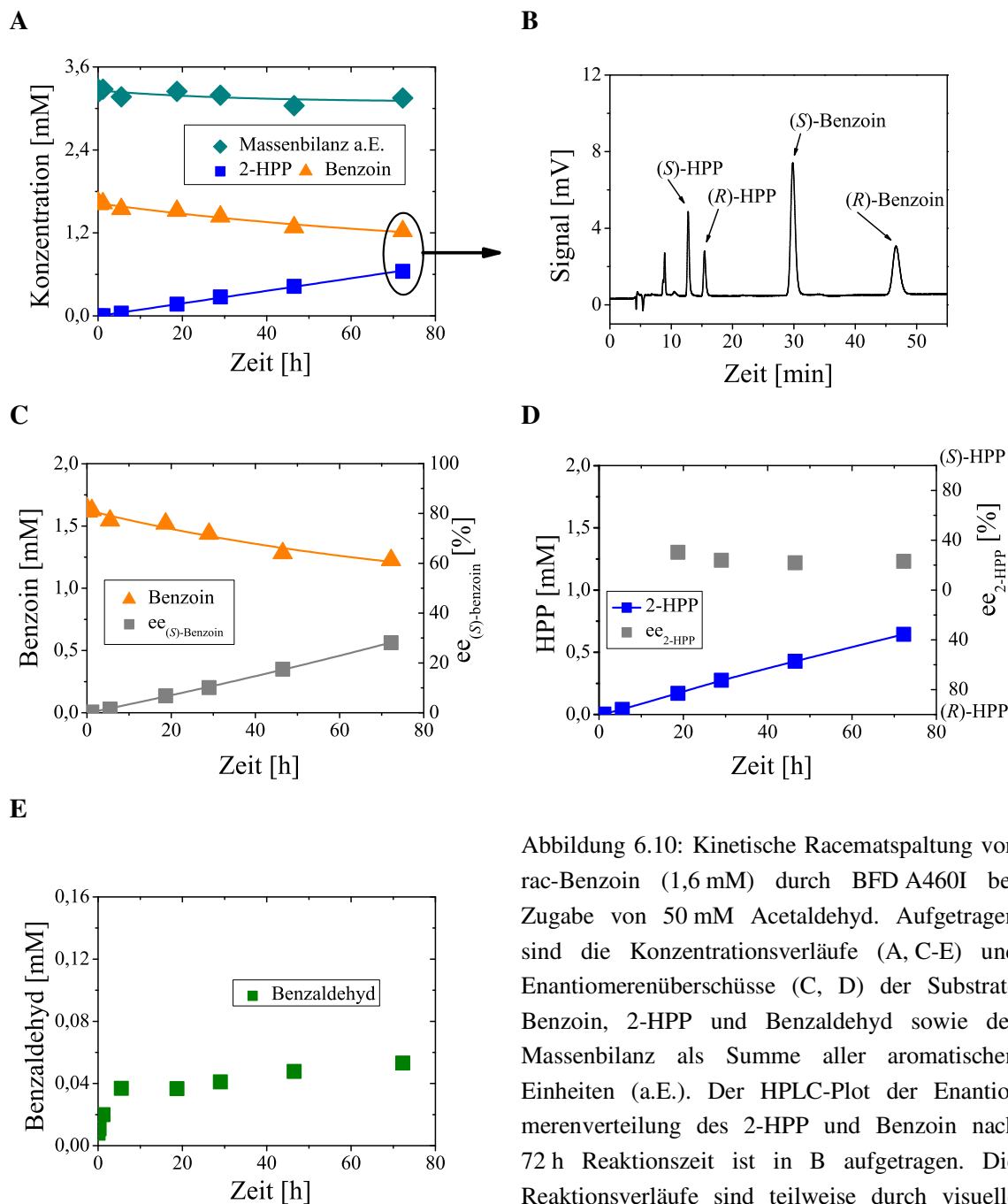


Abbildung 6.10: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch BFD A460I bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA, 30 % DMSO (v/v), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C, pH 7,5.

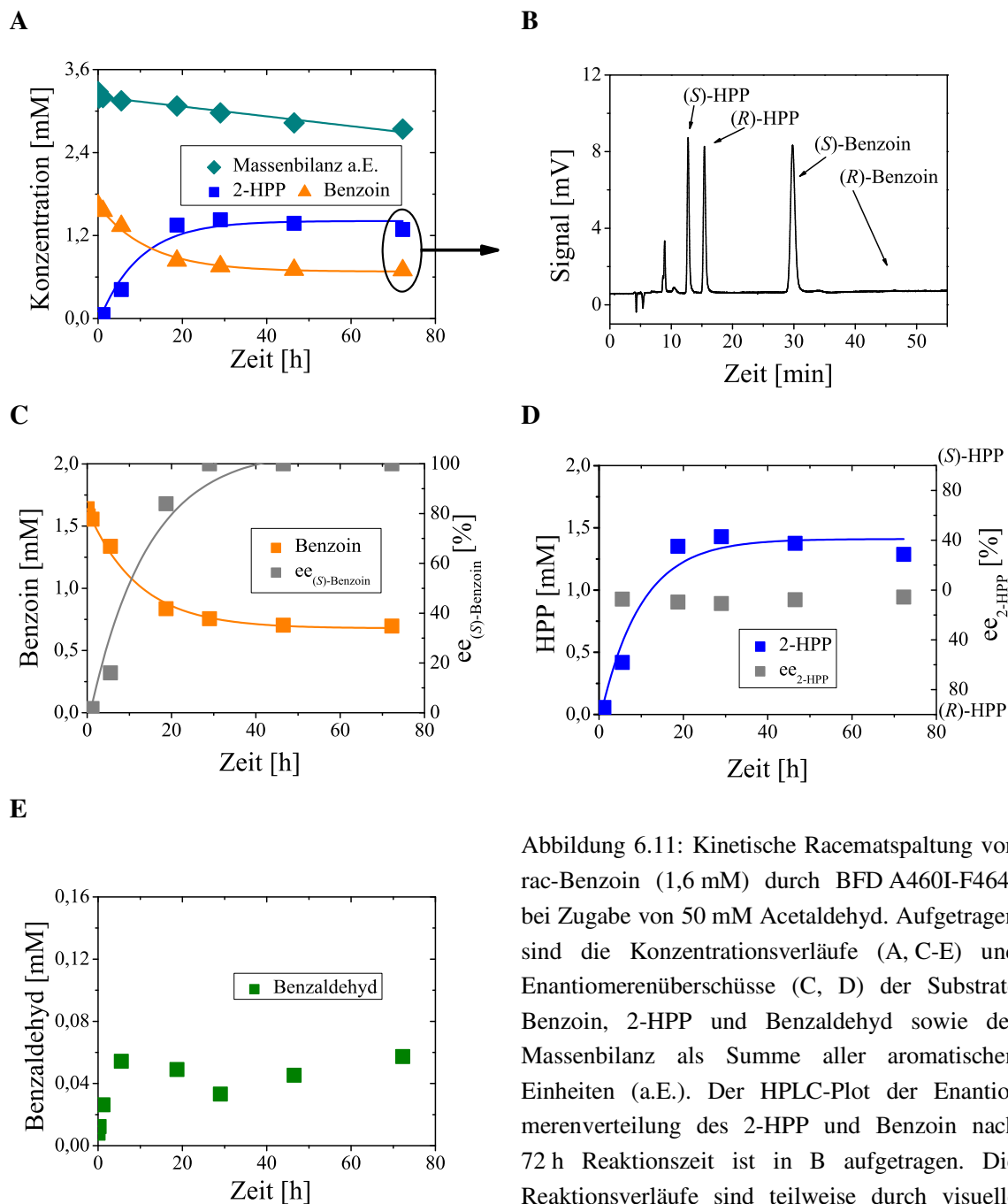


Abbildung 6.11: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch BFD A460I-F464I bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA, 30 % DMSO (v/v), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C, pH 7,5.

Als weiteres Produkt kann bei allen Reaktionsansätzen Benzaldehyd detektiert werden (jeweils Abbildungsausschnitt E), welcher nach einer relativ kurzen Zeit eine Konzentration von 20 μM (wtBFD) bzw. 40 μM (BFD A460I, BFD A460I-F464I) erreicht. Bei der Variante BFD F464I steigt die Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum auf eine Konzentration von etwa 80 μM .

Um eine nicht enzymatische Spaltung des Benzoin zu ausschließen, wurden drei Negativversuche durchgeführt. Im ersten Negativversuch wurde keine BFD-Präparation zugegeben, um eine mögliche Spaltung des Benzoin durch andere Pufferbestandteile ausschließen zu können. Im zweiten Negativversuch wurden 30 U_{2-HPP} BFD A460I und zusätzlich 20 mM des Enzyminhibitors 3-Chlormethylbenzoylphosphonat (3-Chloro-MBP, siehe Kapitel 7) zugegeben und im dritten Blindversuch 30 U_{2-HPP} BFD A460I, die zuvor 30 min bei 80°C deaktiviert wurden. Hierdurch soll eine mögliche Benzoinspaltung durch andere Bestandteile der Enzympräparationen bzw. durch Fremdproteine ausgeschlossen werden. Bei allen Negativversuchen konnten zwar sehr geringe Mengen Benzaldehyd detektiert werden (unterhalb der Messgenauigkeit), jedoch keine Konzentrationserhöhungen über die beobachteten Reaktionszeiträume. Beispielhaft für alle Negativversuche ist die Referenz ohne Enzymzugabe in Abbildung 6.12 dargestellt. 2-HPP konnte in keinem Negativversuch nachgewiesen werden.

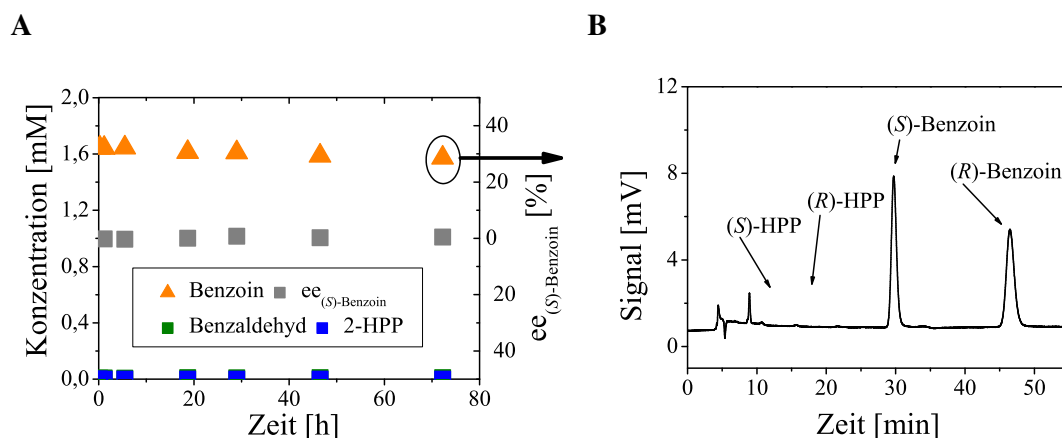


Abbildung 6.12: Blindreferenz zur kinetischen Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) und Acetaldehyd (50 mM) ohne Enzymzugabe. Aufgetragen ist der Konzentrationsverlauf und Enantiomerenüberschuss (A) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd. Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen.

Im Ganzen zeigt sich somit eine typische kinetische Racematspaltung des rac-Benzoin zu (S)-Benzoin als nicht akzeptiertes Substrat und zu 2-HPP (siehe Abbildung 6.13, A-E) als Produkt aus dem zugesetzten Acetaldehyd und dem gebildeten Benzaldehyd, welches somit Spaltprodukt des Substrates (R)-Benzoin ist.

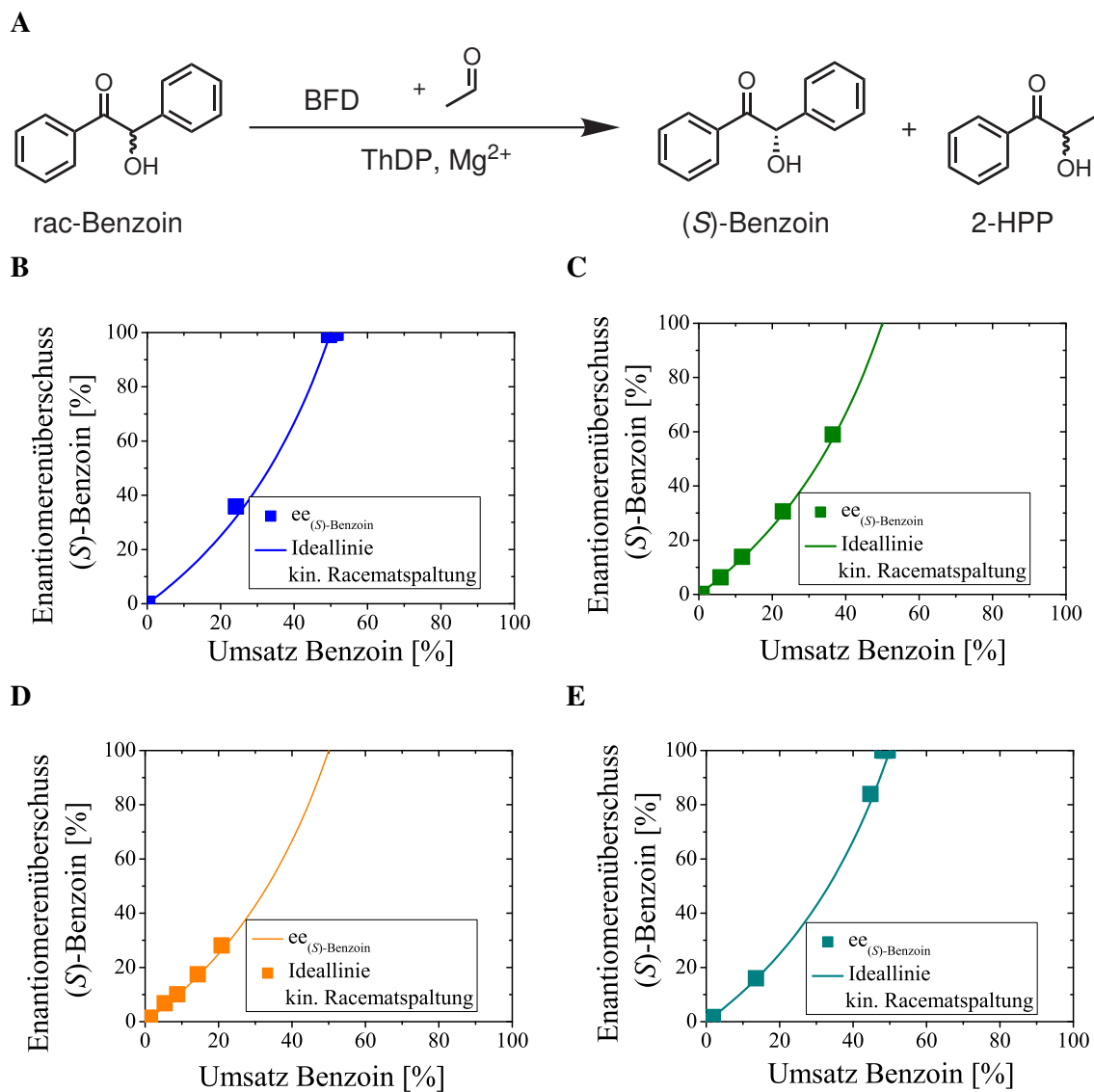


Abbildung 6.13: Reaktionsgleichung der kinetischen Racematspaltung von rac-Benzoin zu (S)-Benzoin und 2-HPP (A). Die Umsatzkurven von rac-Benzoin sind in Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des verbleibenden (S)-Benzoins für die Varianten wtBFD (B), BFD F464I (C), BFD A460I (D) und BFD A460I-F464I (E) aufgetragen. Die experimentellen Daten sind durch die Ideallinie einer kinetischen Racematspaltung ergänzt.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Racematspaltung ist, dass maximal die Hälfte des eingesetzten Benzoin umgesetzt wird und daraus nahezu quantitativ mit Acetaldehyd das Endprodukt 2-HPP gebildet wird.

Dieses Reaktivitätsmuster ähnelt sehr stark dem der Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I, da BAL zum Einen die Bildung von (R)-Benzoin aus Benzaldehyd katalysiert, jedoch auch die Umsetzung von (R)-Benzoin mit Acetaldehyd zu (R)-HPP (Dominguez de Maria et al. 2006). Neben der Reaktivität sind beide Enzyme auch strukturell eng verwandt, da sie beide Homotetramere ausbilden und den Cofaktor ThDP in

der *active site* binden (Polovnikova et al. 2003), (Hasson et al. 1998), (Mosbacher et al. 2005). Ob Benzaldehyd nun tatsächlich als quantitativ frei werdendes Spaltprodukt der BFD gebildet wird, kann durch dieses Experiment nicht belegt werden, da frei werdender Benzaldehyd mit dem zugesetzten Acetaldehyd weiter zu 2-HPP reagiert. Denkbar ist auch eine direkte Reaktion des Enzym-Benzoinkomplexes mit Acetaldehyd zu 2-HPP und Benzaldehyd, wie es für die BAL postuliert wird (siehe Abbildung 6.14) (Stillger et al. 2006), (Hildebrand et al. 2007).

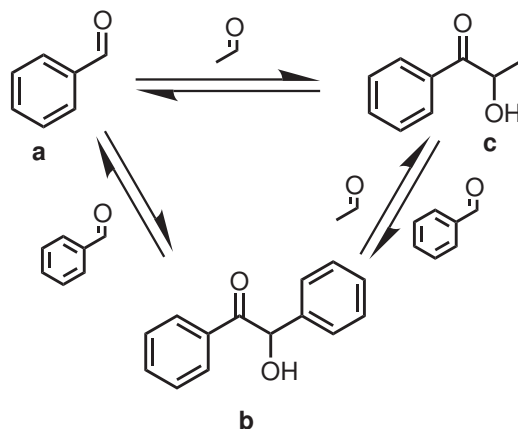


Abbildung 6.14: Bildungsmöglichkeiten von 2-HPP (c) und Benzoin (b) aus Benzaldehyd (a) und Acetaldehyd katalysiert durch Benzaldehydlyase (Stillger et al. 2006), (Hildebrand et al. 2007).

Durch lineare Regression der 2-HPP Konzentrationsverläufe wurden die Bildungsrate von 2-HPP aus 1,6 mM rac-Benzoin und 50 mM Acetaldehyd abgeschätzt. In Tabelle 6.5 ist der Vergleich mit den Bildungsrate von 2-HPP unter Standardbedingungen (40 mM Benzaldehyd, 400 mM Acetaldehyd, Phosphatpuffer pH 7,5) zu sehen. An Hand dieses Vergleichs wird deutlich, dass die Bildung von 2-HPP aus Benzoin und Acetaldehyd im Gegensatz zu Standardbedingungen stark verlangsamt ist, da sich die Bildungsrate um einige Zehnerpotenzen ($7 \cdot 10^2$ bei wtBFD bis $3 \cdot 10^4$ bei BFD F464I) unterscheiden.

Tabelle 6.5: Vergleich der Bildungsrate von 2-HPP unter Standardbedingungen und bei der Spaltung von rac-Benzoin.

Variante	v (Standardbedingungen) [U _{2-HPP} /mg]	v (bei Benzoinspaltung) [mU _{2-HPP} /mg]	Faktor
wtBFD	8,3	11,3	735
BFD F464I	1,6	0,06	29300
BFD A460I	0,7	0,03	20900
BFD A460I-F464I	1,8	0,3	6600

6.4 Racemisierung von 2-HPP

Bei den Versuchen zur Spaltung von Benzoin konnte im Fall der wtBFD und BFD A460I-F464I eine vollständige kinetische Racematspaltung erreicht werden. Das gebildete 2-HPP lag dabei in nahezu racemischer Form vor und nicht in den hohen Enantiomerenüberschüssen, die bei der 2-HPP Synthese unter Standardbedingungen erreicht werden. Wenn Benzoin neben Benzaldehyd als Substrat für die BFD fungiert, sollte es auch möglich sein, 2-HPP als Substrat einzusetzen.

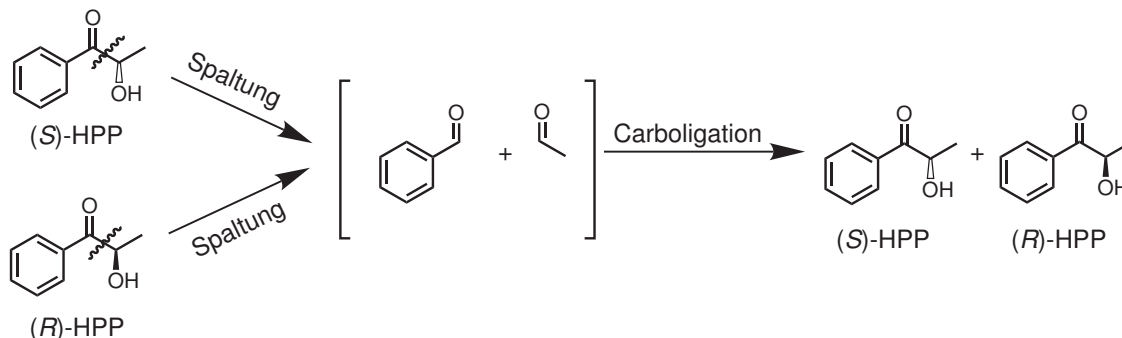


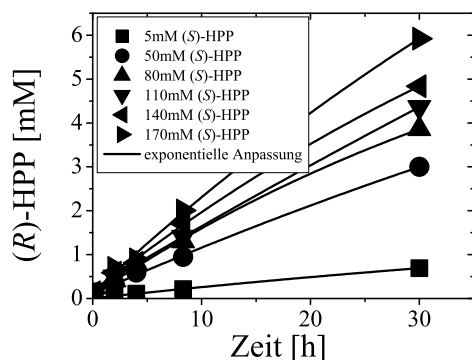
Abbildung 6.15: Postuliertes Reaktionsschema für die Spaltung von enantiomerenreinem (S)- bzw (R)-HPP zu Benzaldehyd und Acetaldehyd mit anschließender Rückbildung von 2-HPP in nicht enantiomerenreiner Form.

Da keine der BFD-Varianten enantiomerenreines 2-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd unter Standardbedingungen bildet, sollte es möglich sein, bei enantiomerenreinem 2-HPP als Substrat, sowohl (S)-HPP als auch (R)-HPP, eine Abnahme des Enantiomerenüberschusses über die Reaktionszeit zu beobachten.

6.4.1 2-HPP abhängige 2-HPP Racemisierung

Um zu testen, ob 2-HPP nicht nur als Produkt, sondern auch als Substrat für die BFD fungiert, wurde versucht, die einzelnen Enantiomere ineinander umzuwandeln und so den Enantiomerenüberschuss einer enantiomerenreinen 2-HPP Lösung (sowohl (S)- als auch (R)-HPP) durch Zugabe der BFD Varianten zu verändern. Aus Vorversuchen ist bereits bekannt, dass die Bildung des komplementären 2-HPP Enantiomers durch Zugabe von geringen Mengen Acetaldehyd beschleunigt abläuft. Daher wurden den Reaktionsansätzen jeweils 25 mM Acetaldehyd zugesetzt. Die Bildung des komplementären 2-HPP Enantiomers wurde darüber hinaus bei verschiedenen 2-HPP Konzentrationen untersucht, um eine eventuelle Abhängigkeit von der Substratkonzentration zu erkennen. Die maximale 2-HPP Löslichkeit in wässriger Lösung beträgt nach eigenen Lösungsversuchen etwa 180 mM bei 25°C (gemessen für beide Enantiomere).

A



B

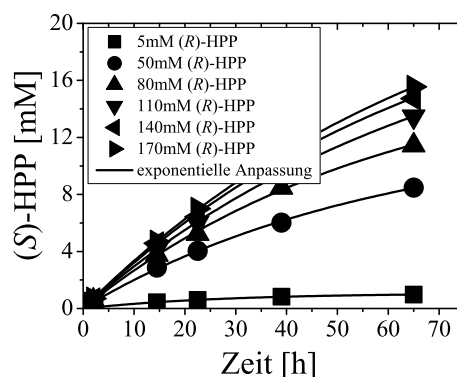


Abbildung 6.16: Konzentrationsabhängige Bildung des jeweilig komplementären 2-HPP Enantiomers katalysiert durch wtBFD. A: Bildung von (*R*)-HPP aus (*S*)-HPP und B: Bildung von (*S*)-HPP aus (*R*)-HPP. Enantiomerenreines 2-HPP wurde jeweils im Konzentrationsbereich von 5-170 mM eingesetzt sowie 25 mM Acetaldehyd.

In Abbildung 6.16 sind die zeitabhängigen Konzentrationsverläufe für die Bildung von (*R*)- aus (*S*)-HPP bzw. (*S*)- aus (*R*)-HPP für die Substratkonzentrationen an 2-HPP für jeweils 5, 50, 80, 110, 140 und 170 mM gezeigt (unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd). Aus den Konzentrationsverläufen ist ersichtlich, dass zwar mit steigenden Substratkonzentrationen auch höhere Produktkonzentrationen erreicht werden, die Änderungen zwischen Substrat- und Produktkonzentration jedoch nicht linear erfolgen. So werden die höchsten Konzentrationen an Produkt-Enantiomer bei jeweils 170 mM Substratkonzentration erreicht, wo nach etwa 30 h 6 mM (*R*)-HPP bzw. 8 mM (*S*)-HPP gebildet wurden. Betrachtet man die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, wie sie in Abbildung 6.17 und 6.18 aufgetragen sind, so kann man deutlich eine Michaelis-Menten Kinetik erkennen. Aufgetragen sind jeweils die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration für alle vier Varianten und beide 2-HPP Enantiomere. Alle acht Kurvenverläufe folgen einer hyperbolen Kurvenanpassung, woraus nach der Michaelis-Menten-Kinetik die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ für beide 2-HPP Enantiomere als Substrat berechnet werden können.

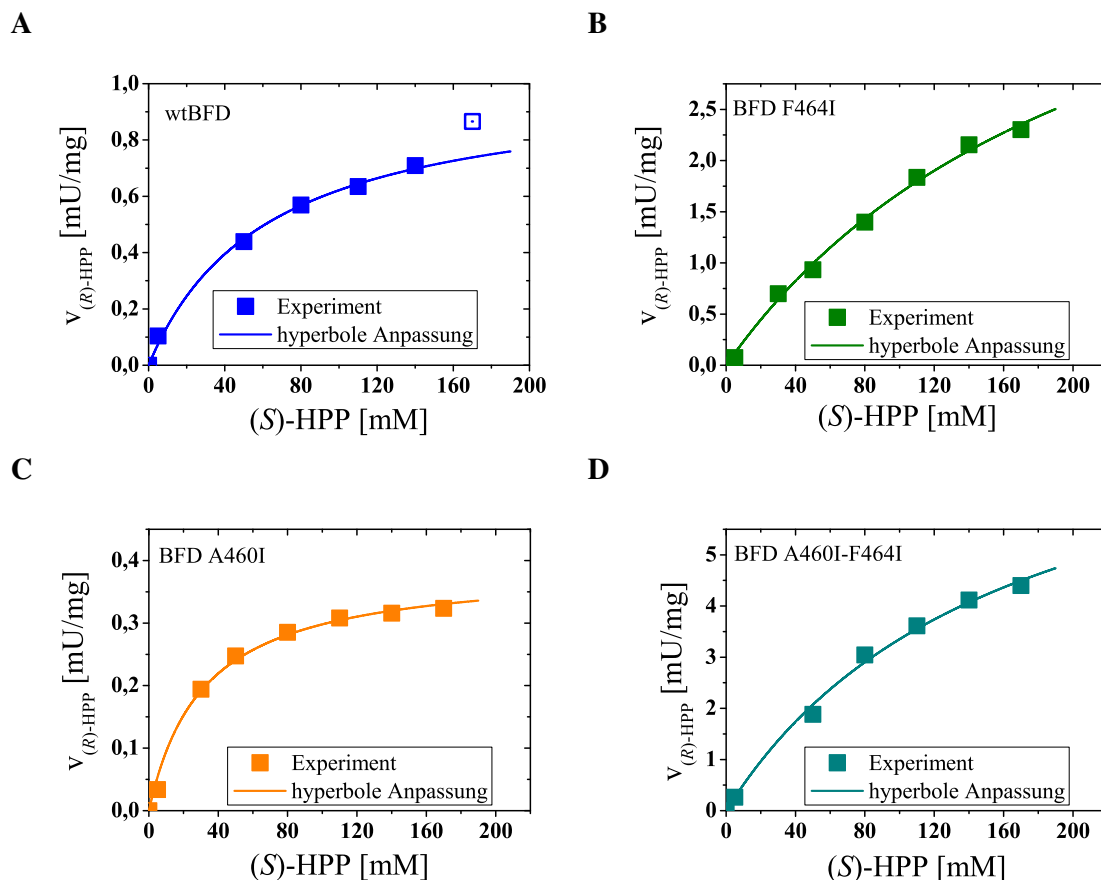


Abbildung 6.17: Bildungsrate von (R)-HPP aus enantiomerenreinem (S)-HPP unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd. Die Messpunkte der Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D) sind durch einen hyperbolen Kurvenverlauf (nur ausgefüllte Messpunkte sind berücksichtigt) angepasst.

Die Werte für die Parameter sind in Tabelle 6.6 aufgelistet. Beim Vergleich der Werte untereinander kann man leider keinen direkten Zusammenhang bzw. offensichtliche Gemeinsamkeiten unter den Varianten erkennen, was auf keine direkte Gesetzmäßigkeit hindeutet. Die K_M -Werte bei der wtBFD (~60 mM) und der BFD A460I (~30 mM) sind für (S)-HPP und (R)-HPP in etwa gleich. Bei der Variante BFD F464I ist der K_M -Wert für (S)-HPP mit 227 mM hingegen um den Faktor 2,6 größer als für (R)-HPP (86 mM). Bei der Variante BFD A460I-F464I ist dieser Unterschied noch größer, da sich beide Werte um den Faktor 4,6 unterscheiden ($K_{M,(S)\text{-HPP}} = 162$ mM; $K_{M,(R)\text{-HPP}} = 38$ mM). Vergleichend lässt sich jedoch zusammenfassen, dass die K_M -Werte für (S)-HPP größer als bzw. gleich denen für (R)-HPP sind.

$$K_{M,(S)\text{-HPP}} \geq K_{M,(R)\text{-HPP}}$$

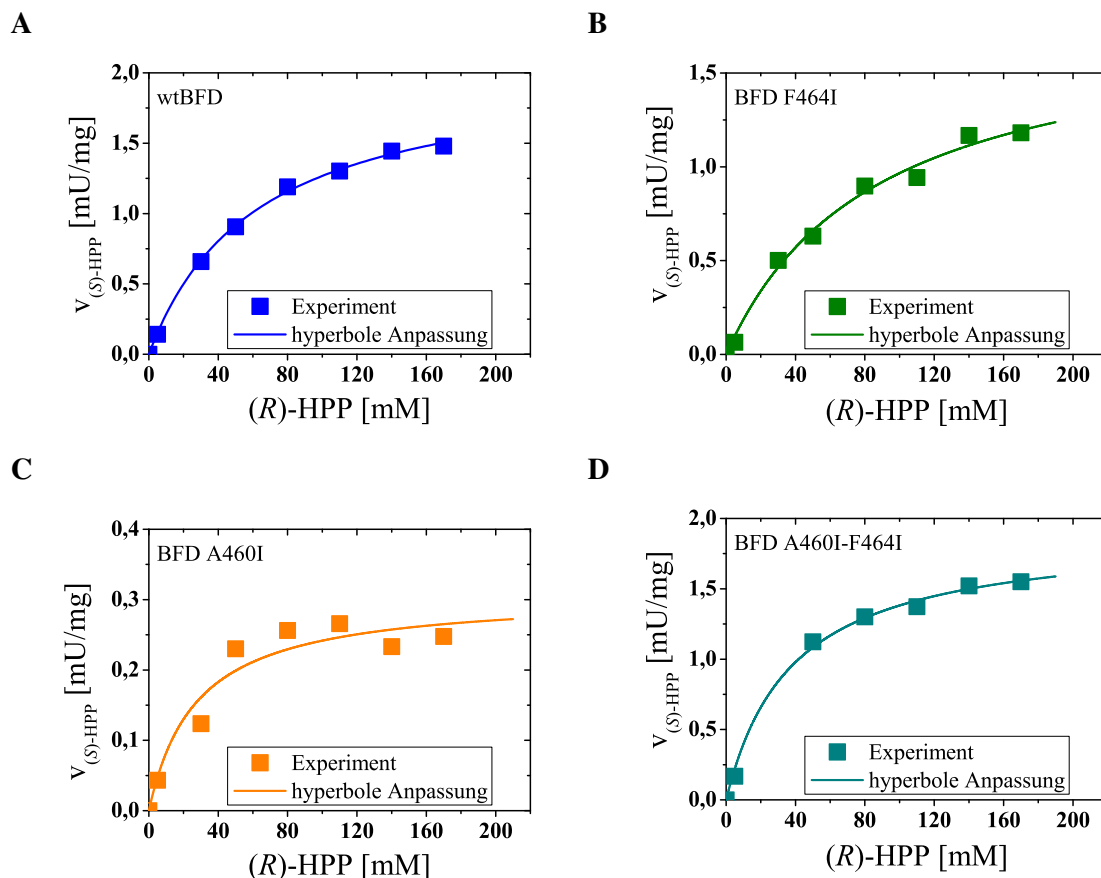


Abbildung 6.18: Bildungsraten von (S)-HPP aus enantiomerenreinem (R)-HPP unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd. Die Messpunkte der Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D) sind durch einen hyperbolen Kurvenverlauf angepasst.

Tabelle 6.6: Übersicht der kinetischen Parameter für (S)- und (R)-HPP als Substrat für die BFD-Varianten aus der hyperbolen Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten. Bestimmt wurden die Parameter unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd. Zum Vergleich sind die Werte für die 2-HPP Synthese unter Standardbedingungen angegeben (Spalte 6 und 7; in Klammern sind Literaturwerte nach Iding et al. angegeben Iding et al. 2000).

	$K_{M,(S)\text{-HPP}}$ [mM]	$v_{\max,(S)\text{-HPP}}$ [mU/mg]	$K_{M,(R)\text{-HPP}}$ [mM]	$v_{\max,(R)\text{-HPP}}$ [mU/mg]	$K_{M, \text{Benzaldehyd}}$ [mM]	$v_{\max, 2\text{-HPP}}$ [U/mg]
wtBFD	62,2 $\pm$ 9,9	1,0 $\pm$ 0,06	62,2 $\pm$ 3,8	2,1 $\pm$ 0,05	10,6 $\pm$ 2,9 (77 $\pm$ 19)	43,3 $\pm$ 12 (48 $\pm$ 10)
BFD F464I	226,8 $\pm$ 5,5	5,5 $\pm$ 0,6	86,4 $\pm$ 15,3	1,8 $\pm$ 0,14	15,2 $\pm$ 3,7	18,9 $\pm$ 2,7
BFD A460I	31,4 $\pm$ 3,8	0,39 $\pm$ 0,01	27,3 $\pm$ 11,7	0,31 $\pm$ 0,03	7,7 $\pm$ 1,3	4,8 $\pm$ 0,6
BFD A460I-F464I	162 $\pm$ 8,8	8,8 $\pm$ 0,9	37,9 $\pm$ 5	1,9 $\pm$ 0,07	19,4 $\pm$ 6,7	17,6 $\pm$ 3,4

Beim Vergleich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten ist selbst solch eine einfache Korrelation nicht mehr gegeben, da bei der wtBFD $v_{\max,(S)\text{-HPP}} \leq v_{\max,(R)\text{-HPP}}$ ist, bei der BFD A460I $v_{\max,(S)\text{-HPP}} \approx v_{\max,(R)\text{-HPP}}$ ist und bei den Varianten BFD F464I und BFD A460I-

F464I $v_{\max,(S)\text{-HPP}} \geq v_{\max,(R)\text{-HPP}}$ ist. Ein Vergleich von 2-HPP und Benzaldehyd als Substrat zeigt jedoch deutlich, dass die Synthese von 2-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd stark katalysiert ist im Vergleich zur Bildung aus dem komplementären 2-HPP Enantiomer. Hier beträgt der Unterschied mehr als drei Zehnerpotenzen (mU/mg vs. U/mg), womit auch die langsame Umwandlung der 2-HPP Enantiomere ineinander zu begründen ist.

Neben der Bildung des jeweilig komplementären 2-HPP Enantiomers kann auch die Bildung von freiem Benzaldehyd im Reaktionsansatz beobachtet werden. In Abbildung 6.19 (links) sind die Konzentrationsverläufe der Benzaldehydbildung bei verschiedenen (S)-HPP Konzentrationen für die wtBFD gezeigt. Es fällt auf, dass sich nach einer kurzen Anstiegsphase innerhalb der ersten Stunde jeweils eine konstante Benzaldehydkonzentration in den Reaktionsansätzen einstellt. Die Konzentrationsverläufe, vor allem nach längerer Reaktionszeit, können gut durch eine exponentielle Anpassung dargestellt werden. Trägt man die maximalen Endkonzentrationen von Benzaldehyd aus den exponentiellen Anpassungen gegen die (S)-HPP Konzentration auf, so erhält man eine sehr gut korrelierende lineare Abhängigkeit. Diese wird im Kapitel 6.5 näher diskutiert.

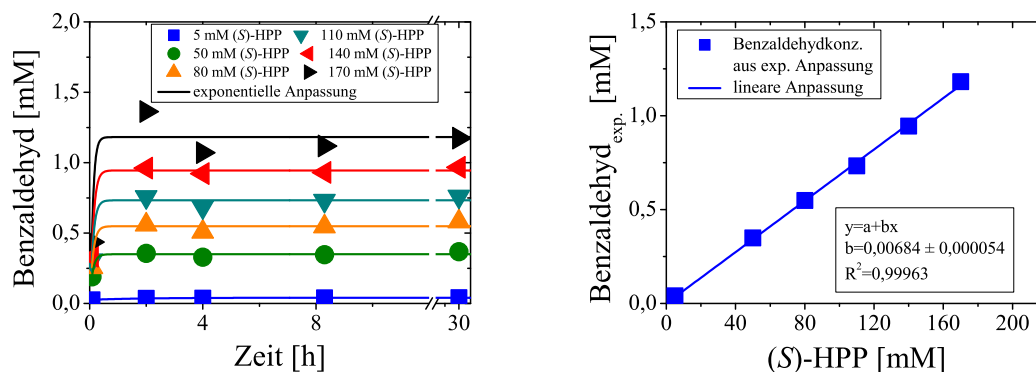


Abbildung 6.19: Konzentrationsverlauf der Benzaldehydbildung bei verschiedenen (S)-HPP Konzentrationen durch wtBFD bei 25 mM Acetaldehyd (links). Rechts: maximale Benzaldehydkonzentrationen aus der exponentiellen Anpassung der Messwerte in linearer Korrelation zur Substratkonzentration von (S)-HPP.

6.4.2 Acetaldehyd abhängige 2-HPP Racemisierung

Hierzu wurde den Reaktionsansätzen Acetaldehyd in den unterschiedlichen Konzentrationen 0, 25, 50, 200, 400 und 700 mM zugesetzt und die Reaktionen in 50 mM TEA-Puffer bei pH 7,5 durchgeführt. Die Cofaktoren ThDP und Mg^{2+} wurden jeweils in den Konzentrationen 0,5 und 2 mM zugegeben. Gestartet wurden die Reaktionsansätze durch Zugabe der jeweiligen BFD Variante bei 25°C.

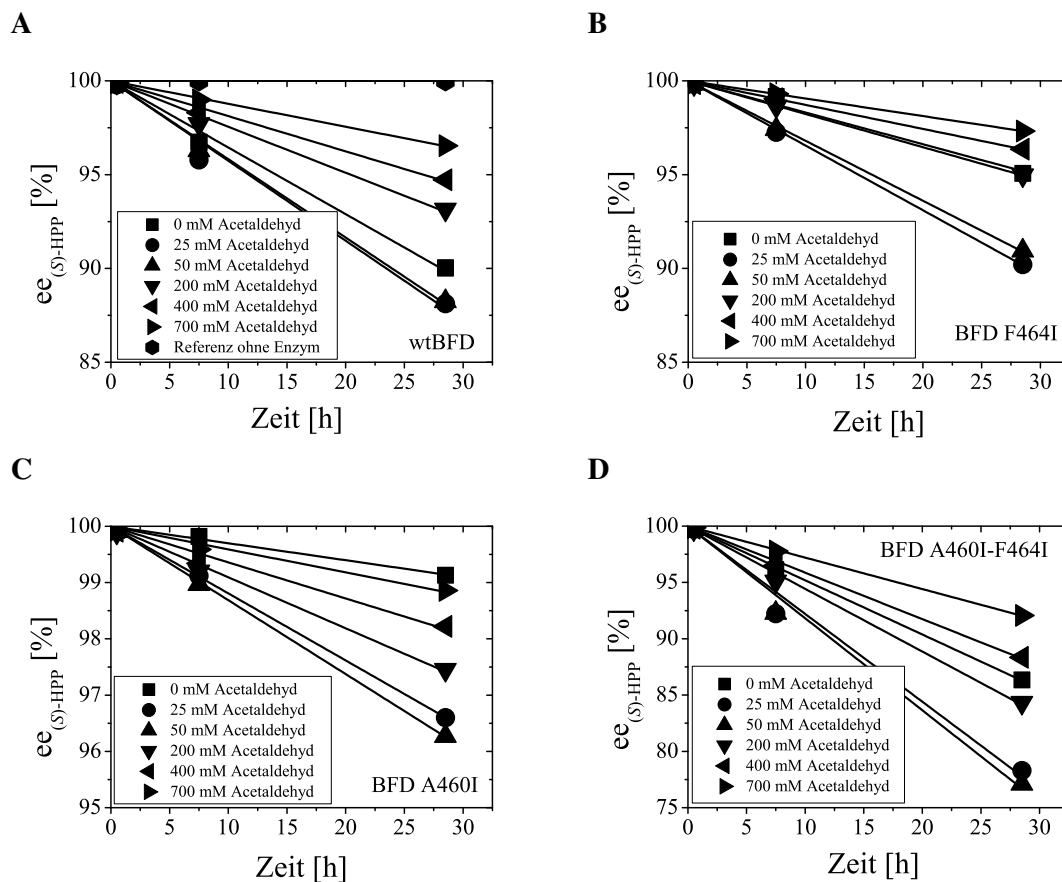


Abbildung 6.20: Zeitlicher Verlauf der Enantiomerenüberschüsse von 30 mM (S)-HPP in Abhängigkeit verschiedener Acetaldehydkonzentrationen für die BFD Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

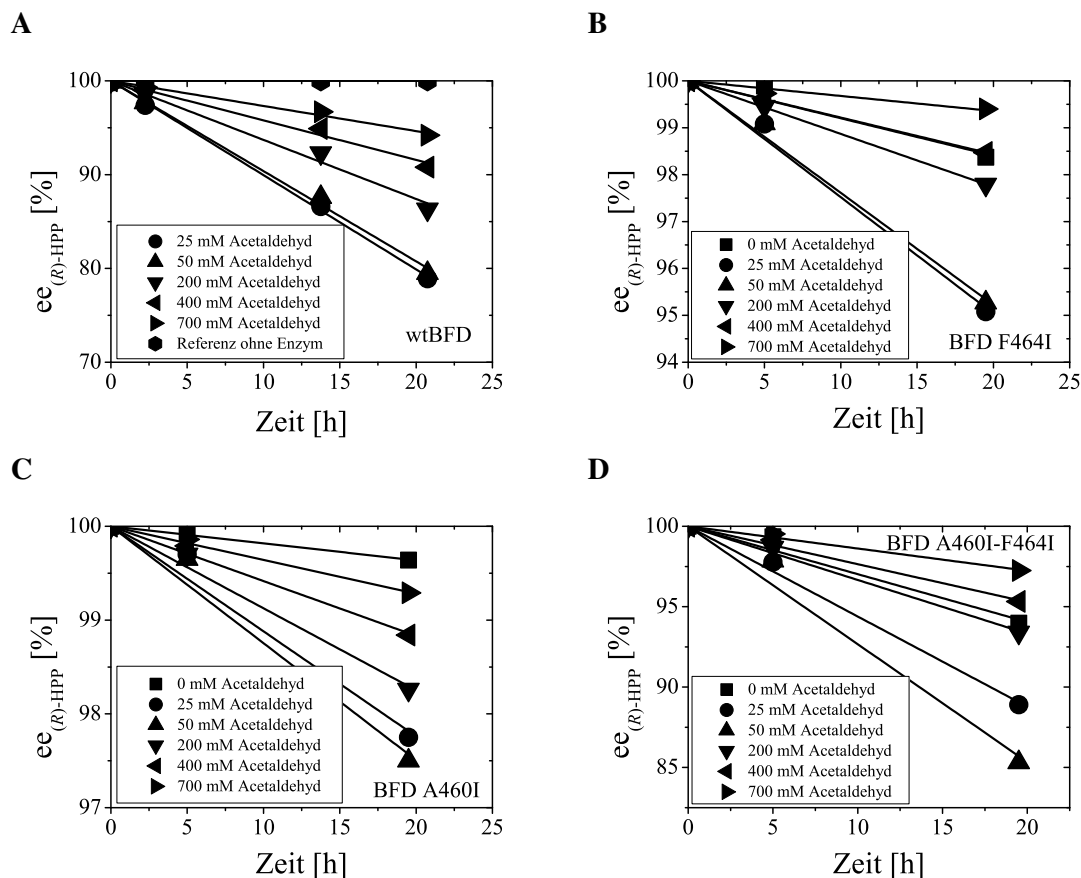


Abbildung 6.21: Zeitlicher Verlauf der Enantiomerenüberschüsse von 30 mM (R)-HPP in Abhängigkeit verschiedener Acetaldehydkonzentrationen für die BFD Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

Der ee des eingesetzten (S)-HPP bzw. (R)-HPP nimmt bei allen Varianten über die beobachtete Zeit deutlich ab (siehe Abbildung 6.20 und 6.21). Wenn auch die Abnahme bei den beiden Varianten BFD F464I und BFD A460I relativ moderat verläuft ($\Delta ee \leq 10\%$), so ist dies bei der wtBFD und der BFD A460I-F464I wesentlich signifikanter. Hier werden Unterschiede im Enantiomerenüberschuss von teilweise mehr als $\Delta ee = 20\%$ erreicht. Bei Acetaldehydkonzentrationen > 50 mM bzw. bei keinem Acetaldehyd in den Reaktionsansätzen verläuft die Abnahme des ee verlangsamt, sodass die maximale Abnahmegeschwindigkeit im Bereich zwischen 0-50 mM Acetaldehyd liegt. Verdeutlicht wird dies, wenn man die Bildungsraten von (R)-HPP aus (S)-HPP bzw. (S)-HPP aus (R)-HPP über die ersten 30 min durch lineare Regression bestimmt und gegen die Acetaldehydkonzentration aufträgt (Abbildung 6.22 und 6.23).

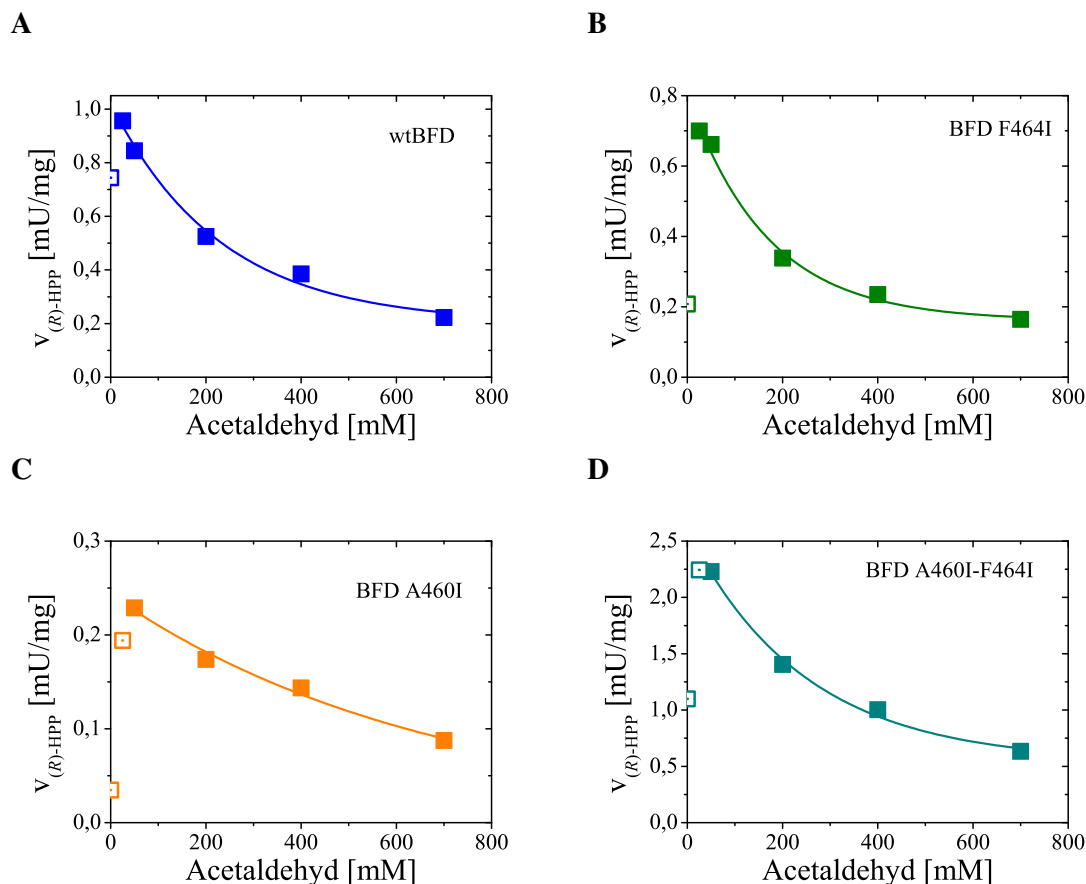


Abbildung 6.22: Bildungsrate von (R)-HPP aus 30 mM (S)-HPP bei verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte mit ausgefüllten Symbolen sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

Hier werden maximale (R)-HPP-Bildungsrate bzw. (S)-HPP Bildungsrate im unteren Acetaldehydkonzentrationsbereich (0-50 mM) von 0,23 bis 2,3 $\text{mU}_{(R)\text{-HPP}}/\text{mg}$ bzw. 0,22 bis 1,7 $\text{mU}_{(S)\text{-HPP}}/\text{mg}$ erreicht. Von besonderer Bedeutung ist hier der jeweilig weitere Verlauf der 2-HPP-Bildungsrate, da dieser mit steigender Acetaldehydkonzentration, nach Erreichen dieser lokalen Maxima, einer exponentiellen Abnahme entspricht. Vergleicht man dieses Verhalten mit der Bildungskinetik von 2-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd, so scheint dies zunächst paradox zu sein, da die Bildungsgeschwindigkeiten dort mit steigender Acetaldehydkonzentration ansteigen und nicht abnehmen (siehe Kapitel 4.3) (Wilcocks, Ward 1992).

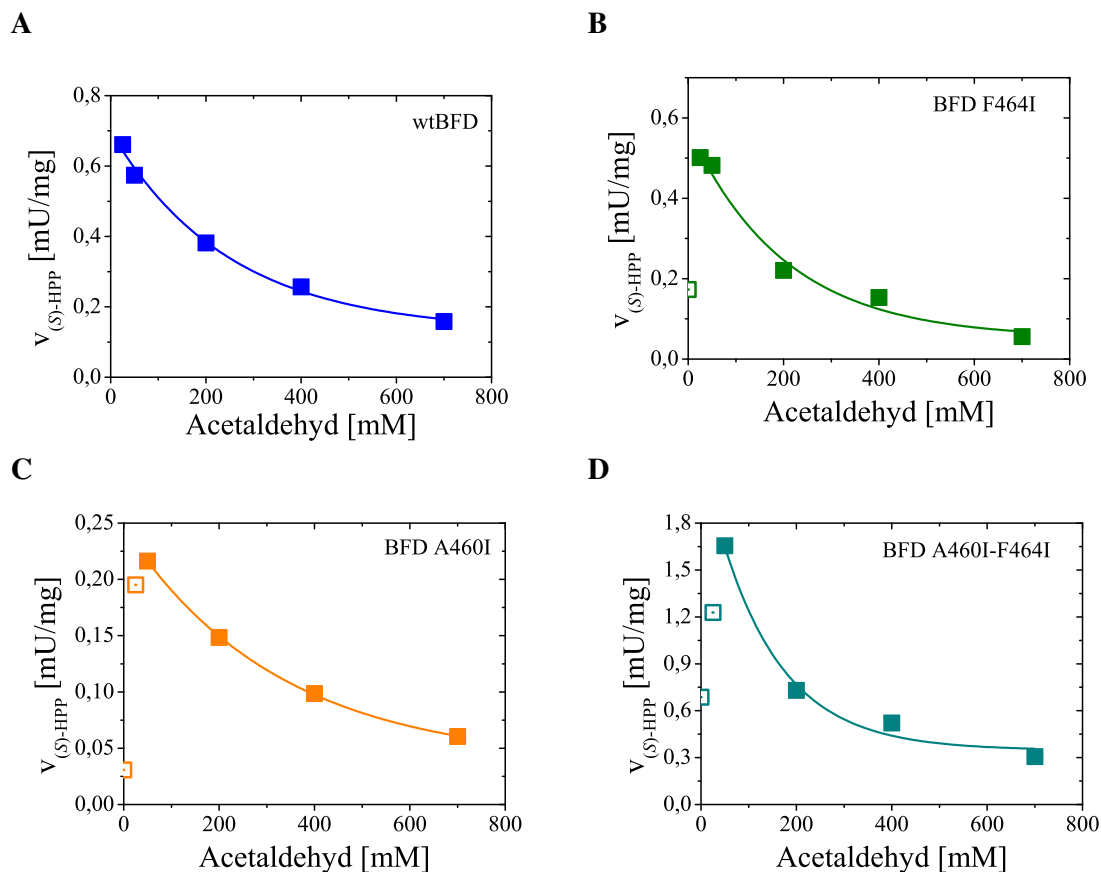


Abbildung 6.23: Bildungsraten von (S)-HPP aus 30 mM (R)-HPP bei verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte mit ausgefüllten Symbolen sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

Vergleicht man jedoch dieses Verhalten mit den Bildungsraten von freiem Benzaldehyd aus 2-HPP in den Reaktionsansätzen, so erkennt man, dass auch diese einer exponentiellen Abnahme mit steigender Acetaldehydkonzentration entsprechen (Abbildung 6.24 und 6.25). Hier werden allerdings maximale Bildungsraten von Benzaldehyd beobachtet, wenn kein Acetaldehyd im Reaktionsansatz vorliegt. Für Acetaldehydkonzentrationen im Bereich > 400 mM nimmt die Bildungsgeschwindigkeit jeweils einen Wert an, der je nach Variante für (S)-HPP als Substrat zwischen 0,15 und 0,25 $\text{mU}_{\text{Benzaldehyd}}/\text{mg}$ liegt und für (R)-HPP als Substrat zwischen 0,005 und 0,05 $\text{mU}_{\text{Benzaldehyd}}/\text{mg}$. Diese Werte sind allerdings nur makroskopische Werte, da lediglich frei werdender Benzaldehyd erfasst werden kann. Abreagierender Benzaldehyd wird hierbei nicht berücksichtigt, so dass die realen Bildungsraten um die Abreaktion des Benzaldehyds zurück zum 2-HPP ergänzt werden müssten. Doch selbst bei einer Näherung, in der man davon ausgeht, dass unter diesen Bedingungen racemisches 2-HPP zurück gebildet wird, würde sich am Kurvenverlauf tendenziell nur wenig ändern. Hier würde die Bildungsrate des detektierbaren Benzaldehyds um die Bildungsrate des jeweiligen 2-HPP Enantiomers ergänzt, wobei die 2-HPP

Bildungsraten selbst einer exponentiellen Abnahme folgen und somit die resultierenden reellen Bildungsraten ebenfalls einer exponentiellen Abnahme folgen. Richtiger Weise handelt es sich somit hier um die detektierbare Bildung von Benzaldehyd.

Von besonderer Bedeutung an dieser Stelle ist es jedoch, dass die Bildung des jeweilig korrespondierenden Enantiomers und somit die Veränderung des *ee* wie auch die Bildung von Benzaldehyd eine eindeutige Abhängigkeit von der Acetaldehydkonzentration des Systems aufweist, was eindeutig für einen enzymkatalysierten Reaktionsmechanismus spricht. Insgesamt scheint die Bildung von (*R*)-HPP aus (*S*)-HPP und umgekehrt einer Mischkinetik zu folgen, die zum Einen durch die Bildungskinetik von Benzaldehyd aus 2-HPP und zum Anderen aus der Bildungskinetik von (*R*)-HPP bzw. (*S*)-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd bestimmt wird. Die Umwandlung der beiden 2-HPP Enantiomere ineinander ist folglich ein zweistufiger Prozess, in dem zunächst das Substrat 2-HPP in Benzaldehyd und Acetaldehyd gespalten wird und diese anschließend in einer Rückreaktion wieder zu 2-HPP gekoppelt werden (Abbildung 6.15).

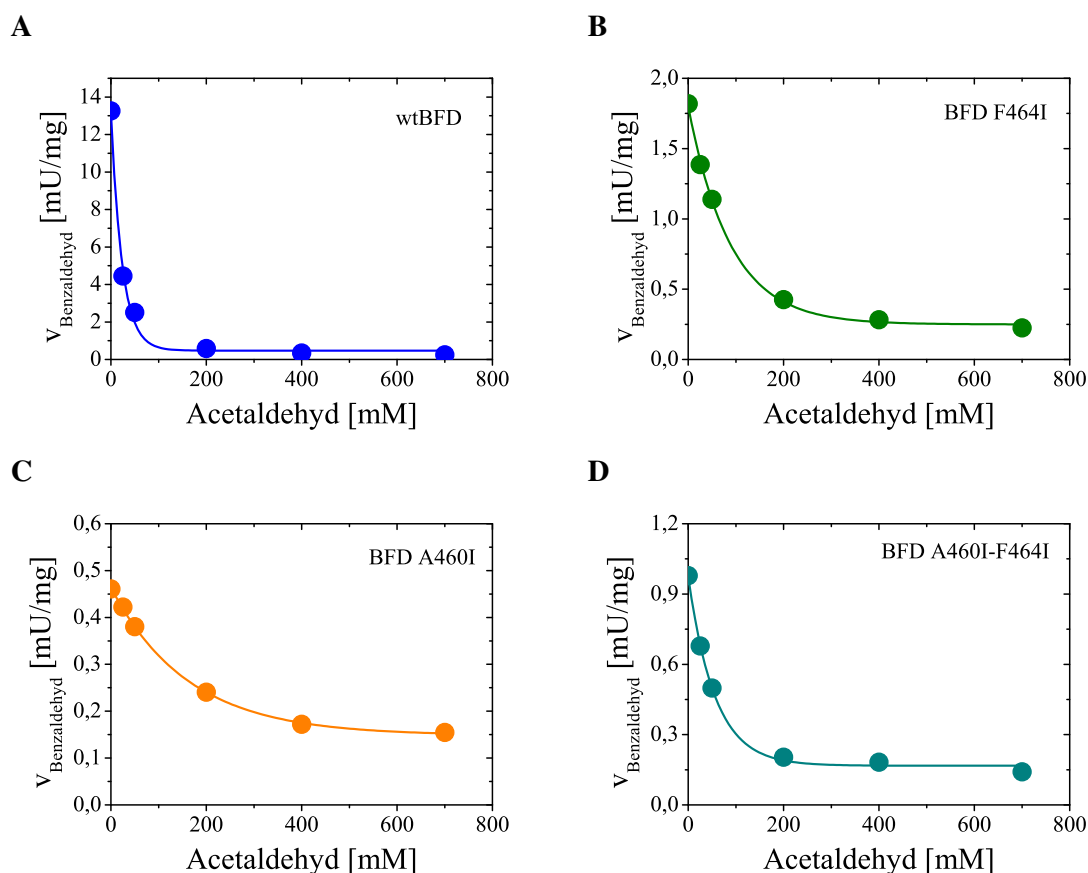


Abbildung 6.24: Detektierbare Bildung von freiem Benzaldehyd aus 30 mM (*S*)-HPP bei unterschiedlichen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

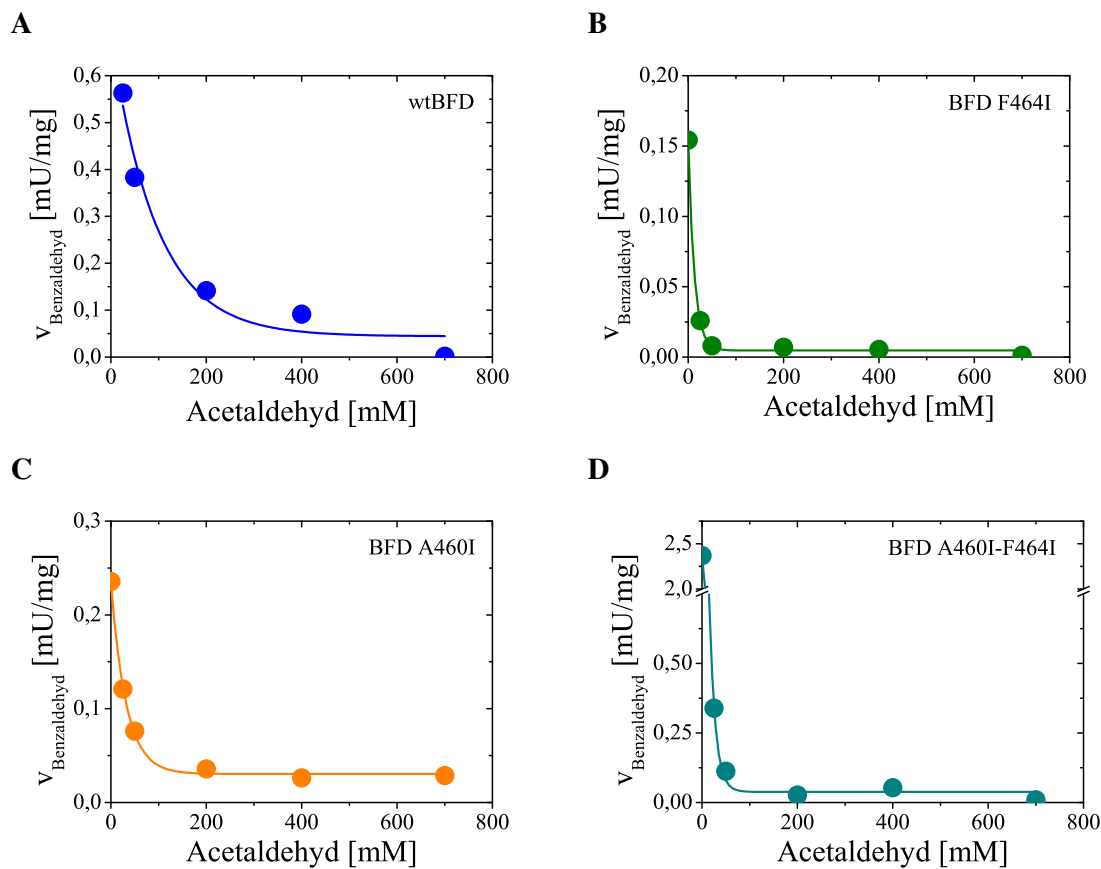


Abbildung 6.25: Detektierbare Bildung von freiem Benzaldehyd aus 30 mM (*R*)-HPP bei unterschiedlichen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

Um eine nicht enzymkatalysierte Aktivität auszuschließen, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Hierfür wurden 30 mM (*R*)-HPP und 25 mM Acetaldehyd als Substrat eingesetzt. Neben einer Positivkontrolle (Zugabe von wtBFD) wurden auch zwei Negativkontrollen durchgeführt, bei denen zum Einen inaktivierte wtBFD (30 min Inkubation bei 80°C) und zum Anderen der Enzyminhibitor 3-Chlormethylbenzoylphosphonat (3-Cl-MBP, 20 mM; siehe Kapitel 7) zugegeben wurde. Die eingesetzte Enzymmenge betrug bei allen drei Versuchen 33 $\text{U}_{2\text{-HPP}}$ wtBFD unter standardisierten Synthesebedingungen. Bei der Positivkontrolle fiel der *ee* nach 24 h Reaktionszeit auf einen Wert von $ee_{(R)\text{-HPP}} = 78\%$ ab, wohingegen bei den Negativkontrollen keine Abnahme des *ee* zu beobachten war. Auch konnte in den Negativkontrollen keine Bildung von Benzaldehyd beobachtet werden, wie es bei der Positivkontrolle der Fall ist. Hier steigt die Benzaldehydkonzentration nach 24 h auf einen Wert von 0,17 mM an.

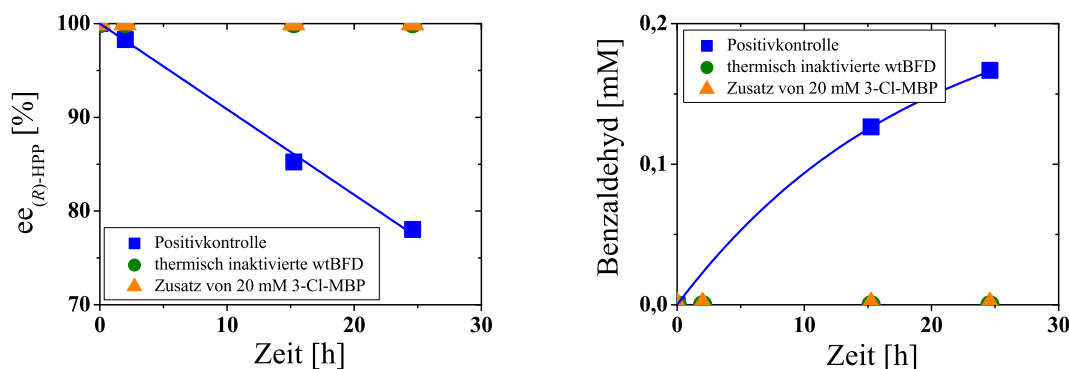


Abbildung 6.26: Kontrolle zur Racemisierung von (*R*)-HPP durch wtBFD sowie Entwicklung der Benzaldehydkonzentrationen in den Reaktionsansätzen. Eingesetzt wurden 30 mM (*R*)-HPP und 25 mM Acetaldehyd sowie wtBFD als Positivkontrolle, thermisch inaktivierte wtBFD und 20 mM 3-Cl-MBP als Negativkontrollen. Reaktionsbedingungen: 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg²⁺, 0,5 mM ThDP, 25°C.

6.5 Gleichgewichtszustand von 2-HPP, Benzoin, Benzaldehyd und Acetaldehyd

Neben den bereits bekannten Reaktivitäten der BFD, der Spaltung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO₂ sowie der Carboligationsreaktion zweier Aldehyde zu 2-Hydroxyketonen konnte hier nachgewiesen werden, dass auch die Produkte der Carboligationsreaktionen (*R*)-Benzoin sowie (*S*)-HPP und (*R*)-HPP als Substrate fungieren können. Für (*R*)-Benzoin wurde die Spaltung durch Bildung von Benzaldehyd sowie (*S*)- und (*R*)-HPP nachgewiesen. Für (*S*)- und (*R*)-HPP konnte die Bildung von Benzaldehyd sowie des jeweilig komplementären Enantiomers gezeigt werden. Die Spaltung der 2-Hydroxyketone bzw. die Umwandlung ineinander verläuft katalytisch betrachtet wesentlich langsamer, da hier die Aktivitäten im Bereich von mU/mg liegen im Vergleich zu U/mg bei der Synthese von 2-HPP unter standardisierten Bedingungen. Die Decarboxylaseaktivität von Benzoylformiat beträgt für die wtBFD 400 U/mg (Gocke et al. 2008), die Bildung von (*R*)-HPP aus (*S*)-HPP hingegen nur etwa 1 mU/mg. Somit ist die Spaltung des 2-HPP etwa um den Faktor $4 \cdot 10^5$ langsamer als die physiologische Aktivität der 2-Ketocarbonsäurespaltung.

Im Reaktionsmechanismus muss dennoch berücksichtigt werden, dass es sich bei der Bildung von (*R*)-Benzoin sowie der Bildung von (*S*)-HPP und (*R*)-HPP um reversible Reaktionen handelt, auch wenn die Aktivitäten um etwa drei Zehnerpotenzen auseinander liegen.

Vergleicht man die Umwandlung der 2-HPP Antipoden (*S*)-HPP und (*R*)-HPP ineinander mit der Bildung von 2-HPP aus (*R*)-Benzoin und Acetaldehyd, so fällt auf, dass bei beiden Reaktionen auch Benzaldehyd gebildet wird. Aus der thermodynamischen Betrachtung des Reaktionssystems muss es somit ein Gleichgewicht aller beteiligten Reaktionspartner geben (siehe Abbildung 6.14). Im thermodynamischen Gleichgewicht liegen alle Stoffe in einer Gleichgewichtskonzentration vor, sodass die Reaktionsenthalpie einen konstanten Wert einnimmt. Für die freie Standardenthalpie ΔG° gilt dann:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

und

$$\Delta G^\circ = RT \cdot \ln K$$

Im vollständigen Gleichgewicht sind die Enthalpieänderungen ΔG° und ΔH° gleich null, so dass es auch zu keiner Entropieänderung des Systems mehr kommt.

Betrachtet man die Gleichgewichtskonzentrationen von Benzoin, 2-HPP, Acetaldehyd und Benzaldehyd, so befindet sich das System in Bezug auf die Standardreaktionsenthalpie ΔH° ebenfalls im Gleichgewicht und somit ist $\Delta H^\circ = 0$. Ein besonderer Fall ist jedoch eine Racemisierung, da energetisch gesehen beide Enantiomere die gleiche Bildungsenthalpie besitzen. Für die Umwandlung von Enantiomeren gilt daher ebenfalls $\Delta H^\circ = 0$. Allerdings läuft eine Racemisierung, falls möglich, freiwillig ab, sodass die freie Standardenthalpie $\Delta G^\circ < 0$ ist und die Triebkraft somit in einer Erhöhung der Entropie begründet ist.

Im BFD katalysierten Gleichgewicht von 2-HPP, Benzoin, Benzaldehyd und Acetaldehyd wird 2-HPP also als racemische Mischung vorliegen und Benzoin lediglich als (*R*)-Benzoin, da (*S*)-Benzoin durch BFD nicht gebildet wird. Auf Grund der Umsatzkurven zur 2-HPP Synthese aus Benzaldehyd und Acetaldehyd, sowie den kinetischen Parametern zur C-C Bindungsknüpfung und Spaltung kann ebenfalls darauf geschlossen werden, dass das Gleichgewicht weit auf der Seite des 2-HPP als Hauptprodukt liegt. Um die Gleichgewichtskonzentrationen der Substrate zu erreichen, wurde eine racemische Mischung von 140 mM 2-HPP verwendet, sowie 50 mM Acetaldehyd. Da Acetaldehyd bei der Spaltung von 2-HPP nur in equimolaren Mengen gebildet wird und durch Verdampfung bei der Probennahme aus der Reaktionslösung entfernt werden könnte, werden geringe Mengen zugegeben.

Wie in Abbildung 6.27 zu erkennen ist, steigt in allen vier Reaktionsansätzen mit der Zeit die Konzentration an Benzaldehyd und (*R*)-Benzoin an, wobei die Konzentrationsverläufe gut durch einen exponentiellen Fit angenähert werden können. Bei der Variante BFD A460I ist die Aktivität allerdings zu gering, um eine signifikante (*R*)-Benzoinbildung über den betrachteten Zeitraum zu beobachten (Abbildung 6.27 (C)). Dies liegt vermutlich daran, dass bei dieser Variante die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten sehr niedrig sind und somit Änderungen in den Reaktionsgeschwindigkeiten nur schwer zu verfolgen sind. Bei den anderen Varianten hat nach etwa 90 h die Benzaldehydkonzentration einen Wert zwischen 1 mM und 1,25 mM sowie die (*R*)-Benzoinkonzentration einen Wert zwischen 0,25 mM und 0,75 mM. Die Konzentration des eingesetzten 2-HPP bleibt hingegen jeweils konstant bei 140 mM.

Zu berücksichtigen ist ebenfalls, dass sich der Enantiomerenüberschuss von $ee_{2-HPP} = 0 \%$ in keinem Reaktionsansatz signifikant ändert (siehe Abbildung 6.28). Dies ist ein Indiz dafür, dass sich die Reaktionen bezüglich der 2-HPP Racemisierung bereits im thermodynamischen Gleichgewicht befinden.

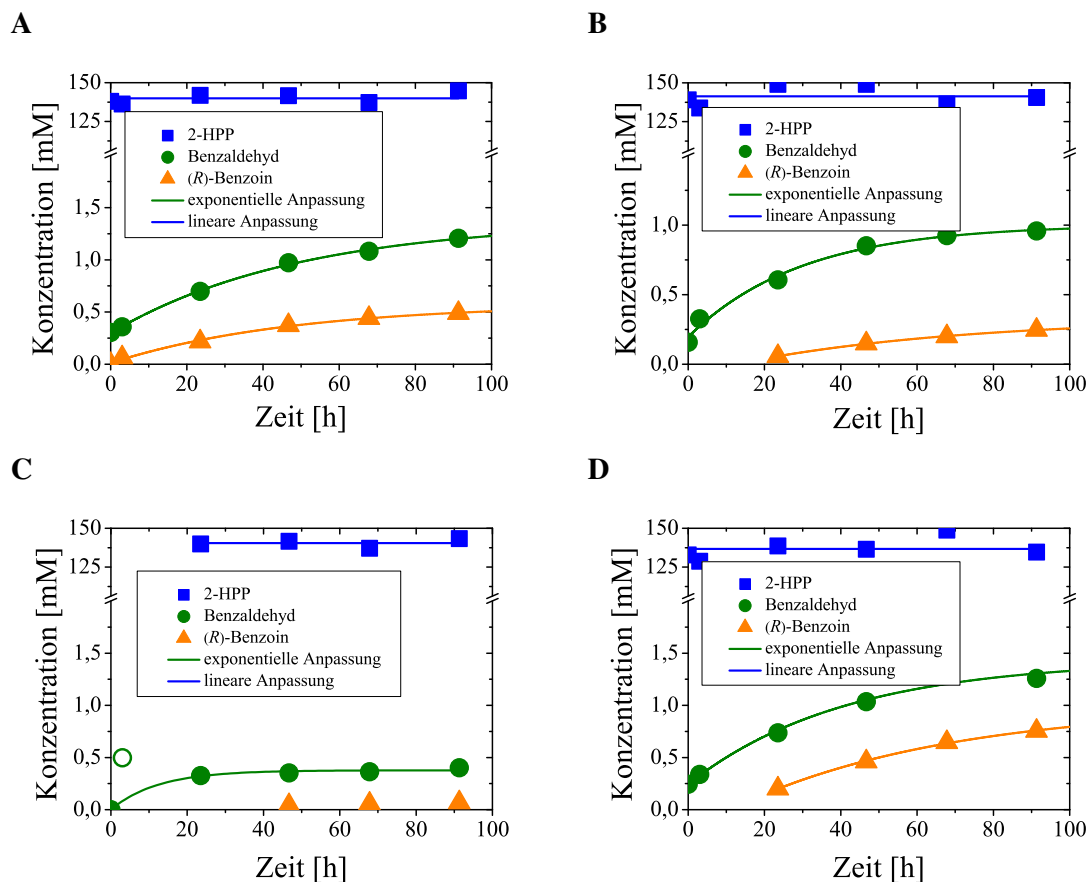


Abbildung 6.27: Übersicht der Konzentrationsverläufe von 2-HPP, Benzaldehyd und (R)-Benzoin bei der Gleichgewichtseinstellung der Substrate durch wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Reaktionsbedingungen: 140 mM rac-2-HPP, 50 mM Acetaldehyd, 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

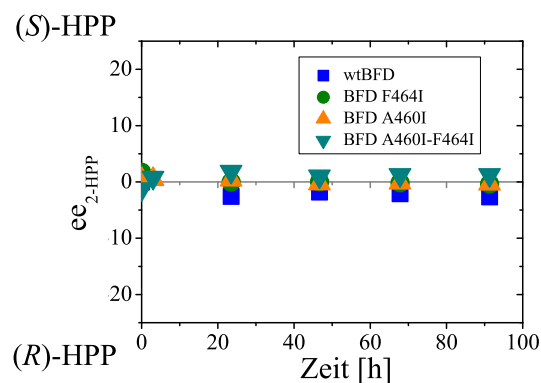


Abbildung 6.28: Verlauf des Enantiomerenüberschusses (ee) von 2-HPP bei der Gleichgewichtseinstellung der Substrate 2-HPP, Benzaldehyd, Acetaldehyd und (R)-Benzoin für die Varianten wtBFD, BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Reaktionsbedingungen: 140 mM rac-2-HPP, 50 mM Acetaldehyd, 50 mM TEA-Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP, 25°C.

Aus den Versuchen zur Bildung von 2-HPP aus (*R*)-Benzoin und Acetaldehyd, der Racemisierung der reinen 2-HPP Enantiomere und der Einstellung der Gleichgewichtskonzentrationen kann somit eindeutig nachgewiesen werden, dass die Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd, sowie deren Reaktionsprodukte 2-HPP und (*R*)-Benzoin miteinander im Gleichgewicht stehen.

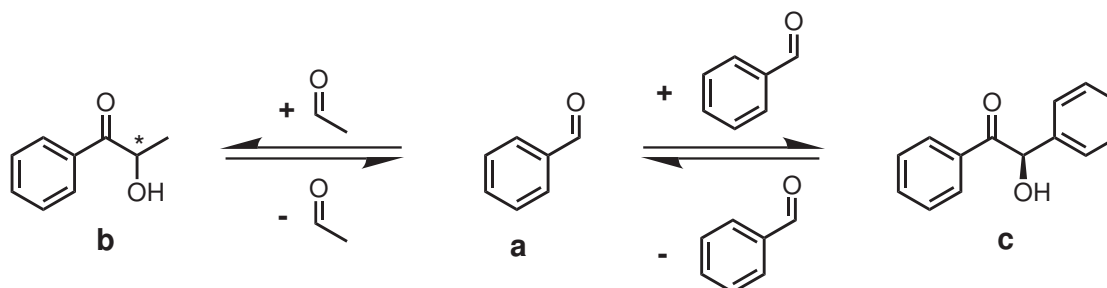


Abbildung 6.29: Schematische Darstellung der Gleichgewichtsbeziehung zwischen dem Donorsubstrat Benzaldehyd (a) und den Akzeptorsubstraten Benzaldehyd und Acetaldehyd sowie den Carboligationsprodukten 2-HPP (b) und (*R*)-Benzoin.

Betrachtet man dieses Reaktionsgleichgewicht als reversibles, gekoppeltes und isoliertes System, so kann formal folgende Reaktionsgleichung zur Beschreibung herangezogen werden:



Stellt man für diese Beziehung die Gleichgewichtskonstante *K* nach dem Massenwirkungsgesetz auf, so erhält man:

$$K = \frac{[(\textit{R})\text{-Benzoin}] \cdot [2\text{-HPP}]}{[\text{Benzaldehyd}]^3 \cdot [\text{Acetaldehyd}]}$$

Bestimmt man die Gleichgewichtskonzentrationen für alle Reaktionsteilnehmer, so ist die Gleichgewichtskonstante unter den oben genannten Annahmen erhältlich. Für die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten werden folgende weitere Näherungen gemacht:

- für die 2-HPP Konzentration wird der Mittelwert der Messwerte genommen, da keine signifikante Verringerung der 2-HPP Konzentration durch Benzoin- und Benzaldehydbildung mittels HPLC messbar ist.
- die Acetaldehydkonzentration wird der Anfangskonzentration gleichgesetzt. Die Bildung von Acetoin sowie der Austrag von Acetaldehyd durch Verdampfung aus dem geschlossenen System werden bei der gewählten Acetaldehydkonzentration als vernachlässigbar angesehen.
- die Konzentrationen für (*R*)-Benzoin und Benzaldehyd werden aus den exponentiellen Kurvenanpassungen berechnet für $t \rightarrow \infty$.

Für die BFD A460I wird die Gleichgewichtskonstante experimentell hier nicht bestimmt, da keine Gleichgewichtskonzentration für (*R*)-Benzoin im Experiment erreicht wird.

Tabelle 6.7: Übersicht der bestimmten Gleichgewichtskonzentrationen von 2-HPP, Acetaldehyd, Benzaldehyd und (*R*)-Benzoin, sowie den berechneten Gleichgewichtskonstanten.

Variante	2-HPP [mM]	Acetaldehyd [mM]	Benzaldehyd [mM]	(<i>R</i>)-Benzoin [mM]	K [L ² /mol ²]
wtBFD	141,3	50	1,37 ± 0,04	0,58 ± 0,04	6,3*10 ⁵
BFD F464I	141,3	50	1,0 ± 0,05	0,34 ± 0,02	9,5*10 ⁵
BFD A460I-F464I	136,7	50	1,43 ± 0,12	1,0 ± 0,1	9,2*10 ⁵

Die bestimmten Gleichgewichtskonstanten besitzen mit 6,3 - 9,5*10⁵ L²/mol² sehr ähnliche Werte. Durch den sehr großen Wert der Gleichgewichtskonstante wird nochmals verdeutlicht, dass das Gleichgewicht des ganzen Reaktionssystems weit auf der Seite der Produkte 2-HPP und (*R*)-Benzoin liegt, wobei hier 2-HPP eindeutig das Hauptprodukt darstellt. Bei der wtBFD liegt beispielsweise ein 245-facher Überschuss an 2-HPP zu (*R*)-Benzoin vor. Durch dieses Reaktionsgleichgewicht wird auch nochmals deutlich, dass prinzipiell alle Reaktionen der wtBFD reversibel sind und somit auch die Bildung von anderen Produkten möglich ist, wie z.B. die Bildung von 2-HPP aus (*R*)-Benzoin und Acetaldehyd. Die sehr niedrige Benzaldehydkonzentration im Reaktionsgleichgewicht zeigt jedoch auch, dass diese Reaktionen sehr langsam verlaufen, da die K_M-Werte für Benzaldehyd (bei der 2-HPP Synthese) wesentlich größer sind als die vorhandenen Gleichgewichtskonzentrationen.

Prinzipiell werden Konzentrationsgleichgewichte durch Katalysatoren lediglich schneller erreicht, die Lage eines Gleichgewichts jedoch nicht verändert. Idealerweise sollten daher die berechneten Gleichgewichtskonstanten ebenfalls denselben Wert besitzen. Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Gleichgewichtskonzentration von Acetaldehyd analytisch nicht bestimmt werden konnte und auch die Bildung von Acetoin vernachlässigt wurde. Zwar ist die Acetoinbildung bei den BFD-Varianten sehr gering (Siegert 2000), jedoch wurde sie kinetisch bislang noch nicht detailliert untersucht. Richtigerweise müsste sie daher ebenfalls in den Reaktionsmechanismus mit aufgenommen werden, sowie auch die Gleichgewichtskonzentration an Acetaldehyd analytisch bestimmt werden. Dennoch passen die hier ermittelten Gleichgewichtskonstanten sehr gut zueinander.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen kann der vorhandene Reaktionsmechanismus zur Decarboxylierung von Benzoylformiat (Polovnikova et al. 2003) und der einfachen Bildung von (*S*)-HPP (Iding et al. 2000) erweitert werden (Abbildung 6.30). In dem neu vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus werden folgende Grundlagen und Reaktionsschritte berücksichtigt:

- Der Cofaktor ThDP liegt im Gleichgewicht mit seiner reaktiven, deprotonierten Ylid-Form vor.

- Benzoylformiat wird als Mandelyl-ThDP Komplex (1) gebunden und der Enamin-Carbanion Komplex irreversibel unter CO_2 -Abspaltung gebildet (Mandelyl-ThDP nachgewiesen durch Tittmann in Bruning et al. (Bruning et al. 2009).
- Benzaldehyd kann reversibel an das Ylid gebunden werden unter Ausbildung des tetrahedralen Hydroxybenzyl-ThDP Komplexes (2) (nachgewiesen durch Tittmann in Bruning et al. 2009), aus dem durch Deprotonierung der Enamin-Carbanion Komplex reversibel gebildet werden kann.
- Durch Bindung von Acetaldehyd als Akzeptorsubstrat an C2 des Enamin-Carbanion Komplexes entsteht ein neuer tetrahedraler Komplex, das 1-Phenyl-1,2-dihydroxypropyl-ThDP (3), welches durch reversible Abspaltung von 2-HPP zum Ylid reagieren kann.
- Durch Bindung von Benzaldehyd als Akzeptorsubstrat an C2 des Enamin-Carbanion Komplexes entsteht ein weiterer tetrahedraler Komplex, das 1,2-Dihydroxy-1,2-diphenylethyl-ThDP (4), welches durch reversible Abspaltung von (*R*)-Benzoin zum Ylid reagieren kann.
- Die chirale Information der Produkte 2-HPP bzw. (*R*)-Benzoin ist in den tetrahedralen Übergängszuständen bereits enthalten, da diese bereits über das Chiralitätszentrum der Produkte verfügen.
- Alle Reaktionsschritte sind prinzipiell reversibel, wobei die Decarboxylaseaktivität bisher als quasi-irreversibel gilt.

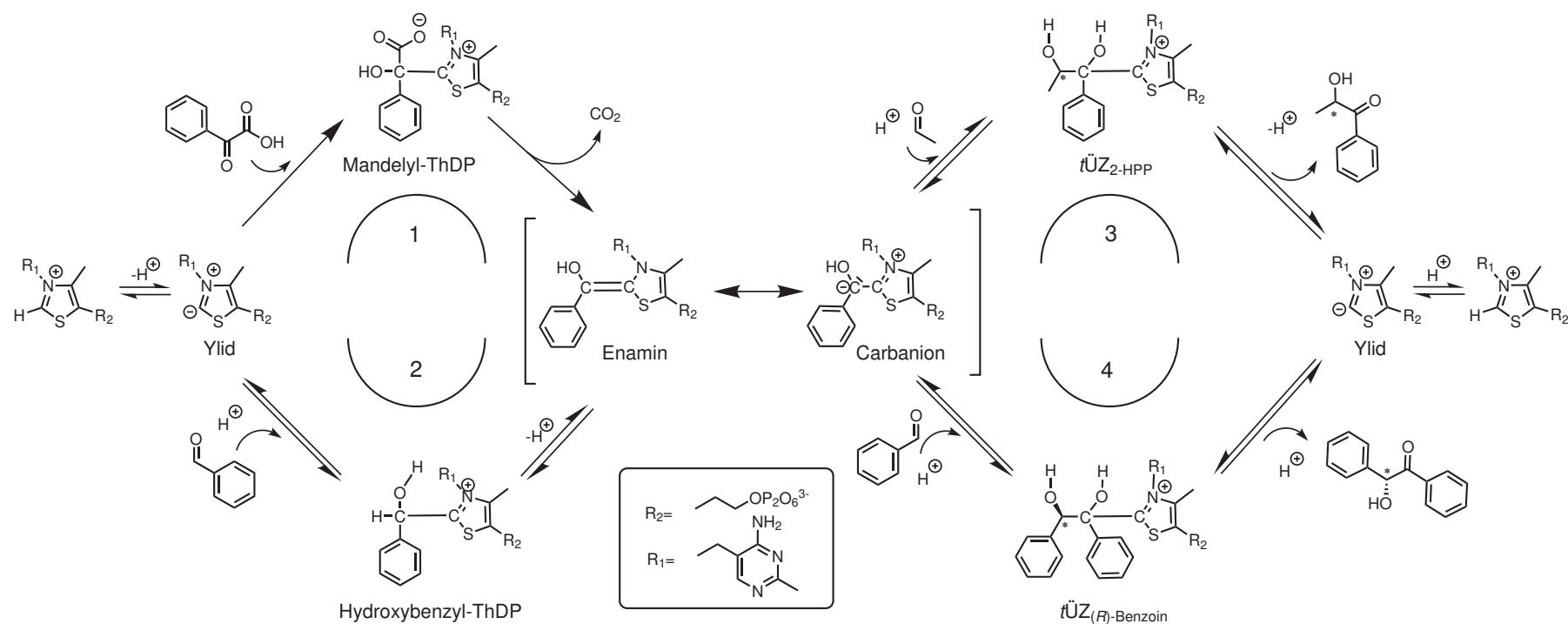


Abbildung 6.30: Erweiterter Reaktionsmechanismus der BFD basierend auf den Reaktionsmechanismen von Polovnikova et al. und Iding et al. (Polovnikova et al. 2003), (Iding et al. 2000). Neben der irreversiblen Decarboxylierung (1) von Benzoylformiat ist auch die Bindung von Benzaldehyd (2), 2-HPP (3) und (R)-Benzoin (4) an die Ylid-Form des Cofaktors ThDP möglich. Über einen jeweiligen tetrahedralen Übergangszustand und durch Abspaltung des Akzeptor-Elektrophils (Proton (2), Acetaldehyd (3) bzw. Benzaldehyd (4); Abspaltung von CO_2 verläuft irreversibel (1)), wird die gemeinsame Form des aktivierten Aldehyds gebildet: der Enamin-Carbanion Komplex. Als tetraedrale Übergangszustände werden das Mandelyl-ThDP (1), Hydroxybenzyl-ThDP (2), 1-Phenyl-1,2-dihydroxypropyl-ThDP = $t\ddot{U}Z_2\text{-HPP}$ (3) und 1,2-Dihydroxy-1,2-diphenylethyl-ThDP ($t\ddot{U}Z_{(R)}\text{-Benzoin}$ (4)) gebildet.

Durch diesen Reaktionsmechanismus können neben den bereits bekannten Aktivitäten der BFD (Decarboxylierung von Benzoylformiat, Carbolygation von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu 2-HPP und (*R*)-Benzoin) auch die Bildung von 2-HPP aus (*R*)-Benzoin und Acetaldehyd, sowie die Racemisierung von 2-HPP erklärt werden. Beispielsweise wird bei der Racemisierung von (*S*)-HPP zunächst das (*S*)-HPP an die Ylid-Form des ThDP gebunden, wobei es zur Ausbildung des 1-Phenyl-1,2-dihydroxypropyl-ThDP Komplexes (3) kommt. Nach Abspaltung von Acetaldehyd wird der Enamin-Carbanion Komplex erhalten, aus dem durch erneute Bindung des Acetaldehyds wiederum der 1-Phenyl-1,2-dihydroxypropyl-ThDP Komplex (3) entsteht. Aus diesem kann schließlich das Produkt (*R*)-HPP abgespalten werden. Da der 1-Phenyl-1,2-dihydroxypropyl-ThDP Komplex bereits die chirale Information des Produktes 2-HPP enthalten muss, muss auch er in zwei Formen vorliegen können: sowohl in der (*S*)-Form, wie auch in der (*R*)-Form. Entscheidend dafür, welches Enantiomer letztendlich gebildet wird, ist somit die Bindung des Acetaldehyds als Akzeptorsubstrat an den Enamin-Carbanion Komplex, da in diesem reversiblen Schritt die chirale Information entsteht bzw. verloren geht. Dasselbe gilt für die Bildung bzw. Spaltung von (*R*)-Benzoin. Da hier jedoch nur das (*R*)-Benzoin als Produkt gebildet bzw. als Substrat (Racematspaltung) akzeptiert wird, kann wahrscheinlich nur die (*R*)-Form des Übergangszustandes 1,2-Dihydroxy-1,2-diphenylethyl-ThDP (4) gebildet werden. Da sowohl bei der Bildung des 2-HPP wie auch beim (*R*)-Benzoin der prochirale Enamin-Carbanion Komplex Ausgangsstufe bei der Bindung des Akzeptorsubstrates ist, muss die Entscheidung, ob die (*R*)- oder (*S*)-Form des tetrahedralen Intermediates gebildet wird, in der Ausrichtung des Akzeptors zum Enamin-Carbanion begründet sein. Die Erklärung der Produktchiralität beim 2-HPP durch eine solche Substratausrichtung wurde bereits von Iding et al. durch den Angriff des Acetaldehyds aus der *re*- bzw. *si*- Ebene beschrieben (Iding et al. 2000). Eine weiterführende, strukturelle Erklärung der unterschiedlichen Ausrichtung des Akzeptorsubstrates wurde durch Pohl et al. sowie Gocke et al. durch Bildung einer Substrattasche in der *active site* gegeben (Knoll et al. 2006), (Gocke et al. 2008). Hier wurden die Strukturen von BFD und BAL sowie verschiedener Mutanten miteinander verglichen und die Ausbildung einer sogenannten (*S*)-Tasche ((*S*)-Pocket) bei der BFD gezeigt, in der Benzaldehyd aus sterischen Gründen nicht gebunden werden kann und somit lediglich eine Form des Benzoin, das (*R*)-Benzoin, gebildet werden kann.

Durch dieses nun erweiterte Reaktionsmodell ist es auch erklärbar, warum die Racemisierungsgeschwindigkeit des 2-HPP von der Acetaldehydkonzentration abhängig ist. Für die Racemisierung muss der tetrahedrale Übergangszustand ($t\ddot{U}Z_{2-HPP}$ (3)) in Acetaldehyd und das Enamin-Carbanion (EC) gespalten werden. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, muss demzufolge dieser Reaktionsschritt vom $t\ddot{U}Z_{2-HPP}$ zum EC beschleunigt ablaufen. Betrachtet man das Massenwirkungsgesetz für diese Teilreaktion, so erhält man den Ausdruck:

$$K = \frac{[EC]}{[t\ddot{U}Z_{2-HPP}] * [Acetaldehyd]}$$

Während der Racemisierung stellt sich das Gleichgewicht aus EC, $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ und Acetaldehyd ein. Wird die Acetaldehydkonzentration erhöht, so muss die $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ Konzentration erniedrigt und/oder die EC Konzentration erhöht werden. Eine Verringerung der $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ Konzentration bedeutet jedoch folglich auch eine verringerte Abreaktion von $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ zum EC, was eine verringerte Gesamtreaktion der 2-HPP Racemisierung bedeutet. Die teilweise verringerten Reaktionsraten bei 0 mM und 25 mM Acetaldehyd (siehe Abbildung 6.22 und 6.23) resultieren vorraussichtlich daher, dass hier der Anteil an Acetaldehyd für die Reaktion zu gering ist und somit die Rückreaktion vom EC zum $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ substratlimitiert verläuft.

Die Erhöhung der Reaktionsraten durch Erhöhung der 2-HPP Konzentration sind ebenfalls erklärbar, da dies einer einfachen Substraterhöhung für die Bildung des $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ aus dem Ylid und 2-HPP entspricht. Hier wird analog die $t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$ Konzentration durch die 2-HPP Konzentration erhöht, wodurch mehr aktiviertes Substrat ($t\ddot{U}Z_{2\text{-HPP}}$) für die Reaktion zur Verfügung steht. Die Abflachung der Bildungsraten in Abhängigkeit der 2-HPP Konzentration (siehe Abbildung 6.17 und 6.18) entspricht einer normalen Sättigungskinetik für 2-HPP.

Qualitativ ist mit der Reversibilität des gesamten Reaktionssystems auch der Abfall der Enantioselektivität bei den 2-HPP Umsatzkurven erklärbar (siehe Abbildung 6.2-6.5). Betrachtet man die $ee_{2\text{-HPP}}$ Werte bei der Synthese in Abhängigkeit von der Benzaldehydkonzentration, so erhält man die Abhängigkeit von höheren $ee_{(S)\text{-HPP}}$ Werten bei geringeren Benzaldehydkonzentrationen (bzw. geringere $ee_{(R)\text{-HPP}}$ Werte für die Variante BFD A460I-F464I) (siehe Abbildung 4.6 und Siegert et al. Siegert 2000). Die Verringerung der Enantioselektivität für $ee_{(S)\text{-HPP}}$ im Laufe der Reaktion (bei abnehmender Benzaldehydkonzentration unter steigendem Umsatz) verläuft somit entgegengesetzt der Beobachtung für steigende $ee_{(S)\text{-HPP}}$ Werte bei Verringerung der Benzaldehydkonzentration (unter Synthesebedingungen). Als Grund für diese Abnahme des $ee_{(S)\text{-HPP}}$ kann zum Teil die einsetzende Racemisierung des (S)-HPP betrachtet werden, die parallel zur Synthese abläuft. Bei der Variante BFD A460I-F464I verlaufen beide Effekte der Benzaldehydkonzentration und der Racemisierung in die gleiche Richtung (zu geringeren $ee_{(R)\text{-HPP}}$ Werten bei geringerer Benzaldehydkonzentration), so dass es hier zu einer Überlagerung beider Effekte und somit zum Abfall des $ee_{(R)\text{-HPP}}$ während des Umsatzes kommt.

Neben der bereits bekannten Bildung von (R)-Benzoin aus Benzaldehyd kann auch die Bildung von 2-HPP aus (R)-Benzoin und Acetaldehyd erklärt werden. Diese erfolgt über die Bindung des (R)-Benzoins als Substrat an das Ylid und der anschließenden Bildung des Enamin-Carbanions (EC, Reaktionsweg 4; siehe Abbildung 6.30). Das EC kann mit Acetaldehyd zum Produkt 2-HPP weiterreagieren (3). Da lediglich (R)-Benzoin als Substrat akzeptiert wird, kommt es beim Einsatz von rac-Benzoin zu einer klassischen Racematspaltung mit den Produkten 2-HPP und (S)-Benzoin (siehe Abbildung 6.8-6.11). Hinzu kommt, dass auch bei der Benzoin synthese ausgehend von Benzaldehyd nur die (R)-Form gebildet wird. Dies bedeutet, dass in der *active site* nur die (R)-Form des tetrahedralen Übergangszustandes für Benzoin ($t\ddot{U}Z_{(R)\text{-Benzoin}}$) gebildet werden kann. Die Erklärung hierzu liegt wieder in der Betrachtung der sogenannten (S)-Tasche (Knoll et al.

2006), (Gocke et al. 2008), in der Benzaldehyd aus sterischen Gründen als Substrat nicht gebunden werden kann und es somit zu keiner passenden Ausrichtung von EC und Benzaldehyd kommen kann, aus der ein $r\ddot{U}Z_{(S)\text{-Benzoin}}$ gebildet werden könnte. Das hier vorgestellte Modell wird durch die Interpretation der Kristallstrukturen aus Kapitel 8 weiter verifiziert.

6.6 Kurzzusammenfassung

Die reversible Bildung von 2-HPP und Benzoin aus den Substraten Benzaldehyd sowie Acetaldehyd wurde in diesem Kapitel näher untersucht. Aus den Versuchen lassen sich folgende Ergebnisse bezüglich des Reaktionsmechanismus für die BFD ableiten:

- Als Hauptprodukt wird 2-HPP gebildet, als Nebenprodukt (*R*)-Benzoin.
- Neben der Carboligaseaktivität konnte erstmals eine Lyaseaktivität der BFD für (*R*)-Benzoin nachgewiesen werden, wie sie bereits von dem homologen Enzym BAL bekannt ist.
- Die Bildung von 2-HPP und (*R*)-Benzoin ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd sowie die Spaltung von (*R*)-Benzoin konnten im Batchversuch nachgewiesen sowie auch simuliert werden.
- Die Bildung von 2-HPP ausgehend von Benzoin und Acetaldehyd ist in TEA-Puffer wesentlich stärker katalysiert als in Phosphatpuffer.
- Die BFD-Varianten akzeptieren nur (*R*)-Benzoin als Substrat, sodass es beim Einsatz von rac-Benzoin zu einer klassischen kinetischen Racematspaltung kommt.
- Neben der Lyaseaktivität von (*R*)-Benzoin konnte auch die Lyaseaktivität von (*R*)- und (*S*)-HPP nachgewiesen werden. Die Bildungskinetik des jeweils komplementären Enantiomers aus dem anderen folgt dabei einer klassischen Michaelis-Menten Kinetik.
- Die Bildung des jeweils komplementären 2-HPP Enantiomers wird durch Acetaldehydkonzentrationen > 50 mM stark inhibiert.
- Als Zwischen- bzw. Spaltprodukt bei den Lyaseversuchen konnte Benzaldehyd identifiziert werden.
- Für die Substrate rac-HPP, (*R*)-Benzoin, Benzaldehyd sowie Acetaldehyd konnte für die Varianten wtBFD, BFD F464I sowie BFD A460I-F464I ein Gleichgewichtszustand erreicht werden.
- Der etablierte Reaktionsmechanismus konnte durch die neuen Erkenntnisse um die Reversibilität der Carboligation erweitert werden.

7. Enzyminhibierung*

In biologischen Systemen spielt die Regulation von enzymkatalysierten Reaktionen eine wichtige Rolle. So ist es für Organismen immens wichtig, zum Einen die Expression der benötigten Enzyme zu kontrollieren und zum Anderen, deren Aktivität zu regulieren. Eine Expressionsregulation der Proteine kann z.B. direkt durch Substrate erfolgen, die Repressoren deaktivieren und es somit z.B. den RNA-Polymerasen ermöglichen, an die Promotoren zu binden und die entsprechenden Gene (oder Operons) zu transkribieren. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das lac-Operon, dessen Transkription durch den lac-Repressor inhibiert wird. Der lac-Repressor wird hingegen durch Laktose oder den in der Biotechnologie verwendeten Ersatzstoff Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) deaktiviert (Beckwith 1967).

Die Regulation von Enzymaktivitäten verläuft *in vivo* in der Regel ebenfalls über Signalmoleküle (sogenannte Effektoren), durch deren Bindung die Enzymaktivität erhöht bzw. erniedrigt wird. Die Bindung der Effektoren erfolgt an spezifischen Stellen am Enzym, die jedoch nicht dem katalytisch aktiven Zentrum (*active site*) entsprechen müssen. Eines der bekanntesten Beispiele für solch ein allosterisches Protein stellt das Hämoglobin dar, bei dem die Affinität zu weiteren O₂-Molekülen mit der Anzahl bereits gebundener O₂-Moleküle zunimmt (Benesch, Benesch 1967). Die Regulation von Enzymkaskaden erfolgt oft durch deren Endprodukte, die ihrerseits die erste Stufe der Kaskade inhibieren, wie es häufig im Aminosäurestoffwechsel zu beobachten ist. Bei der mehrstufigen Bildung von Isoleucin aus Threonin wird beispielsweise das erste Enzym der Kaskade, die Threonindesaminase, durch Isoleucin inhibiert (Baumgart 1974).

7.1 Reversible und irreversible Enzyminhibierung

Bei der Inhibierung von Enzymen unterscheidet man zwei grundlegende Arten: die irreversible und die reversible Inhibierung (Abbildung 7.1).

Bei der irreversiblen Inhibierung wird aus dem Enzym und dem Inhibitor in einer irreversiblen Reaktion ein Komplex gebildet, der katalytisch nicht mehr aktiv, bzw. weniger aktiv als das freie Enzym ist.

Bei der reversiblen Inhibierung verläuft diese Inhibierung reversibel und man unterteilt weiter in eine vollständige Inhibierung, bei der keine Enzymaktivität in Gegenwart des Inhibitors vorhanden ist und der partiellen Inhibierung, bei der eine Restaktivität erhalten bleibt (Bisswanger 2008). Ursache dafür sind die Komplexe aus Enzym (E), Substrat (A) und Inhibitor (I; also EI und EAI), aus denen keine Produktbildung mehr möglich ist (Abbildung 7.2).

*Auszüge dieses Kapitels sind veröffentlicht in:

Marc Bruning, Marco Berheide, Danilo Meyer, Ralph Golbik, Hans Bartunik, Andreas Liese, Kai Tittmann; in: Structural and Kinetic Studies on Native Intermediates and an Intermediate Analogue in Benzoylformate Decarboxylase Reveal a Least Motion Mechanism with an Unprecedented Short-Lived Predecarboxylation Intermediate. Veröffentlicht in: Biochemistry, 2009, Jg. 48, H. 15, S. 3258-3268.

Bei den vollständigen Inhibierungstypen erfolgt somit keine Abreaktion des EAI-Komplexes zum Produkt und somit ist $k_6 = 0$ im Gegensatz zu den partiellen Inhibierungstypen, bei denen $k_6 > 0$ ist.

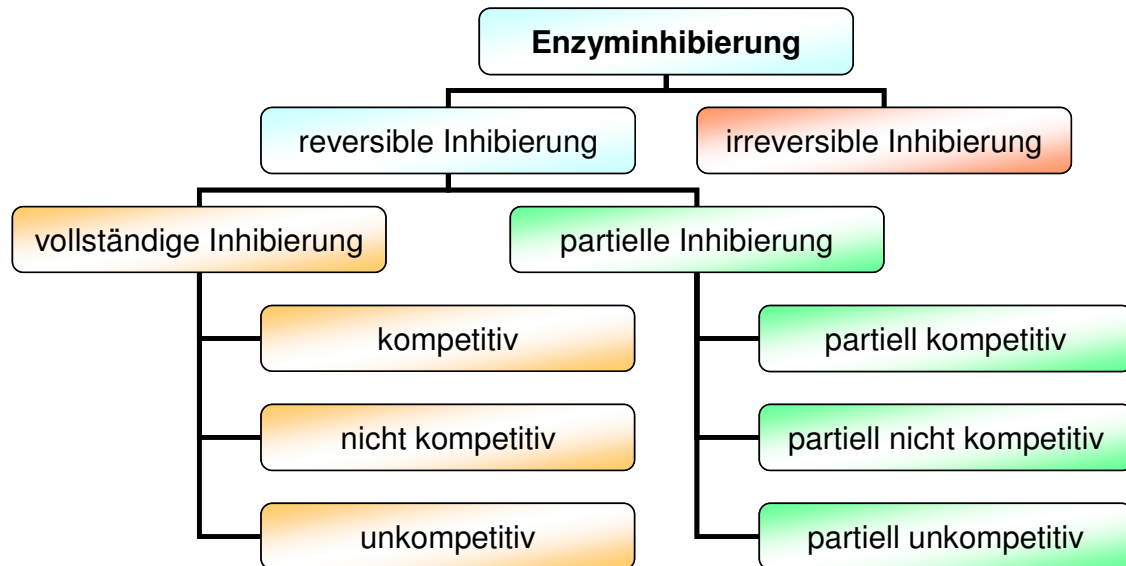


Abbildung 7.1: Übersicht der wesentlichen Inhibierungstypen. Neben der irreversiblen Inhibierung liegt die reversible Inhibierung vor, die in vollständige und partielle Inhibierung unterteilt wird.

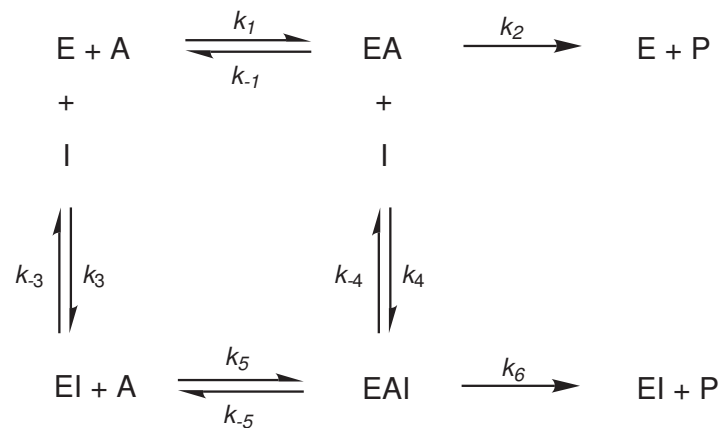


Abbildung 7.2: Allgemeiner Inhibierungsmechanismus für Enzym (E), Substrat (A), Produkt (P) und Inhibitor (I) bei der reversiblen Inhibierung. Dieser gibt gleichzeitig auch den Spezialfall der partiell reversiblen, nicht kompetitiven Hemmung wieder.

Darüber hinaus wird die vollständige Inhibierung in drei verschiedene Mechanismen unterteilt, die kompetitive, die nicht kompetitive und die unkompetitive Inhibierung. Bei der kompetitiven Inhibierung konkurrieren Substrat und Inhibitor um das freie Enzym, sodass es

effektiv zu einer Erniedrigung der freien Enzymkonzentration kommt. Der EAI-Komplex wird hierbei nicht gebildet. Bei der unkompetitiven Inhibierung konkurriert der Inhibitor mit dem Enzym-Substrat Komplex EA unter Ausbildung des EAI-Komplexes. Dieser kann jedoch nicht zum Produkt und Enzym-Inhibitor Komplex abreagieren ($k_6 = 0$), wodurch er einen sogenannten *dead-end* Komplex darstellt. Bei der nicht kompetitiven Inhibierung können zwar der EI und der EAI-Komplex gebildet werden, jedoch ist die Abreaktion aus dem EAI-Komplex zum Produkt nicht möglich.

Bei den partiellen Inhibierungen unterscheidet man ebenfalls in diese drei Inhibierungsmechanismen, jedoch ist hier die Abreaktion des EAI-Komplexes mit der Geschwindigkeitskonstanten k_6 möglich. Einen Sonderfall stellt die partiell kompetitive Inhibierung dar, da sie mechanistisch analog der partiell nicht kompetitiven Inhibierung verläuft. Jedoch gilt für sie, dass $k_2 = k_6$ ist (Bisswanger 2008).

Für die reversible Inhibierung des Enzyms (E) lassen sich somit für das Substrat (A) sowie den Inhibitor (I) jeweils zwei Dissoziationskonstanten herleiten:

$$K_A = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [A]}{[EA]} \qquad K_{Ai} = \frac{k_{-5}}{k_5} = \frac{[EI] \cdot [A]}{[EAI]}$$

$$K_{ic} = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \qquad K_{iu} = \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[EA] \cdot [I]}{[EAI]}$$

Hier steht der Index *i* für Inhibierung (*inhibition*) sowie *c* und *u* für den jeweils kompetitiven (*competitive*) bzw. unkompetitiven (*uncompetitive*) Anteil.

Für das Enzym E, den Enzym-Substrat Komplex EA sowie das Produkt P lassen sich weiterhin folgenden Differentialgleichungen aufstellen, wobei im stationären Zustand die Änderung von E und EA als null angenommen wird:

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2) \cdot [EA] - (k_1[A] + k_3[I]) \cdot [E] + k_{-3} \cdot [EI] = 0$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = -(k_{-1} + k_2 + k_4) \cdot [EA] + k_1[A][E] + k_{-4}[EAI] = 0$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] + k_6[EAI] = v$$

Für die Gesamtmenge an Enzym gilt:

$$[E_0] = [E] + [EA] + [EI] + [EAI] = [E] + [EA] + \frac{[E] \cdot [I]}{K_{ic}} + \frac{[EA] \cdot [I]}{K_{iu}}$$

Fügt man weiterhin die Michaelis-Menten Konstante mit $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ sowie die Gesamtreaktionsgeschwindigkeiten $v_1 = k_2[E_0]$ und $v_2 = k_6[E_0]$ ein, so erhält man nach Kombination und Umformung des Gleichungssystems einen allgemeingültigen Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit v :

$$v = \frac{\left(v_1 + \frac{v_2[I]}{K_{iu}} \right) [A]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}} \right) [A]}$$

7.2 Gezielte Inhibierung von Enzymen

Die Regulation von enzymkatalysierten Reaktion ist nicht nur innerhalb der Organismen von entscheidender Bedeutung, sondern spielt auch in anderen Lebensbereichen eine wichtige Rolle. In der Regel wird dabei versucht, Enzyme zu inhibieren, um bestimmte Stoffwechselwege zu blockieren oder zu verlangsamen. In der Medizin werden z.B. Proteaseinhibitoren zur Bekämpfung von HIV eingesetzt. Tipranavir ist ein Proteaseinhibitor der vierten Generation, der die viralen Proteasen inhibiert und somit die Reproduktion der HI-Viren unterdrückt (Turner et al. 1998). Der Wirkstoff Acarbose (Medikament Glucobay®; Bayer) wird als Antidiabetikum bei Diabetes mellitus eingesetzt, wo er das Enzym α -Glucosidase inhibiert (Wolffenbuttel, Graal 1996), (Bayer Vital GmbH). Als Pseudotetrasaccharid inhibiert er die Bildung von Glukose aus Oligosacchariden und vermindert somit den Blutzuckerspiegel nach den Mahlzeiten. Ein weiteres Einsatzgebiet von Enzyminhibitoren ist die Landwirtschaft, in der Enzyminhibitoren als Pestizide, Fungizide und Herbizide eingesetzt werden. N-(Phosphonomethyl)glycin (Glyphosat) ist beispielsweise ein Totalherbizid, welches in der Bekämpfung von ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen eingesetzt wird und von der Firma Monsanto unter dem Namen Roundup vermarktet wird (Monsanto 2009). Glyphosat ist ein Substratanalogon des Phosphoenolpyruvat und inhibiert durch Anbindung an das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase den Shikimatweg und somit die Bildung von aromatischen Aminosäuren. Neben der zivilen Nutzung solcher Inhibitoren gibt es auch die militärische Nutzung in chemischen Kampfstoffen. Die Wirkungsweise dieser Kampfstoffe ist meist ähnlich derer der zivilen Nutzung mit dem Unterschied, dass hier versucht wird, die zentralen und lebensnotwendigen Stoffwechselwege im menschlichen Körper effektiv zu blockieren. Beispiele hierfür finden sich unter anderem bei der Blockierung der Reizweiterleitung im zentralen Nervensystem. Durch die Inhibierung des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) ist es nicht mehr möglich, den Neurotransmitter Acetylcholin zu spalten, was letztendlich Krämpfe bis hin zum Atemstillstand zur Folge hat (Koolman, Röhm 1997). Bekannte Inhibitoren der AChE sind u. a. die Organophosphorverbindungen Sarin, Tabun, VX und Soman, die durch Phosphorylierung des Serins in der *active site* die katalytische Triade des Enzymmechanismus

inhibieren (Bey, Walter 2002). Historisch gesehen werden solche Inhibitoren schon seit mehreren Jahrhunderten eingesetzt, wie z. B. das indianische Pfeilgift Curare, welches ebenfalls ein AChE-Blocker ist.

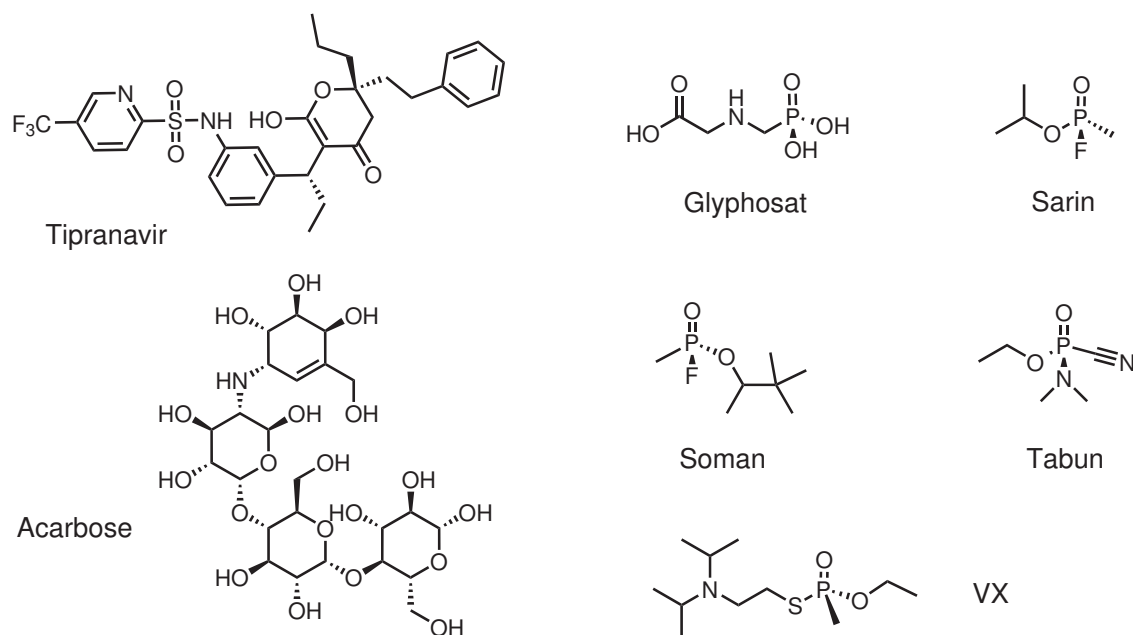


Abbildung 7.3: Übersicht verschiedener Enzyminhibitoren diverser Enzyme

7.3 Inhibierung ThDP abhängiger Enzyme

Da Enzyminhibitoren oftmals Substratanaloga sind, haben sie meist eine hohe Affinität zur *active site* des jeweiligen Enzyms. Durch die Bindung des Inhibitors entstehen dadurch Komplexe, die den reellen Enzym-Substrat-Komplexen stark ähneln und somit wichtig für die Aufklärung von Reaktionsmechanismen sind. Die Bindung des Inhibitors in der *active site* kann dabei zwei unterschiedlichen Mechanismen folgen. Zum einen kann der Inhibitor an die *active site* binden und diese irreversibel verändern und zum Anderen kann es zur Bildung eines reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes kommen. Für ersteres Beispiel stehen die Substanzen Glyphosat, Sarin, Tabun, Soman und VX, die jeweils Serinreste in der *active site* phosphorylieren. Solche Inhibitoren bezeichnet man auch als *suicide substrates*. Neben dieser direkten chemischen Modifikation der *active site* ist es auch möglich, die Enzymaktivität durch das Einbringen kompletter, nicht aktiver Übergangszustandsanaloga (ÜZ-Analoga) zu inhibieren.

Bei ThDP-abhängigen Enzymen konnte dies z.B. durch Thiaminthiazolondiphosphat (ThthiaDP) und 3-Deazathiamindiphosphat (DeazaThDP) gezeigt werden (Gutowski, Lienhard 1976), (Mann et al. 2004). Beim ThthiaDP ist das C2-Atom der Thiazoleinheit des ThDP durch ein kovalent gebundenes Sauerstoffatom sp^2 -hybridisiert und somit ein ÜZ-Analoga des Enamin-Carbanions (Abbildung 7.4). ThthiaDP hat für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex eine Dissoziationskonstante, die um etwa vier Größenordnungen

geringer ist als die des ThDP (Gutowski, Lienhard 1976). DeazaThDP ist ebenfalls ein äußerst starker Inhibitor, bei dem für die *Zymomonas mobilis* PDC (*ZmPDC*) eine siebenfach beschleunigte Anbindungskinetik im Vergleich zu ThDP gemessen werden konnte. Die Dissoziationskonstante ist für DeazaThDP mit 14 pM bei der *ZmPDC* um den Faktor 25.000 geringer als der für ThDP (0,35 μ M), was eine dementsprechend höhere Bindungsaffinität bedeutet. DeazaThDP zählt damit bereits zu den irreversiblen Inhibitoren für ThDP abhängige Enzyme, obgleich keine kovalente Bindung mit dem Enzym vorliegt (Mann et al. 2004).

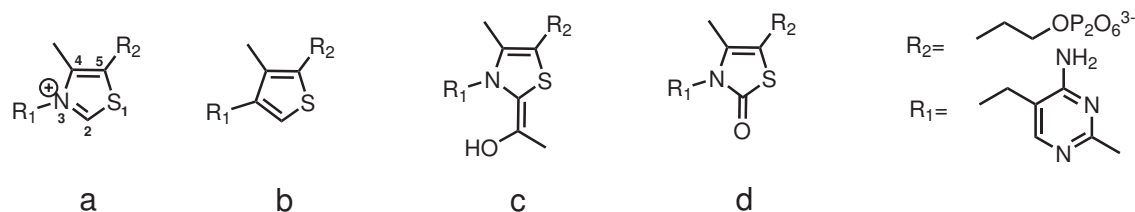


Abbildung 7.4: Vergleich der ThDP-Inhibitor Komplexe 3-Deazathiamindiphosphat (b) und Thiaminthiazolondiphosphat (d) sowie deren analogen Strukturen Thiamindiphosphat (a) und dem Enamin-Komplex (c).

Tabelle 7.1: Übersicht einiger Inhibitoren ThDP-abhängiger Enzyme.

Struktur	Name	Enzym	Literatur
	Methylacetylphosphonat	PDHc POX	(Seifert et al. 2006) (Wille et al. 2006)
	Acetylphosphonat	PDHc POX yeastPDC	(Nemeria et al. 2007)
	2-Oxo-4-phenylbutynoic acid	PDC	(Chiu, Jordan 1994)
	2-Oxo-3-heptynoic acid	PDHc	(Brown et al. 1997)
	2-Oxo-3-pentynoic acid	PDHc	(Brown et al. 1997)
	2-Oxo-3-butynoic acid	PDHc	(Brown et al. 1997)
	Benzoylphosphonat	BFD	(Bera et al. 2007)
	Methylbenzoylphosphonat	BFD BAL	(Bruning et al. 2009)* (Brandt et al. 2009) (Brandt et al. 2008)

*Eigene Ergebnisse sind in Bruning et al. veröffentlicht.

Als reine Substratanaloga wurden für ThDP-abhängige Enzyme bereits eine Vielzahl von Substanzen untersucht, von denen eine Auswahl in Tabelle 7.1 aufgelistet ist. Bei den Phosphonatestern Methylacetylphosphonat (MAP) und Methylbenzoylphosphonat (MBP) kommt es durch Bindung der Carbonylgruppe an C2 der Thiazoleinheit des ThDP zu einem stabilen Inhibitor-Coenzym Komplex, durch den das Enzym inhibiert wird. Durch Dialyseexperimente konnten Brandt et al. zeigen, dass Methylbenzoylphosphonat für BFD und BAL ein reversibler Inhibitor ist (Brandt et al. 2009), (Brandt et al. 2008). Bera et al. haben für das nicht veresterte Phosphonat Benzoylphosphonat (BP) durch Röntgenstrukturanalyse darüber hinaus eine Phosphorylierung des Serin26 in der BFD beobachtet (Bera et al. 2007). Ein genereller Phosphorylierungsmechanismus durch freie Phosphonate konnte bei anderen ThDP-Enzymen jedoch bislang nicht nachgewiesen werden.

7.4 Inhibierung der BFD durch Methylbenzoylphosphonat-Derivate

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Methylbenzoylphosphonats zum physiologischen Substrat Benzoylformiat und dem Carboligationsprodukt 2-HPP (Abbildung 7.5) eignet sich diese Substratklasse besonders für die Untersuchung der Inhibierungskinetik und der allgemeinen Substratanbindung des Enzyms. Zum anderen lassen sich aus der Struktur des Inhibitor-Coenzym Komplexes Rückschlüsse über die Strukturen der reellen Übergangszustände aus den enzymkatalysierten Reaktionsschritten ableiten.

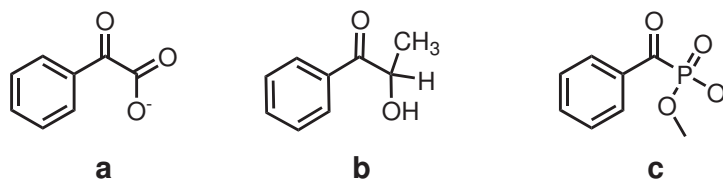


Abbildung 7.5: Strukturen der BFD Substrate Benzoylformiat (a) und 2-HPP (b) sowie dem strukturell verwandten Inhibitor Methylbenzoylphosphonat (MBP; (c)).

Untersucht wurde daher die Inhibierungswirkung des reversiblen Inhibitors Methylbenzoylphosphonat (MBP) auf die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Das MBP wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Kai Tittmann und Dr. Ralph Golbik zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden die in dieser Arbeit selbst synthetisierten Inhibitoren (siehe Kapitel 9.4) 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-MeO-MBP in Hinblick auf die Inhibierung der wtBFD untersucht.

Für die Charakterisierung der MBP-Inhibitoren bieten sich prinzipiell zwei verschiedene Methoden an:

- Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Substrat-/Inhibitorkonzentration.
- *Active site*-Titration und Detektion des gebildeten Inhibitor-Cofaktor Komplexes mittels optischer Methoden.

Bei der Charakterisierung mittels Aktivitätsbestimmungen in Abhängigkeit der Substrat- bzw. Inhibitorkonzentration macht man sich eine geeignete Auftragung der Messwerte zu Nutze, um die gewünschten Parameter zu bestimmen (z.B. doppelt reziproke Auftragungen von Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration).

Bei der Analyse, der während der Reaktion auftretenden Cofaktor-Komplexe, kann man sich hingegen den Circular Dichroismus (CD) zu Nutze machen, da der Cofaktor ThDP je nach Art des Zustandes in unterschiedlicher, CD aktiver Form vorliegt (Abbildung 7.6).

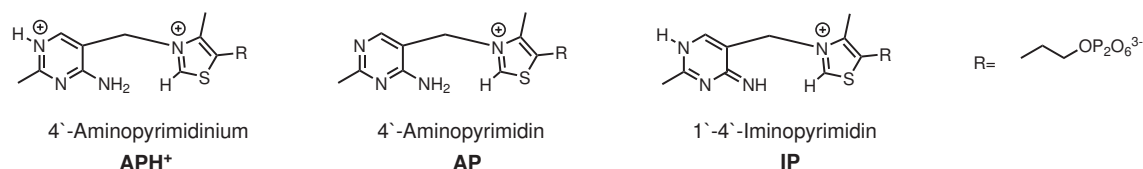


Abbildung 7.6: Unterschiedliche Formen des Cofaktors ThDP. Mittels CD-Spektroskopie detektierbar sind das 4'-Aminopyrimidin (AP) und das 1'-4'-Iminopyrimidin (IP).

Für die BFD wurde gezeigt, dass alle tetrahedralen Formen des Cofaktors in der IP-Form vorliegen, das Enamin-Carbanion, das Ylid, die Michaelis-Komplexe und der freie Cofaktor hingegen in der AP- bzw. APH⁺-Form (Bruning et al. 2009), (Nemeria et al. 2009). Die CD-Spektroskopie bietet den großen Vorteil, dass durch sie nur chirale Agenzien detektierbar sind. Durch die chirale Umgebung des Enzyms auf der einen Seite, sowie der Chiralität des gebildeten MBP-ThDP-Komplexes und der nicht symmetrischen V-Konformation des Cofaktors auf der anderen Seite erhält man somit im Falle des MBP einen gut detektierbaren MBP-ThDP-Komplex. Dieser wird im Folgenden als α -(Methyl)phosphono-mandelyl-ThDP (PMThDP) bezeichnet. Spektroskopisch zu unterscheiden ist der Michaelis-Komplex aus MBP und Cofaktor vom kovalent gebundenen PMThDP an Hand der zu detektierenden CD-Bande, da die AP-Form eine negative CD-Adsorption bei $\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$ aufweist im Gegensatz zur IP-Form des PMThDP bei $\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$ mit einem positiven Adsorptionssignal (Bruning et al. 2009).

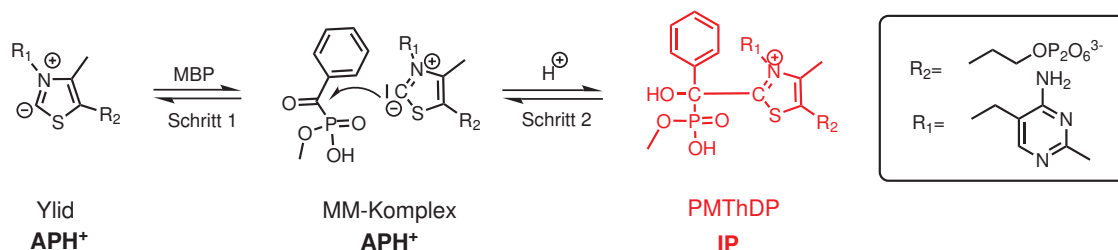


Abbildung 7.7: Reaktionsschema der Inhibition von BFD durch MBP. Die Anbindung erfolgt in einem zweistufigen Mechanismus über die Bildung eines Michaelis-Komplexes (MM-Komplex). Detektierbar ist der Komplex aus kovalent gebundenen MBP an ThDP (PMThDP) durch Ausbildung der CD-aktiven Iminopyrimidinform (IP) des Cofaktors.

Für die Charakterisierung der Inhibierung durch MBP wurden die Varianten wtBFD, BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I in Phosphatpuffer gelöst und jeweils in einer Küvette im CD-Spektralphotometer vorgelegt. Durch Titration mit einer MBP-Maßlösung wurde die Inhibitorkonzentration schrittweise bis zur Sättigung des Adsorptionssignals erhöht (Abbildungen 7.8-7.11). Die Messungen hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit bei der Arbeitsgruppe für Enzymologie von Prof. Kai Tittmann an der Martin-Luther-Universität in Halle/Wittenberg durchgeführt. Auf Grund des Signal- zu Rauschverhältnis wurden jeweils 10 Messungen hintereinander durchgeführt und der Mittelwert der Messsignale gegen die Wellenlänge aufgetragen (linker Abbildungsteil). Um weitere Schwankungen der Messsignale zu minimieren, wurden für die Bestimmung der Dissoziationskonstante die Messwerte von 298-302 nm gemittelt und nach Abzug des Blindwertes ohne Zugabe von MBP als normierte Messwerte_{300nm} aufgetragen (rechter Abbildungsteil). Die Dissoziationskonstanten wurden durch hyperbole Kurvenanpassung ermittelt, da die Inhibierung durch MBP einer Michaelis-Menten Kinetik folgt (Bruning et al. 2009).

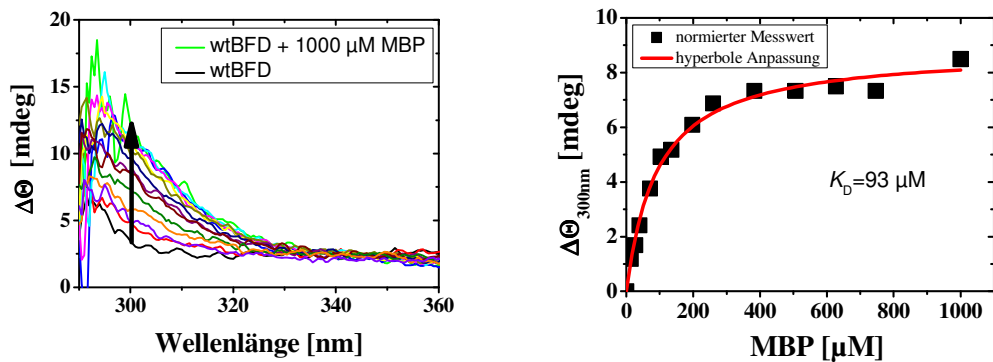


Abbildung 7.8: CD-Titrationsspektrum von wtBFD mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1000 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\Delta\Theta$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 93 \pm 8 \mu\text{M}$ (rechts).

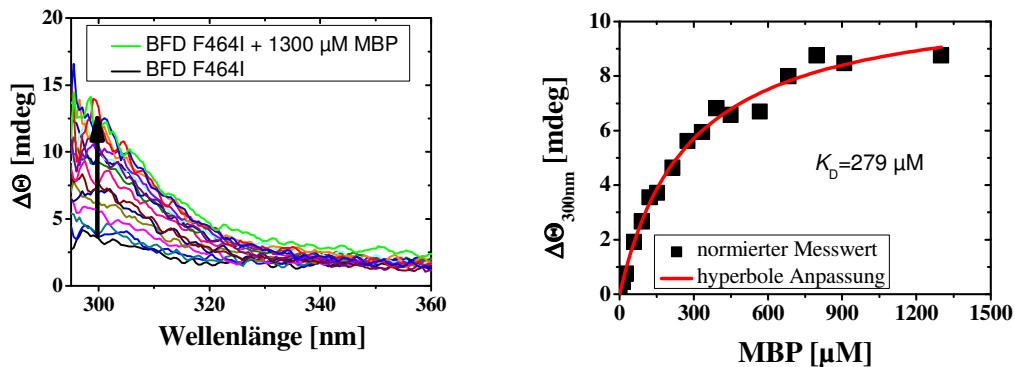


Abbildung 7.9: CD-Titrationsspektrum von BFD F464I mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1300 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\Delta\Theta$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 279 \pm 24 \mu\text{M}$ (rechts).

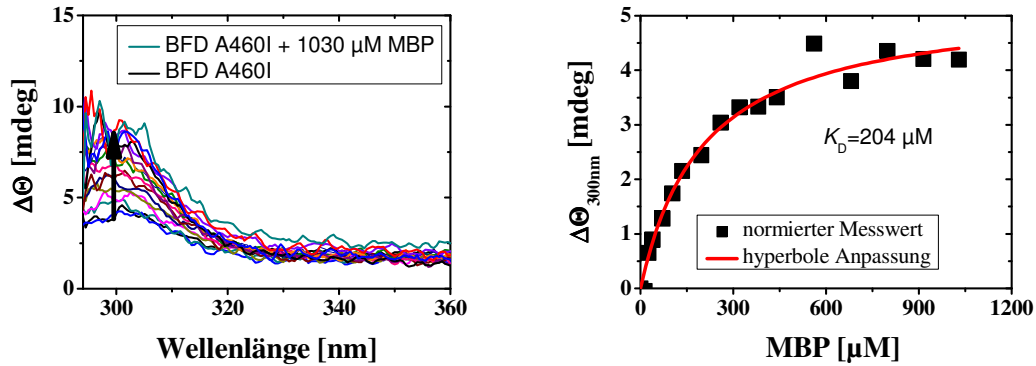


Abbildung 7.10: CD-Titrationsspektrum von BFD A460I mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1030 µM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm (Δ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 204 \pm 26 \mu M$ (rechts).

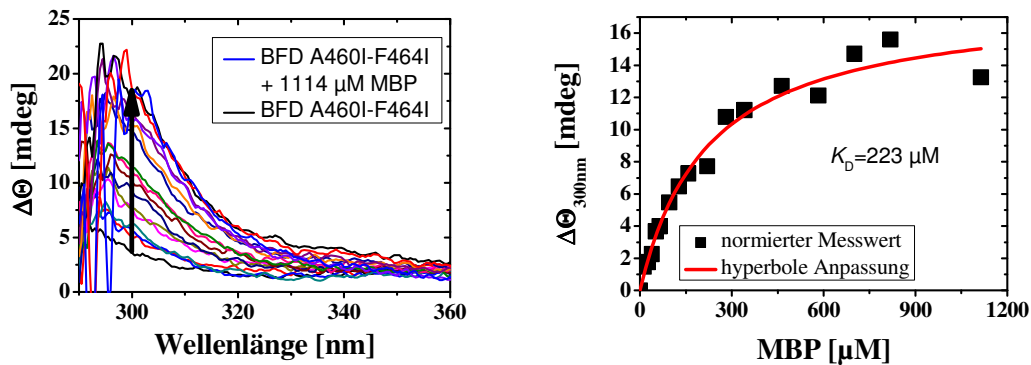


Abbildung 7.11: CD-Titrationsspektrum von BFD A460I-F464I mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1114 µM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm (Δ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 223 \pm 31 \mu M$ (rechts).

Zeitgleich zu dieser Arbeit wurden die CD-Messungen zur Inhibierung der wtBFD durch MBP ebenfalls von Danilo Meyer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Kai Tittmann durchgeführt, aus dessen Messungen eine Dissoziationskonstante von $K_D = 97 \pm 9 \mu M$ für wtBFD bestimmt wurde, sowie ebenfalls von Gabriel S. Brandt aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dagmar Ringe, der einen Wert von $K_D = 113 \pm 10 \mu M$ ermittelt hat (Bruning et al. 2009), (Brandt et al. 2009). Diese Werte stimmen sehr gut mit dem hier ermittelten von $K_D = 93 \pm 8 \mu M$ überein und zeigen die Reproduzierbarkeit der Methode. Als Inhibierungsart wurde eine reversible, kompetitive Inhibierung ermittelt. Zum einen konnte von Brandt et al. der Inhibitor MBP per Dialyse wieder von der wtBFD entfernt werden und zum Anderen zeigt sich ein typisch reversibles, kompetitives Verhalten bei der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk von Aktivität gegen die Substratkonzentration (Brandt et al. 2009).

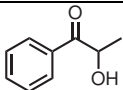
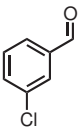
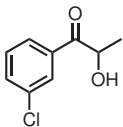
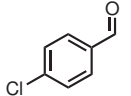
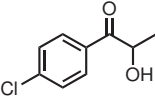
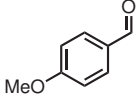
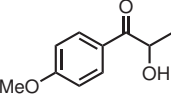
Vergleicht man die Dissoziationskonstanten der einzelnen BFD Varianten für MBP, so fällt auf, dass die Dissoziationskonstante der wtBFD mit $K_D = 93 \mu\text{M}$ deutlich geringer ist als die der Varianten mit Mutation und einem jeweiligen $K_D > 200 \mu\text{M}$ (siehe Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2: Übersicht der per CD-Spektroskopie ermittelten Dissoziationskonstanten für MBP und 3-Cl-MBP für wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Spalte rechts: Michaelis-Menten Konstante für Benzaldehyd ($K_{M,BA}$) bei der 2-HPP Synthese zum Vergleich.

Variante	$K_{D,MBP} [\mu\text{M}]$	$K_{D,3\text{-Cl-MBP}} [\mu\text{M}]$	$K_{M,BA} [\text{mM}]$
wtBFD	93 ± 8	$11 \pm 1,2$	$10,6 \pm 2,9$
BFD F464I	279 ± 24	nicht bestimmt	$15,2 \pm 3,7$
BFD A460I	204 ± 26	nicht bestimmt	$7,7 \pm 1,3$
BFD A460I-F464I	223 ± 31	nicht bestimmt	$19,4 \pm 6,7$

Da diese Konstanten reine Dissoziationskonstanten zwischen ThDP in der *active site* und dem MBP darstellen, kann man aus deren Größe direkt auf die Affinität des MBP zur jeweiligen Variante schließen. Das MBP ist folglich für die wtBFD ein wesentlich stärkerer Inhibitor als für die untersuchten Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Beim Vergleich der Dissoziationskonstanten für MBP mit den Michaelis-Menten Konstanten für Benzaldehyd bei der 2-HPP Synthese zeigt sich, dass der Inhibitor einen wesentlich größeren Affinität zur BFD hat als Benzaldehyd. Benzoylformiat, das physiologische Substrat der BFD, hat einen K_M -Wert von $230 \mu\text{M}$, der somit mehr als doppelt so groß ist wie die Dissoziationskonstante für MBP (Bruning et al. 2009).

Tabelle 7.3: Umsätze und Enantioselektivitäten von verschiedenen substituierten 2-HPP Derivaten für wtBFD nach Dünnwald et al.. Die Umsätze wurden nach 20 h Reaktionszeit bei 10 mM Donoraldehyd, 500 mM Acetaldehyd und Umgebungstemperatur erreicht (Dünnwald et al. 2000).

Donoraldehyd	2-Hydroxyketon	Umsatz [%]	Enantiomerenüberschuss $ee_{(S)\text{-HPP}}$ [%]
		99	92
		94	94
		85	82
		23	92

Neben der Inhibierung der BFD Varianten durch den Inhibitor MBP wurde auch die Inhibierung von substituierten MBP-Derivaten untersucht. Als Substituenten wurden dazu Chlor in *meta* und *para* Position, sowie die Methoxygruppe in *para* Position gewählt. Der Grund hierfür liegt unter anderem in der abnehmenden Aktivität der entsprechend substituierten Benzaldehyde bei der 2-HPP Synthese. Nach Dünnwald et al. nimmt dabei die Aktivität in der Reihenfolge m-Cl > p-Cl > p-MeO, wie in Umsatzexperimenten bestimmt, ab (Tabelle 7.3)(Dünnwald et al. 2000). Darüber hinaus sind Chlor- sowie Methoxysubstituenten auch gute Studienobjekte bezüglich der elektronischen sowie sterischen Proportionen.

Bei der Charakterisierung der selbst synthetisierten Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP (Abbildung 7.12) konnte nur das 3-Chloro-MBP per CD-Spektroskopie charakterisiert werden, da beim 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP die Eigenadsorption der Inhibitoren für den messrelevanten Bereich zu hoch ist. Hier ist kein linearer Adsorptionsbereich über den gesamten, notwendigen Konzentrationsbereich gegeben. Die Charakterisierung der substituierten MBP-Derivate erfolgte daher vornehmlich mittels Aktivitätstest, sowie für 3-Chloro-MBP ebenfalls per CD-Spektroskopie.

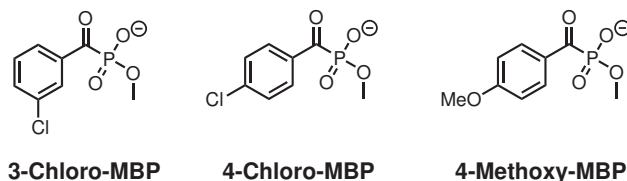


Abbildung 7.12: Strukturen der substituierten MBP-Derivate 3-Chloro-MBP (m-Cl-MBP), 4-Chloro-MBP (p-Cl-MBP) und 4-Methoxy-MBP (p-MeO-MBP).

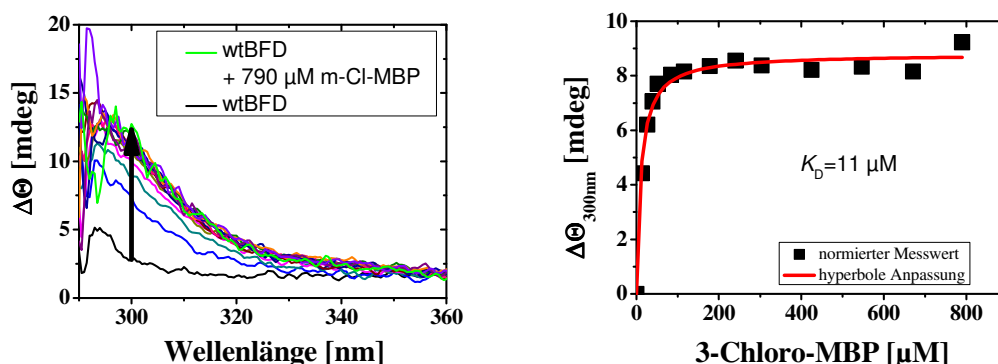


Abbildung 7.13: CD-Titrationsspektrum von wtBFD mit dem Inhibitor 3-Chloro-MBP (m-Cl-MBP) im Konzentrationsbereich von 0-790 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\emptyset$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 11 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (rechts).

Aus der Bestimmung der Dissoziationskonstante für 3-Chloro-MBP durch CD-Spektroskopie (Abbildung 7.13) ergibt sich ein Wert von $K_D = 11 \pm 1,2 \mu\text{M}$. Im Vergleich zum unsubstituierten MBP mit $K_D = 93 \mu\text{M}$ ist die Inhibierungsstärke für das *meta*-Chlor Derivat somit um den Faktor 8,5 höher.

Bei den Aktivitätstests zur 2-HPP Bildung (5-40 mM Benzaldehyd bei jeweils 400 mM Acetaldehyd) wurde 3-Chloro-MBP im Konzentrationsbereich von 0-20 μM zugegeben und die erhaltenen Aktivitäten in Diagrammen aufgetragen. Die Auftragungen in doppelt reziproker Form (klassische Lineweaver-Burk Auftragung) sowie die Eadie-Hofstee und Hanes Auftragung eignen sich in besonderem Maße, da aus den Abszissenabschnitten und den Steigungen sowohl der Inhibierungstyp, wie auch die Parameter v_{max} , K_M (hier bezogen auf Benzaldehyd), K_{ic} und K_{iu} bestimmbar sind (K_{iu} nicht bei rein kompetitiver Inhibierung).

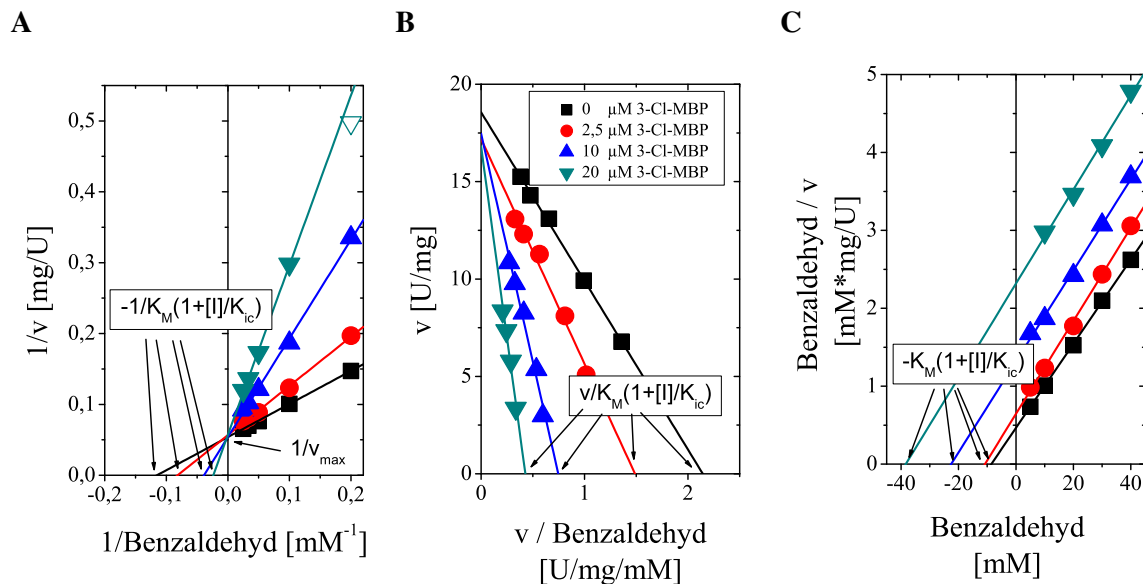


Abbildung 7.14: Übersicht der Inhibierung von wtBFD durch 3-Chloro-MBP. Aufgetragen sind die Messwerte als Lineweaver-Burk Diagramm (A), Eadie-Hofstee Diagramm (B) sowie als Hanes Diagramm (C).

Tabelle 7.4: Übersicht der kinetischen Parameter zur Inhibierung der wtBFD durch 3-Chloro-MBP. Die Daten wurden aus der Lineweaver-Burk-, Eadie-Hofstee- und Hanes-Auftragung als kompetitive Inhibierung ermittelt.

Auftragung	K_M [mM]	v_{max} [U/mg]	K_{ic} [μM]
Lineweaver-Burk	8,7	18,1	5,4
Eadie-Hofstee	8,2	17,5	5,3
Hanes	8,6	17,2	4,6

In der Lineweaver-Burk (Abbildung 7.14-A) und der Eadie-Hofstee Auftragung (Abbildung 7.14-B) schneiden sich die Inhibierungsgeraden auf der y-Achse, wohingegen sie bei der Hanes Auftragung parallel verlaufen (Abbildung 7.14-C), was bei allen Auftragungen typisch

für einen kompetitiven Inhibierungsmechanismus ist. Dies entspricht somit dem gleichen Inhibierungstyp wie das nicht substituierte MBP. Als spezifische Parameter ergeben sich die Werte wie in Tabelle 7.4 angegeben, wobei man als Mittelwert für die Michaelis-Menten Konstante einen Wert von $K_M = 8,5 \text{ mM}$ erhält, sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu $v_{\max} = 17,6 \text{ U/mg}$. Als 3-Chloro-MBP spezifische Konstante ergibt sich die Dissoziationskonstante K_{ic} (kompetitiver Inhibierungsanteil) zu $5,1 \text{ }\mu\text{M}$.

Analog zur Inhibierung durch 3-Chloro-MBP wurden auch die Inhibierungsexperimente für 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP durchgeführt, jedoch im Konzentrationsbereich von 0-2,8 mM bzw. 0-20 mM für den jeweiligen Inhibitor. Vergleicht man die Geradenverläufe bei den einzelnen Auftragungen und für die einzelnen Inhibitoren miteinander, so fällt auf, dass der gemeinsame Schnittpunkt in der doppelt reziproken Auftragung (Abbildungsteile A) und der Eadie-Hofstee Auftragung (Abbildungsteile B) nicht mehr bei $1/\text{Benzaldehydkonzentration} = 0 \text{ mM}^{-1}$, sondern bei negativen Werten liegt. In der Hanes Auftragung (Abbildungsteile C) zeigt sich darüber hinaus, dass die einzelnen Geraden nicht mehr parallel zueinander verlaufen, sondern die Steigung mit zunehmender Inhibitorkonzentration zunimmt. Für die Inhibierung durch 4-Methoxy-MBP ist dieses Verhalten stärker ausgeprägt als für 4-Chloro-MBP, jedoch zeigt sich bei beiden Inhibitoren eine eindeutige Änderung im Vergleich zum 3-Chloro-MBP. Die Verlagerung des Ordinatenschnittpunktes und die zunehmenden Steigungen sind charakteristisch für einen Wechsel des Inhibierungstyps von der rein kompetitiven zur nicht kompetitiven Inhibierung. Als Erweiterung muss daher auch die Dissoziationskonstante für den unkompetitiven Anteil K_{iu} berücksichtigt werden. Dieser ist ebenfalls bestimmbar aus den Gleichungen der Steigungen bzw. Abszissenwerte unter Berücksichtigung des unkompetitiven Inhibierungsanteils neben des kompetitiven (siehe Abbildung 7.16).

Tabelle 7.5: Übersicht der kinetischen Parameter zur Inhibierung der wtBFD durch 4-Chloro-MBP. Die Daten wurden aus der doppelt reziproken, Eadie-Hofstee- und Hanes-Auftragung als nicht kompetitive Inhibierung ermittelt.

Auftragung	K_M [mM]	$v_{\max}$ [U/mg]	K_{ic} [mM]	K_{iu} [mM]
Lineweaver-Burk	8,8	17,0	0,77	6,1
Eadie-Hofstee	8,7	17,0	0,82	4,9
Hanes	8,3	16,7	0,77	5,3

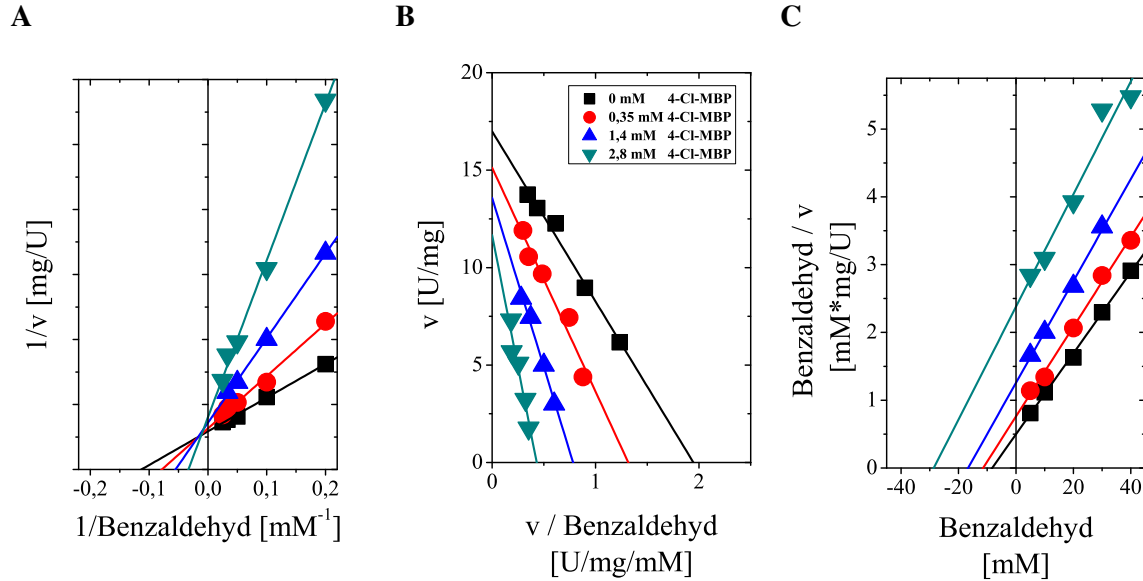


Abbildung 7.15: Übersicht der Inhibition von wtBFD durch 4-Chloro-MBP. Aufgetragen sind die Messwerte in doppelt reziproker Form (A), als Eadie-Hofstee Diagramm (B) sowie als Hanes Diagramm (C).

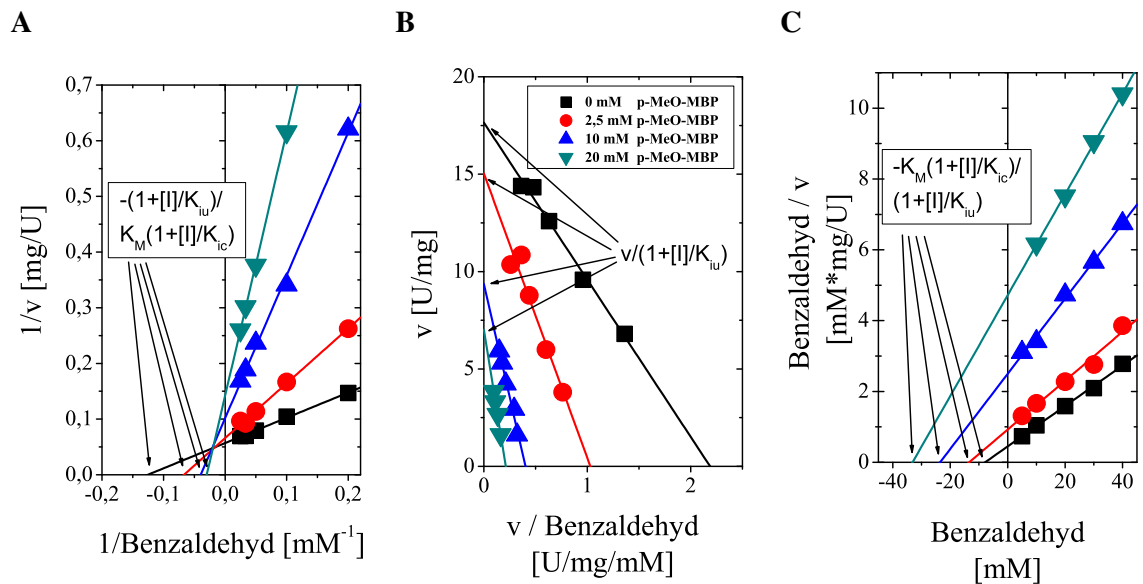


Abbildung 7.16: Übersicht der Inhibition von wtBFD durch 4-Methoxy-MBP. Aufgetragen sind die Messwerte in doppelt reziproker Form (A), als Eadie-Hofstee Diagramm (B) sowie als Hanes Diagramm (C).

Für 4-Methoxy-MBP ergeben sich gemittelte Dissoziationskonstanten zu $K_{ic} = 2,2$ mM und $K_{iu} = 13,1$ mM. Damit sind sie in etwa dreimal so hoch wie die für 4-Chloro-MBP mit $K_{ic} = 0,8$ mM und $K_{iu} = 5,4$ mM. Tendenziell verändern sich also beide Inhibierungsanteile in gleichem Maße, wobei höhere Konzentrationen ein geringeres Inhibierungsverhalten bedeuten. Vergleichend mit 3-Chloro-MBP sind diese K_{ic} -Werte jedoch um mehrere Größenordnungen höher.

Tabelle 7.6: Übersicht der kinetischen Parameter zur Inhibierung der wtBFD durch 4-Methoxy-MBP. Die Daten wurden aus der doppelt reziproken, Eadie-Hofstee- und Hanes-Auftragung als nicht kompetitive Inhibierung ermittelt.

Auftragung	K_M [mM]	v_{max} [U/mg]	K_{ic} [mM]	K_{iu} [mM]
Lineweaver-Burk	8,0	17,6	2,1	14,1
Eadie-Hofstee	8,1	17,7	2,2	13,0
Hanes	7,9	17,5	2,2	12,3

Die durch diese Methode ermittelten v_{max} und K_M -Werte für Benzaldehyd müssen mit einem gewissen Abstand betrachtet werden, da durch dieses Inhibierungsmodell keine Doppelsubstratkinetik (hier für Benzaldehyd und Acetaldehyd) berücksichtigt wird. Zwar passen die K_M Werte mit etwa 8-9 mM relativ gut zu dem ermittelten mit $K_{M,BA}=10,6$ mM aus der Doppelsubstratkinetik, jedoch zeigt sich die Schwäche des Modells bei den v_{max} Werten, da sich hier die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten nur auf die festgelegte Acetaldehydkonzentration von 400 mM beziehen. Die jeweils fast identischen Werte für K_M und v_{max} bei der Charakterisierung der unterschiedlichen Inhibitoren belegt jedoch die Legitimität der Vergleichbarkeit der ermittelten Parameter.

Prinzipiell ist der Wechsel von der kompetitiven zur nicht kompetitiven Inhibierung erklärbar, da formal die Bildung eines Enzym-Substrat-Inhibitor Komplexes möglich ist. Für die Bindung der MBP-Derivate ist genauso wie bei der Bindung des Donorsubstrates Benzaldehyd ein Nukleophil notwendig, welches standardmäßig die Ylidform des ThDP ist. Jedoch kann es auch wie bei der Bildung von Benzoin möglich sein, dass die MBP-Derivate an das zweite mögliche Nukleophil binden: das Enamin-Carbanion aus ThDP und Benzaldehyd. In diesem Fall würde der EAI-Komplex aus ThDP, Benzaldehyd und dem entsprechenden MBP-Derivat gebildet werden.

Um die drei substituierten MBP-Derivate direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Inhibierungsstärke für alle substituierten MBPs unter gleichen 2-HPP Synthesebedingungen ermittelt (siehe Abbildung 7.17). Hierfür wurden Reaktionsansätze zur 2-HPP Bildung unter standardisierten Bedingungen bei 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd gewählt, die durch steigende Inhibitorkonzentrationen gehemmt wurden. Die Aktivitätsverläufe wurden durch eine exponentielle Anpassung der Messwerte bestimmt und als Inhibierungsstärke die Inhibitorkonzentration $K^{0,5}$ berechnet, bei der noch 50 % der Aktivität ohne Inhibitor vorhanden sind.

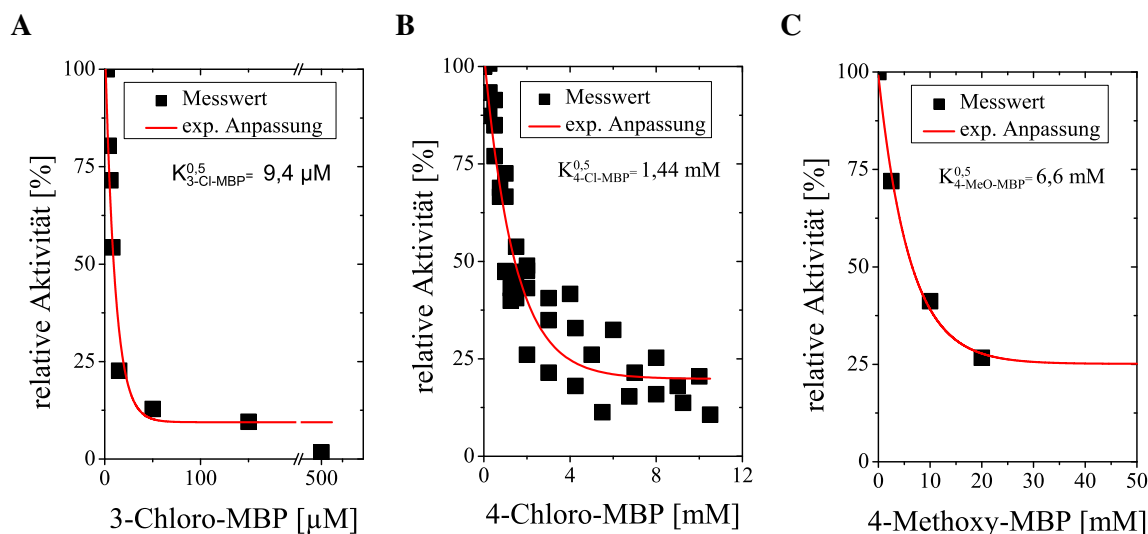


Abbildung 7.17: Inhibierung der wtBFD durch die Inhibitoren 3-Cl-MBP (A), 4-Cl-MBP (B) und 4-MeO-MBP (C). Die Inhibierungskonstanten $K^{0.5}$ sind bestimmt für halbe Maximalaktivität bei 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd.

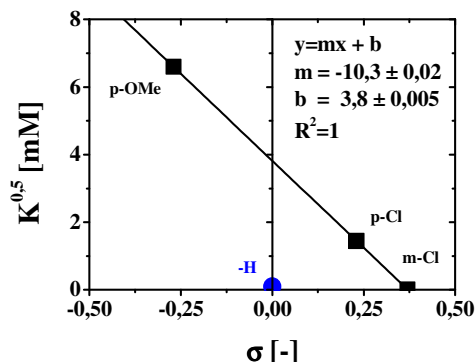
Die Inhibitorstärke für 3-Chloro-MBP mit $K^{0.5} = 9,4 \mu\text{M}$ ist nahezu gleich der per CD-Spektroskopie ermittelten Dissoziationskonstanten mit $K_D = 11 \mu\text{M}$. Beide Methoden eignen sich somit zur Bestimmung der Inhibierungsstärke und die jeweils ermittelten Werte können miteinander verglichen werden.

Besonders interessant ist die Auftragung der $K^{0.5}$ -Werte gegen die σ -Parameter, die ein Maß für die elektronischen Eigenschaften der Substituenten sind (Hansch, Leo 1979). Die drei substituierten MBP-Derivate scheinen dabei einer linearen Korrelation zu gehorchen, wobei die Inhibierungsstärke (kleineres $K^{0.5}$) deutlich mit dem elektronenziehenden Charakter der Substituenten zunimmt (Abbildung/Tabelle 7.7). So zeigen auch die beiden chloro-MBP Derivate (elektronenziehend) eine höhere Inhibierungsstärke als das 4-Methoxy-MBP, welches das aromatische System des Inhibitors elektronenreicher macht. Für das nicht substituierte MBP trifft diese Korrelation allerdings nicht zu, da es in diesem Vergleich eine wesentlich höhere Inhibierungsstärke besitzt als von den elektronischen Eigenschaften vermutet. Neben den rein elektronischen Eigenschaften spielen daher vermutlich auch sterische Eigenschaften bei der Anbindung der Phosphonate eine wichtige Rolle. Dies konnte zuvor auch bei den Reaktionsgeschwindigkeiten von (*R*)-HPP und (*S*)-HPP in Abhängigkeit der Substituenten des Benzaldehyds beobachtet werden (Lingen et al. 2004), (Kihumbu 2007).

Für eine eindeutige Aussage ist die Datenmenge mit drei substituierten Methylbenzoylphosphonaten jedoch noch zu gering. Um eine solche Korrelation zu bestätigen, müssten noch weitere MBP-Derivate mit unterschiedlichen Substituenten, jedoch ähnlichem sterischen Anspruch untersucht werden. Ein geeigneter Substituent wäre beispielsweise die Methylgruppe $-\text{CH}_3$, die in *meta*-Position einen Wert von $\sigma_m = -0,07$ und in

para-Position einen Wert von $\sigma_p = -0,17$ besitzt (Hansch, Leo 1979). Für einen theoretisch noch stärkeren Inhibitor wären vermutlich Fluorsubstituenten in *meta*-Position besonders geeignet, da diese relativ klein sind und mit $\sigma_m = 0,34$ einen stark elektronenziehenden Charakter auf das aromatische System ausüben.

Substituent	σ [-]	$K^{0,5}$
m-Cl	0,37	9,4 μ M
p-Cl	0,23	1,44 mM
m/p-H	0	($K_D=93\mu$ M)
p-OMe	-0,27	6,6 mM



Tabelle/Abbildung 7.7: Übersicht der elektronischen Eigenschaften von Substituenten an aromatischen Systemen (links) sowie deren Auftragung gegen die Inhibierungsstärken substituierter Methylbenzoylphosphonate.

Beim Vergleich der Inhibierungskonstanten $K^{0,5}$ mit der Ausprägung der nicht kompetitiven Hemmung ist erkennbar, dass diese umso ausgeprägter ist, je höher die Inhibierungskonstante ist. Folglich ist die nicht kompetitive Hemmung für 4-Methoxy-MBP am stärksten ausgeprägt, da hier die Inhibierungskonstante zu $K^{0,5} = 6,6$ mM bestimmt wurde. Als Konsequenz kann geschlossen werden, dass auch der Anteil des EAI-Komplexes beim 4-Methoxy-MBP am höchsten ist. Sinnvoll ist diese Argumentation auch dahingehend, da Benzaldehyd und MBP-Derivat zunächst bei der Bindung ans ThDP in Konkurrenz zueinander stehen. Die Affinität des 3-Chloro-MBP ist dabei wesentlich größer als die des Benzaldehyds ($K_D \sim K^{0,5} \ll K_{M,BA}$), was in einer (fast) ausschließlichen Anbindung des 3-Chloro-MBP an das ThDP resultiert. Die Ausbildung des Enamin-Carbanions aus ThDP und Benzaldehyd wird hingegen unterdrückt. Die Hemmung erscheint somit kompetitiv. Anders ist es beim 4-Methoxy-MBP, bei dem die Affinität zum ThDP ähnlich stark wie die des Benzaldehyds ist ($K^{0,5} \sim K_{M,BA}$). Hier konkurrieren beide Substanzen in ähnlich starker Weise um den Bindungsplatz am ThDP, was zum Einen in der Ausbildung des ThDP-MBP_{3-methoxy} Komplexes und zum Anderen in der Ausbildung des Enamin-Carbanions aus ThDP und Benzaldehyd resultiert. Somit ist in diesem Fall auch der Anteil des gebildeten Enamin-Carbanions höher. Für die Folgereaktion des Enamin-Carbanions gibt es drei Möglichkeiten:

- die Abreaktion mit Acetaldehyd zum Produkt 2-HPP
- die Abreaktion mit Benzaldehyd zum Nebenprodukt (*R*)-Benzoin
- die Bindung eines Moleküls 4-Methoxy-MBP unter Ausbildung des EAI-Komplexes

Bei den durchgeführten Inhibierungsversuchen wurde Acetaldehyd in einer Konzentration von 400 mM zugegeben, was in etwa der Michaelis-Menten Konstante ($K_{M,AA} = 270 \pm$

170 mM) entspricht. Für die Bindung von Benzaldehyd bzw. MBP-Derivaten als Akzeptorsubstrate an das Enamin-Carbanion liegen leider bislang keine exakten kinetischen Daten für die BFD vor, jedoch wird Benzoin durch die BFD immer als Nebenprodukt gebildet und somit auch Benzaldehyd als Akzeptorsubstrat akzeptiert. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von Benzaldehyd und MBP-Derivaten liegt ein ähnliches Anbindungsverhalten nahe. Da beide potentiellen Akzeptorsubstrate in ähnlicher Konzentration vorliegen sowie Acetaldehyd im Bereich des K_M -Wertes, sind alle drei Folgereaktionen im betrachteten Reaktionssystem durchaus relevant und auch die Bildung eines ThDP-Benzaldehyd-MBP_{4-Methoxy} Komplex neben einem ThDP-MBP_{4-Methoxy} Komplex (siehe Abbildung 7.18) erklärbar und plausibel. Der ThDP-MBP_{4-Methoxy} Komplex konnte durch Cokristallisationsexperimente und Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden (siehe Kapitel 8), ein expliziter Nachweis für den Gesamtkomplex aus ThDP, Benzaldehyd und 4-Methoxy-MBP kann an dieser Stelle jedoch nicht gegeben werden.

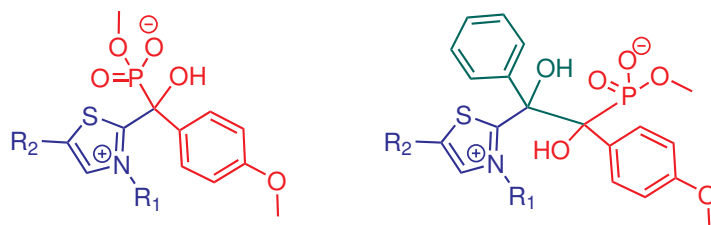


Abbildung 7.18: Nachgewiesener kompetitiver Cofaktor-Inhibitor Komplex aus ThDP und 4-Methoxy-MBP (links) sowie der postulierte nicht kompetitive Cofaktor-Substrat-Inhibitor Komplex aus ThDP (blau), Benzaldehyd (grün) und 4-Methoxy-MBP (rot; rechts).

7.5 Kurzzusammenfassung

Thiamindiphosphat abhängige Enzyme lassen sich durch Phosphonate inhibieren, wobei in diesem Kapitel die Inhibierung der BFD durch MBP sowie die selbst synthetisierten Derivate 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP sowie 4-Methoxy-MBP untersucht wurde. Aus den Versuchen lassen sich folgende Ergebnisse festhalten:

- Bei der Inhibierung wird reversibel ein kovalentes Intermediat aus ThDP und MBP (-Derivat) gebildet, welches sich für MBP und 3-Chloro-MBP durch CD-Titration detektieren lässt.
- Die Inhibierung der BFD-Varianten durch die MBP-Derivate folgt einer Sättigungskinetik.
- Für die spezifische Inhibierungsstärke der einzelnen MBP-Derivate kann die Inhibitorkonzentration angegeben werden, bei der die Enzymaktivität halbmaximal ist. Hierbei zeigt sich, dass das nicht substituierte MBP sowie 3-Chloro-MBP eine wesentlich höhere Inhibierungsstärke als 4-Chloro- sowie 4-Methoxy-MBP besitzen.

8. Kristallisation*

8.1 Kristallisation der wtBFD

Die in dieser Arbeit aufgeführten Kristallisationsexperimente zur BFD wurden von Dr. Marc Bruning in Kooperation mit der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Proteindynamik unter Leitung von Dr. Hans Bartunik durchgeführt. Die Durchführung der Kristallisationsexperimente sowie die Berechnung der Modelle erfolgte wie in Bruning et. al beschrieben (Bruning et al. 2009). Die Enzymchargen zur Kristallisation sowie die Inhibitoren 3-Chloro, sowie 4-Methoxy-Methylbenzoylphosphonat wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Das nicht substituierte Methylbenzoylphosphonat wurde von Prof. Dr. Kai Tittmann und Dr. Ralph Golbik zur Verfügung gestellt. Die Kristallisation der wtBFD mit dem Inhibitor MBP erfolgte unabhängig durch Brandt et al. zeitgleich zu dieser Arbeit (Brandt et al. 2009).

Die Kristallisation der wtBFD und die Anbindung des kompetitiven Inhibitors MBP erfolgte in einem Co-Kristallisationsexperiment unter Zugabe von 100 mM MBP in 20 mM Tris-HCl Puffer bei pH 7,4. Die Inhibitoren 3-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP wurden hingegen nachträglich in vorher gezüchtete BFD-Kristalle eindiffundiert. Die Inhibitoren wurden dazu in einer 10 mM Maßlösung bereitgestellt und die BFD-Kristalle für 3 h (3-Chloro-MBP) bzw. 1 h (4-Methoxy-MBP) in der jeweiligen Lösung inkubiert. Die Daten zu den Kristallstrukturen sind in Tabelle 8.1 aufgelistet.

Die Anbindung der Inhibitoren erfolgt wie in Kapitel 7 beschrieben als reversible Inhibierung. Analog zur Bindung des natürlichen Substrats Benzoylformiat bzw. Benzaldehyd findet auch hier ein Angriff der ylidischen Form des Cofaktors ThDP an die Carbonylgruppe der Inhibitoren statt. Als katalytisch nicht aktive Spezies wird durch kovalente Bindung ein Komplex aus ThDP und dem jeweiligen Inhibitor gebildet (siehe Abbildung 8.1). Dieser wurde von Brandt et al. massenspektrometrisch nachgewiesen (Brandt et al. 2009).

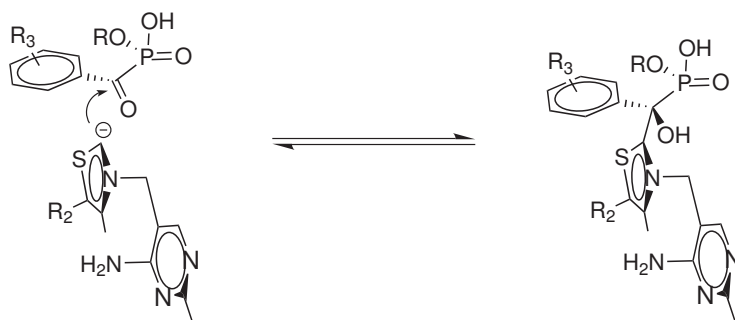


Abbildung 8.1: Anbindung der MBP-Inhibitoren an den Cofaktor ThDP im aktiven Zentrum der BFD.

*Auszüge dieses Kapitels sind veröffentlicht in:

Marc Bruning, Marco Berheide, Danilo Meyer, Ralph Golbik, Hans Bartunik, Andreas Liese, Kai Tittmann; in: Structural and Kinetic Studies on Native Intermediates and an Intermediate Analogue in Benzoylformate Decarboxylase Reveal a Least Motion Mechanism with an Unprecedented Short-Lived Predecarboxylation Intermediate. Veröffentlicht in: Biochemistry, 2009, Jg. 48, H. 15, S. 3258-3268.

Tabelle 8.1: Übersicht der röntgenstrukturkristallographischen Daten für die Kristallisationsexperimente mit der wtBFD.

Enzym-Inhibitor	wtBFD-MBP	wtBFD-3-Chloro-MBP	wtBFD-4-Methoxy-MBP
Data collection			
wavelength	1,05	1,05	1,05
space group	P1	P1	P1
cell dimensions (Å)	$a=71,5$ $b=93,3$ $c=94,5$	$a=69,9$ $b=92,1$ $c=93,3$	$a=70,1$ $b=92,1$ $c=93,1$
cell dimensions (deg)	$\alpha=63$ $\beta=72$ $\gamma=73$	$\alpha=63,8$ $\beta=72,2$ $\gamma=72,5$	$\alpha=63,7$ $\beta=72,1$ $\gamma=72,6$
resolution range (Å)	20,00-1,62 (1,64-1,62)	20-1,6 (1,62-1,6)	20-1,85 (1,88-1,85)
no. of observations	445901	407249	299639
no. of unique reflexions	243335	242511	161449
completeness (%)	93,2 (92,3)	94,0 (91,9)	96,8 (94,5)
I/sigma (I)	8,2 (2,1)	15,5 (2,2)	10,5 (1,7)
R _{merge} (%)	10,7 (39,0)	4,9 (34,5)	8,1 (51,4)
Refinement			
resolution range (Å)	19,96-1,62	19,9-1,6	19,9-1,85
reflections (work/test)	230330/12259	230078/12229	153298/8141
R _{cryst} /R _{free} (%)	17,0/20,3	14,2/16,9	16,1/18,8
mean B-factor (Å ²)	14,4	14,9	12,4
non-hydrogen atoms	18502	18172	18181
water molecules	2217	1900	1905
rms bond lenght dev. (Å)	0,016	0,01	0,008
rms bond angle dev. (deg)	1,481	1,407	1,299

In Abbildung 8.2 sind die Kristallstrukturen der ThDP-Inhibitorkomplexe für ThDP-MBP (A; grün), ThDP-3-Chloro-MBP (B; türkis) sowie ThDP-4-Methoxy-MBP (C; violett) dargestellt. Die umgebenden Aminosäurereste sind in gelb dargestellt. Gut zu erkennen ist die Koordination (rot gestrichelte Linien) der zentralen Sauerstoffatome durch die Seitenketten Serin26, Histidin281, Histidin70 sowie den Pyrimidinring des ThDP. Die Ausrichtung des aromatischen Phenylrestes des Inhibitors erfolgt in Richtung der Aminosäure Phenylalanin397 und des aliphatischen Methoxyrestes am Phosphonat in Richtung der Aminosäure Phenylalanin464. Durch die Überlagerung aller drei Strukturen (Abbildung 8.2; D) ist gut erkennbar, dass die Ausrichtung der Inhibitoren nahezu identisch bei allen drei ThDP-Inhibitorkomplexen ist.

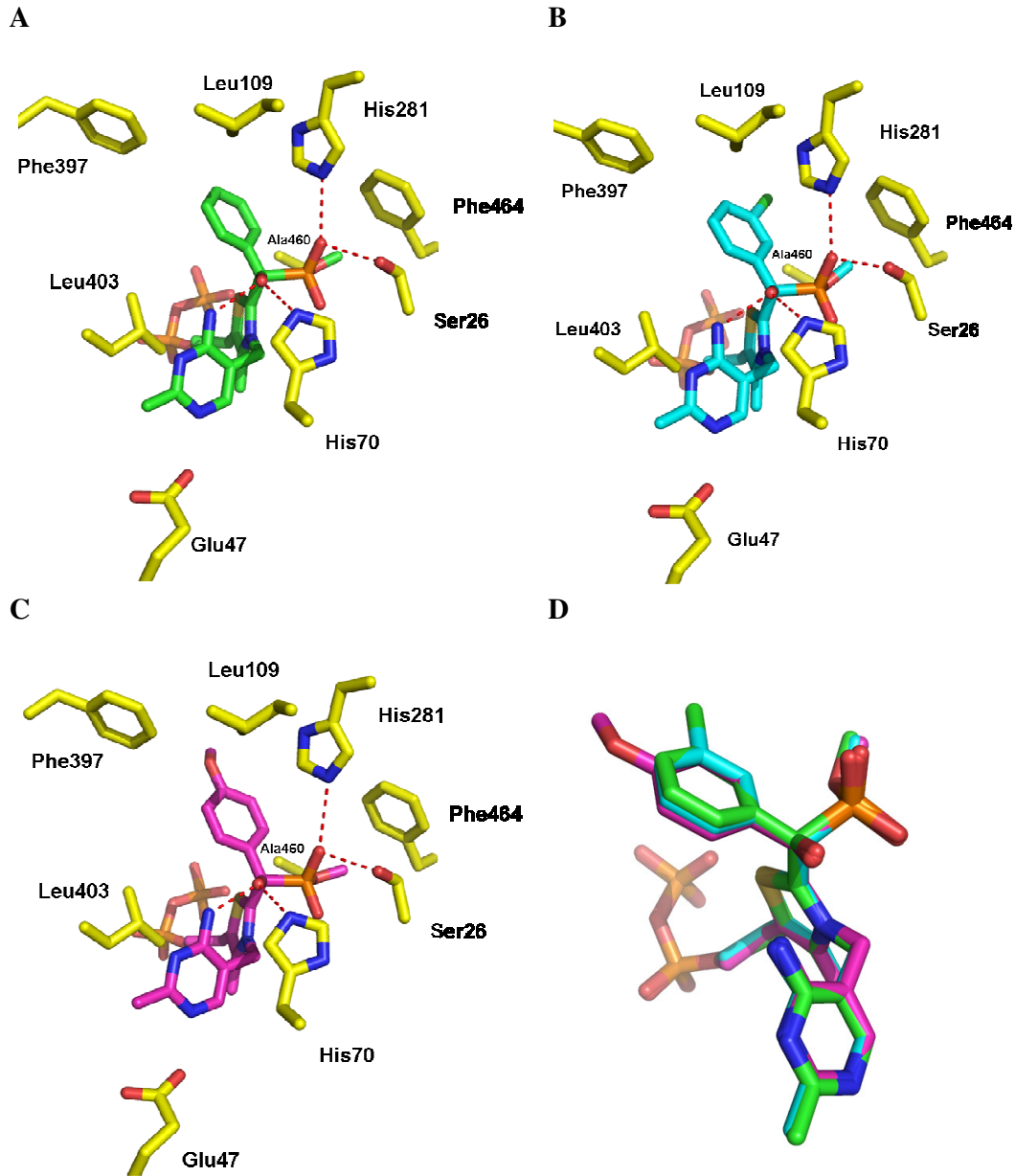


Abbildung 8.2: Anbindung der reversiblen Inhibitoren MBP (A), 3-Chloro-MBP (B) sowie 4-Methoxy-MBP (C) an das ThDP im aktiven Zentrum der wtBFD. Die Überlagerung aller drei Strukturen zeigt die nahezu identische Ausrichtung der Inhibitor-ThDP Strukturen (D). Stickstoffatome = dunkelblau, Sauerstoffatome = rot, Phosphoratome = orange, Kohlenstoffatome der Seitenketten = gelb / im ThDP-Inhibitor-Komplex = grün (MBP) / türkis (3-Chloro-MBP) / violett (4-Methoxy-MBP).

Zieht man hingegen die Inhibierungskonstanten hinzu (siehe Kapitel 7.4), so sticht die Inhibierungskonstante für das 4-Methoxy-MBP mit einem fast 10^3 -fach höheren Wert im Vergleich zum MBP deutlich heraus. Zum einen scheinen die elektronischen Eigenschaften des elektronenreichen Aromaten bei der Anbindung eine Rolle zu spielen, jedoch ist aus Abbildung 8.3 auch ersichtlich, dass sich die hydrophobe Methylgruppe des Methoxyrest am

Aromaten in einer polaren Region um die Aminosäuren Threonin377 und Threonin380 befindet (grün gestrichelte Linien). Die Anbindung scheint darüber hinaus also auch von den elektrostatischen Eigenschaften der unmittelbar benachbarten Aminosäuregruppen beeinflusst zu werden. Beim 3-Chloro-MBP existiert zwar auch eine unmittelbare Nähe zum Threonin377, jedoch liegt hier eine polare Wechselwirkung zwischen dem Chloratom und dem Aminosäurerückgrat vor (rot gestrichelte Linie). In guter Übereinstimmung sind die unterschiedlichen Anbindungsverhalten auch mit der Aktivität der 2-HPP Bildung ausgehend von substituierten Benzaldehyden, da besonders die Bildung des 4-Methoxy substituierten 2-HPP wesentlich langsamer verläuft als die des nicht substituierten 2-HPP und des 3-Chloro substituierten 2-HPP (Lingen et al. 2003).

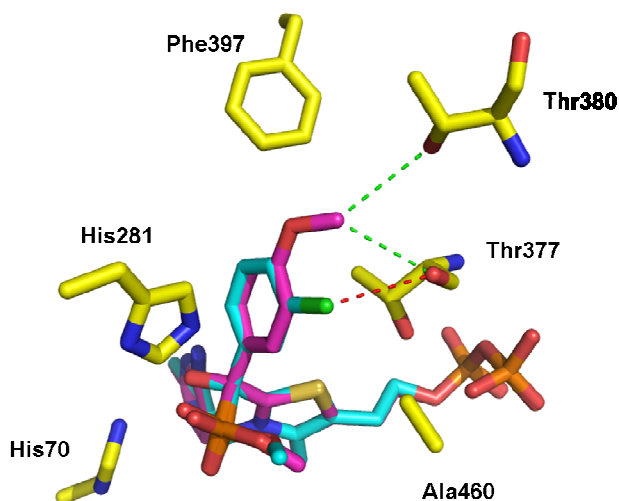


Abbildung 8.3: Überlagerung und Ausrichtung der substituierten Inhibitoren 3-Chloro-MBP (türkis; Chlor=grün) und 4-Methoxy-MBP (violett; Methylgruppe=violett) im aktiven Zentrum der wtBFD. Der hydrophobe Methoxyrest des 4-Methoxy-MBP steht in Nachbarschaft (grün gestrichelte Linien) mit den polaren Gruppen von Threonin380 und Threonin377. Der Chlorsubstituent des 3-Chloro-MBP steht in einer polaren Wechselwirkung (rot gestrichelte Linie) mit Threonin377.

8.2 Kristallisation der BFD A460I-F464I

Die Kristallisation der Variante BFD A460I-F464I mit dem Inhibitor MBP erfolgte analog der Kristallisation der wtBFD mit MBP (Bruning et al. 2009). Die röntgenkristallographischen Statistiken sind in Tabelle 8.2 aufgelistet.

Tabelle 8.2: Übersicht der röntgenstrukturkristallographischen Statistiken für die Kristallisations-experimente mit der BFD A460I-F464I.

Enzym-Inhibitor		BFD A460I-F464I MBP	
Data collection		Refinement	
wavelength	1,05	resolution range (Å)	19,7-2,0
space group	P1	reflections	125479/
		(work/test)	6736
cell dimensions (Å)	$a=70,9$ $b=92,5$ $c=94,0$	$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%)	14,1/18,0
cell dimensions (deg)	$\alpha=63,7$ $\beta=72,0$ $\gamma=72,6$	mean B -factor (Å ²)	15,1
resolution range (Å)	20,00-2,0 (2,03-2,0)	non-hydrogen atoms	18186
no. of observations	339205	water molecules	1922
no. of unique reflexions	132223	rms bond length	0,01
completeness (%)	97,7 (96,1)		
$I/\sigma(I)$	9,5 (2,0)		
R_{merge} (%)	9,9 (50,3)		
rms bond angle dev. (deg)	1,214		

Wie auch bei der Anbindung des MBP in der wtBFD, erfolgt auch bei der Variante BFD A460I-F464I die Bindung über Koordination des ThDP-MBP Komplexes durch polare Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten His70, His281 und Ser26 sowie die intermolekulare Wechselwirkung des Pyrimidinrings mit der Hydroxygruppe des vormaligen Carbonyls (siehe Abbildung 8.4 (A), rot gestrichelte Linien). Deutlich zu erkennen ist auch der erfolgreiche Aminosäureaustausch an den Positionen 460 und 464, an denen von Siegert et al. die Substitution von Alanin (Ala) und Phenylalanin (Phe) durch Isoleucin (Ile) vorgenommen wurde (Siegert et al. 2005). Eine direkte Überlagerung beider ThDP-MBP Strukturen (siehe Abbildung 8.4 (B und C)) zeigt die gute direkte Überlagerung der Aminosäuren Phenylalanin an Position 397, Serin an Position 26 und Histidin an Position 281. Eine wesentliche Veränderung findet jedoch an den Positionen 460 und 464 durch den Aminosäureaustausch statt. Auch der gesamte ThDP-MBP Komplex wird bei der Variante BFD A460I-F464I (braun) entgegen der Proteinstruktur an den Positionen der durchgeführten Mutationen verschoben, was sich besonders am Phosphonatrest und der daran gebundenen

Methoxygruppe zeigt. Der aromatische Ring des MBP zeigt hingegen nur eine sehr geringe Verschiebung.

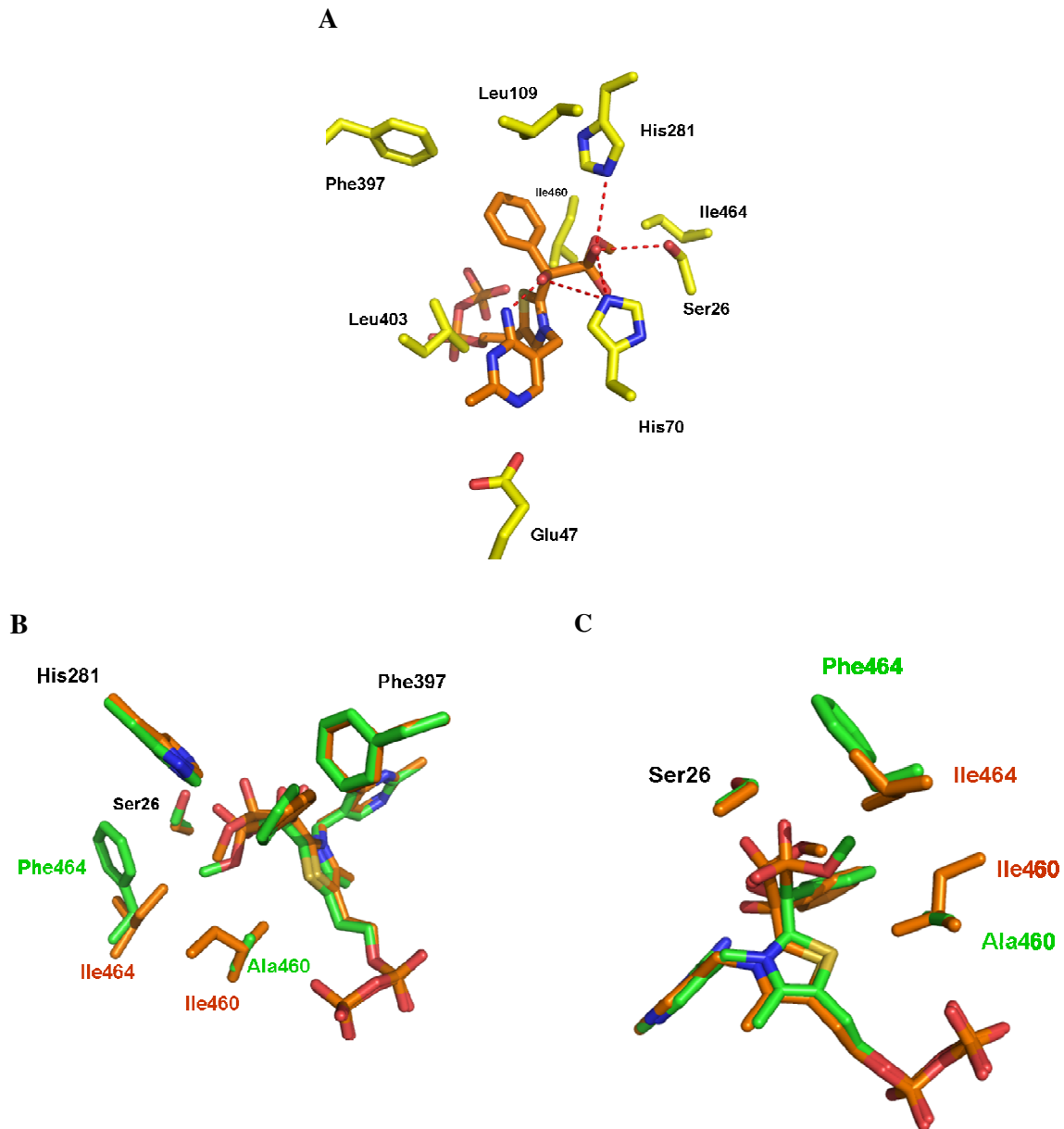


Abbildung 8.4: A: Anbindung des reversiblen Inhibitors MBP an das ThDP im aktiven Zentrum der Variante BFD A460I-F464I. B und C: Überlagerung der ThDP-MBP Komplexe von wtBFD (grün) und BFD A460I-F464I (braun).

Abbildung 8.5 zeigt die Überlagerung der beiden Helices (links) mit den betroffenen Aminosäureresten sowie die Oberflächendarstellung der entsprechenden Elektronendichteverteilung (mittlerer und rechter Abbildungsteil). Die Oberflächenstruktur bei der wtBFD (mittig, grün) zeigt die strukturelle Ausdehnung der Aminosäuren Alanin 460, Leucin 461 und Phenylalanin 464. Gut zu erkennen ist die räumliche Mulde zwischen den drei Aminosäureresten, in der der Methoxyrest des MBP ausgerichtet ist. Durch die Mutation

des Alanin an der Stelle 460 durch Isoleucin kommt es zu einer räumlichen Ausweitung der Helix, was gut in der Überlagerungsdarstellung der BFD A460I-F464I (rechts, braun) zu erkennen ist. Die Überlagerung beider Strukturen zeigt, dass durch die Mutation der Methoxyrest aus sterischen Gründen nicht mehr wie bei der wtBFD exakt in die Mulde passt, sondern etwas in Richtung des Leucin 461 verschoben wird. Gerade dieser Bereich des Proteinrückgrats wurde von Pohl et al. für die Bindung des Akzeptorsubstrats (in diesem Fall Acetaldehyd) identifiziert, wobei eine sogenannte „(S)-Pocket“ als Substratbindungstasche an der Position 461 postuliert wurde, deren Zugang über die Position 460 erfolgt (Knoll et al. 2006), (Gocke et al. 2008).

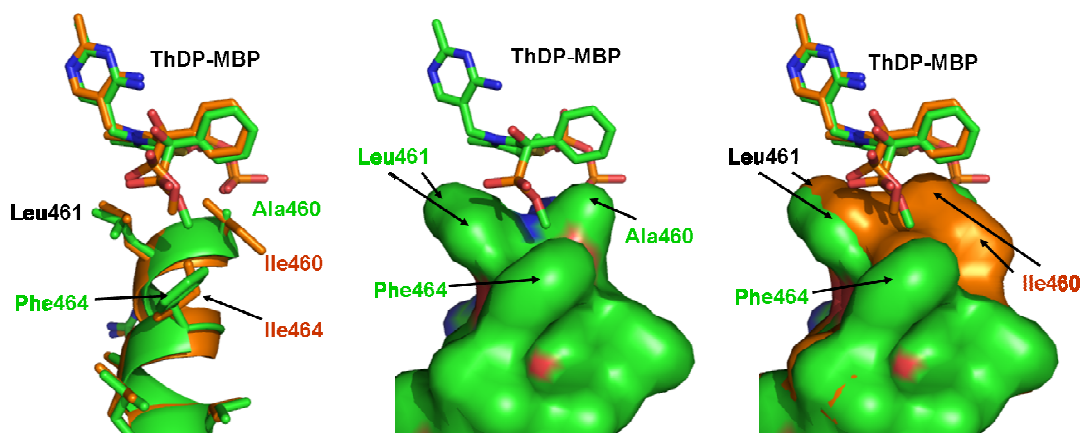


Abbildung 8.5: Kristallstrukturen der ThDP-MBP Komplexe von wtBFD (grün) und BFD A460I-F464I (braun). Abgebildet sind die helicalen Strukturen mit den Aminosäureresten (links) sowie die Oberflächendarstellungen der Elektronendichte der wtBFD (mittig) und der Überlagerung von wtBFD und BFD A460I-F464I (rechts).

Strukturell gesehen ist das MBP ein enges Produktanalogon des 2-HPP, sodass auch die Komplexe aus ThDP und MBP sowie ThDP und 2-HPP Analogien zeigen müssen. Besonders interessant ist daher der Vergleich der Komplexe aus wtBFD und MBP sowie der BFD A460I-F464I und MBP, da es sich bezüglich der 2-HPP Bildung um eine hoch (*S*)-selektive bzw. mäßig (*R*)-selektive Variante handelt. Da die Phenylreste der Benzoylgruppen bei beiden ThDP-MBP Komplexen gleich ausgerichtet sind, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Ausrichtung der analogen ThDP-2-HPP Komplexe bei der Carboligation gleich, sodass der stereoselektivitätsbildende Schritt bei der Carboligation die Art der Ausrichtung und Bindung des Acetaldehyds an das Enanmin-Carbanion, wie zuvor angenommen, sein muss. In Anlehnung an die Publikation von Iding et al. entspricht dies aus chemischer Sicht den Möglichkeiten eines sogenannten „*Si*“- und „*Re*“-Angriffs des Carbanions an die Carbonylgruppe des Acetaldehyds, wodurch das (*S*)- und (*R*)-Produkt zugänglich sind (Iding et al. 2000). Zu erkennen ist hier, dass die Methoxygruppen zwar in Richtung der Mutationsposition 464 ausgerichtet sind (siehe Mulde der Oberflächenstruktur in Abbildung 8.5, mitte und rechts), es jedoch im Vergleich von wtBFD zur Variante BFD A460I-F464I zu

einer Verschiebung des Methoxyrestes entgegengesetzt der Mutationsposition kommt. Die Variante BFD A460I-F464I bildet 2-HPP in etwa mit einem $ee_{(R)\text{-HPP}}$ von 50 %, was einem absoluten Anteil von 75 % (*R*)-HPP und 25 % (*S*)-HPP entspricht. Überträgt man dieses Verhältnis auf die Anbindung des MBP an das ThDP im aktiven Zentrum, so ist auch hier mit zwei unterschiedlichen Bindungsmodi im Verhältnis von 75 : 25 zu rechnen, also mit unterschiedlich ausgerichteten Methoxygruppen. Kristallographisch erfassen lässt sich jedoch nur das Mittel aller Strukturen, sodass die beobachtete Ausrichtung des MBP nur eine gemittelte Struktur ist. Die reale Ausrichtung des Methoxyrests für eine rein (*R*)-selektive Bindung wird daher vermutlich noch eine stärkere Verschiebung im Vergleich zum ThDP-MBP Komplex bei der wtBFD zeigen.

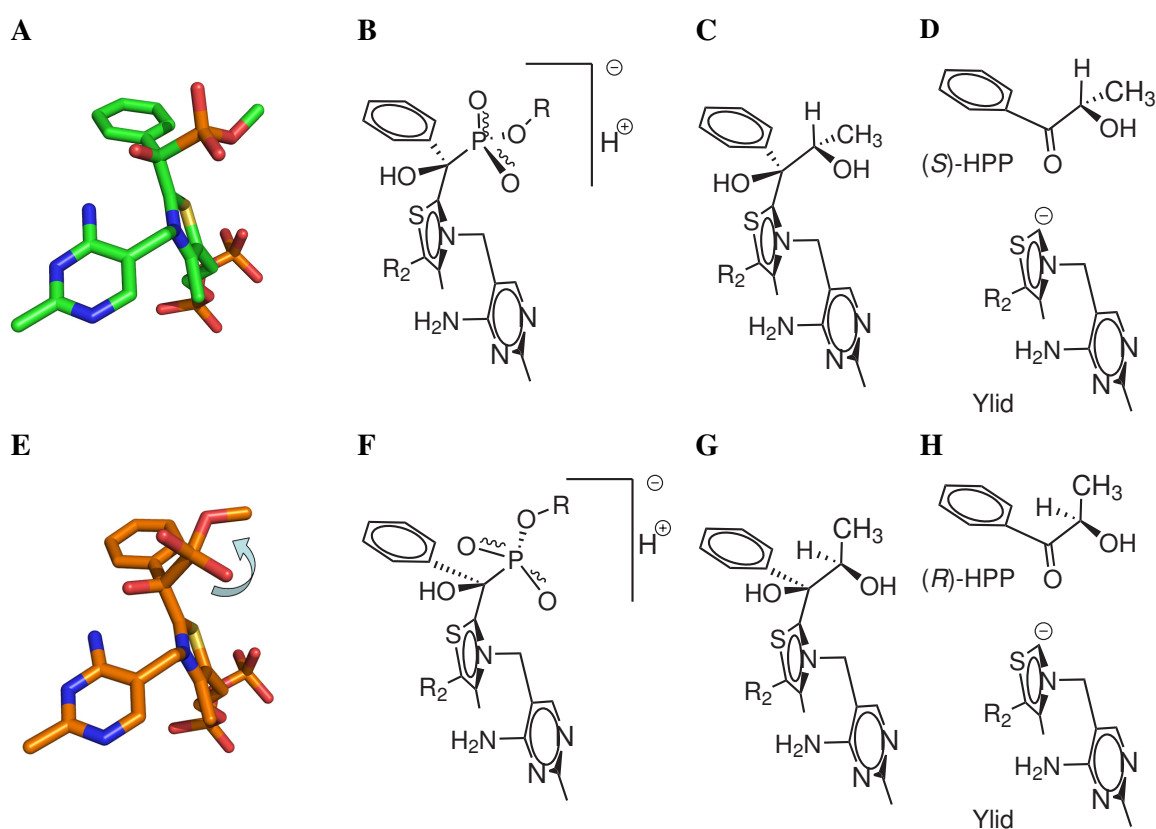


Abbildung 8.6: ThDP-MBP Komplexe in der wtBFD (A, B) und BFD A460I-F464I (E, F) sowie der daraus abgeleiteten potentiellen Ausrichtung der Carboligationsprodukte (*S*)-HPP (C, D) und (*R*)-HPP (G, H) bei der 2-HPP Bildung und Spaltung (C/G: kovalent gebunden sowie als Michaelis-Komplex(D/H)). Methoxygruppe = O-R; Ethyldiphosphat = R₂.

Abbildung 8.6 zeigt den Vergleich beider ThDP-MBP Komplexe sowie die daraus abgeleiteten ThDP-2-HPP Komplexe für die Bildung von (*S*)-HPP (A-D) sowie (*R*)-HPP (E-H). Im direkten Vergleich (A zu E) ist gut zu erkennen, dass die Verschiebung des Phosphonatrestes und der Methoxygruppe einer Drehung entgegengesetzt dem Uhrzeigersinn ähnelt, die nahezu einem Drehwinkel von 120° entspricht. Diese Drehung (vor allem der Methoxygruppe) lässt wiederum auf die Analogie von MBP auf 2-HPP schließen, da auch

hier der Unterschied zwischen (*S*)- und (*R*)-HPP durch die Drehung des Methylrestes um 120° (gut zu erkennen in den Abbildungsteilen D und H) bedingt sein muss.

Aus Abbildung 8.5 wird auch deutlich, dass bei der Benzoinbildung der Akzeptoraldehyd (Benzaldehyd) nicht in der Form in der *active site* ausgerichtet werden kann, wie der Methoxyrest des MBP. Aus sterischer Sicht ist für die Ausrichtung des Aromaten kein Platz in Richtung der ausgebildeten Mulde bzw. (*S*)-Tasche und somit muss es zwangsläufig zu einer veränderten Konformation kommen. Vermutlich wird daher auch der aromatische Ring des Akzeptoraldehyds bei der (*R*)-Benzoinbildung im Vergleich zum Methoxyrest beim MBP-ThDP Komplex gedreht sein. Eine entsprechende Kristallstruktur ist momentan jedoch nicht verfügbar.

8.3 Kurzzusammenfassung

In den Kristallisationsexperimenten zur BFD in Kooperation mit Dr. Marc Bruning von der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Proteindynamik unter Leitung von Dr. Hans Bartunik konnten erfolgreich folgende Enzym-Inhibitor Komplexe kristallisiert werden:

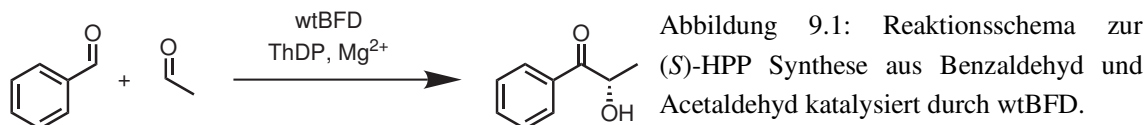
- wtBFD und MBP
- wtBFD und 3-Chloror-MBP
- wtBFD und 4-Methoxy-MBP
- BFD A460I-F464I und MBP

Beim Vergleich der Enzym-Inhibitor Komplexe lassen sich folgende Feststellungen treffen:

- Die Komplexe aus den MBP-Derivaten und dem ThDP in der *active site* liegen in kovalenter Form vor.
- Die Komplexe aus MBP und ThDP sind analog der Strukturen aus Substrat (2-HPP) und ThDP bei der Carboligation.
- Der Methoxyrest des 4-Methoxy-MBP steht in Wechselwirkung mit Threonin380 und Threonin377. Der Chlorsubstituent des 3-Chloro-MBP steht in Wechselwirkung mit Threonin377.
- Durch Überlagerung der Strukturen von wtBFD sowie BFD A460I-F464I zeigt sich, dass der Methoxyrest des MBP bei der Variante BFD A460I-F464I nicht in dem Maße in der (*S*)-Pocket ausgerichtet ist, wie bei der wtBFD. Übertragen auf die Ausrichtung der Substrate bei der 2-HPP Synthese kann dies qualitativ den Unterschied in der Enantioselektivität begründen.

9. Synthesen

9.1 Darstellung von (*S*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ((*S*)-HPP)



Die Synthese von (*S*)-HPP erfolgte bei einer Batch-Reaktionsführung in einem Glasreaktor mit einem Reaktionsvolumen von 10,5 L. Hierzu wurden die Substrate Benzaldehyd (42 mM) und Acetaldehyd (420 mM) mit den Cofaktoren ThDP (0,2 mM) und Mg^{2+} (2 mM) in Phosphatpuffer gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 1400 U_{2-HPP} wtBFD gestartet. Nach 12 h wurde ein Umsatz von 93 % erreicht und der Reaktionsansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt, bis ein Umsatz von 98 % erreicht wurde (siehe Abbildung 9.2). Nach Extraktion des Reaktionsansatzes und Entfernen des Lösungsmittels wurden 68,3 g (*S*)-HPP als Rohprodukt mit einem Enantiomerenüberschuss von $ee_{(S)\text{-HPP}} = 85\%$ erhalten. Das Rohprodukt wurde aus Isohexan umkristallisiert und als grobkristalline, weiße Nadeln isoliert. Die isolierte Ausbeute betrug 67,2 % (44,85 g) mit einer Reinheit von $ee_{(S)\text{-HPP}} > 99,9\%$.

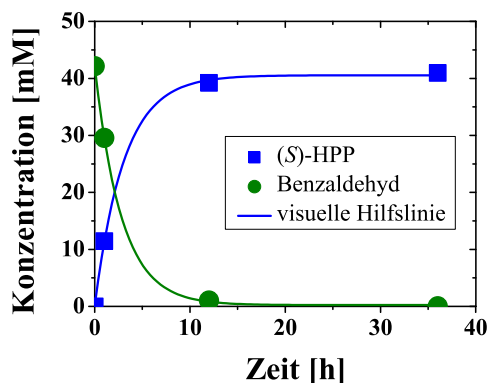
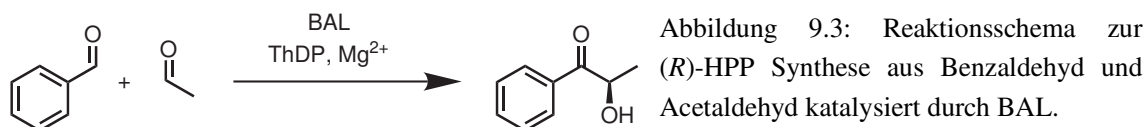


Abbildung 9.2: links: Konzentrations-/ Zeit-Verlauf der (*S*)-HPP Synthese ausgehend von 42 mM Benzaldehyd und 420 mM Acetaldehyd im 10,5 L-Maßstab katalysiert durch wtBFD. rechts: Auskristallisiertes (*S*)-HPP. Reaktionsbedingungen: 20 mM KP_i -Puffer (pH 7,5), 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM ThDP.

9.2 Darstellung von (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ((*R*)-HPP)

(*R*)-HPP wurde als Referenzsubstanz und Substrat mittels Benzaldehydlyase (BAL) synthetisiert, die freundlicherweise von Dr. Nils Kurlemann zur Verfügung gestellt wurde.



Die Reaktion wurde ebenfalls wie bei der Synthese von (*S*)-HPP in einer Batch-Reaktionsführung durchgeführt, jedoch in einem Reaktionsvolumen von 1 L. Die Substrate Benzaldehyd (43 mM) und Acetaldehyd (400 mM) wurden in Phosphatpuffer gelöst, dem 5 % (v/v) MTBE als Lösungsvermittler zugegeben wurden. Hierdurch wird die Löslichkeit des intermediär gebildeten (*R*)-Benzoins verbessert, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird (Stillger 2004). ThDP und Mg^{2+} wurden in einer Konzentration von 0,5 mM bzw. 2 mM zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 160 U BAL gestartet. Nach 105 h wurde dem Reaktionsansatz erneut 40 U BAL zugegeben (gestrichelte Linie), um vollständigen Umsatz zu erreichen. Wie in Abbildung 9.4 zu erkennen ist, steigt nach dem Reaktionsstart die Konzentration an (*R*)-Benzoin stark an, nimmt jedoch im Verlauf der Reaktion wieder ab. Bei der Auftragung der (*R*)-Benzoinkonzentration handelt es sich jedoch um berechnete Werte, da die Löslichkeit von Benzoin in 5 % MTBE deutlich geringer ist. Somit kommt es auch während der Reaktion zum Ausfallen von (*R*)-Benzoin, welches sich feinkristallin im Reaktionsansatz verteilt und die Reaktionslösung vorübergehend milchig/trüb erscheinen lässt. Nach vollständiger Abreaktion des Benzaldehyds und (*R*)-Benzoins zum (*R*)-HPP ist die Reaktionslösung klar und weist einen Enantiomerenüberschuss von $ee_{(R)\text{-HPP}} > 99,9\%$ auf.

Das (*R*)-HPP wurde mit Dichlormethan aus dem Reaktionsansatz extrahiert und nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 9,69 g Rohprodukt als gelbliches Öl erhalten. Nach Umkristallisation aus Isohexan wurden 6,3 g (*R*)-HPP als ~4 cm lange, grobkristalline und nadelförmige Kristalle mit einem $ee_{(R)\text{-HPP}} > 99,9\%$ isoliert. Dies entspricht einer isolierten Ausbeute von 97 %.

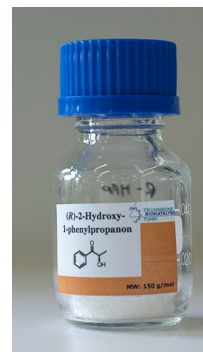
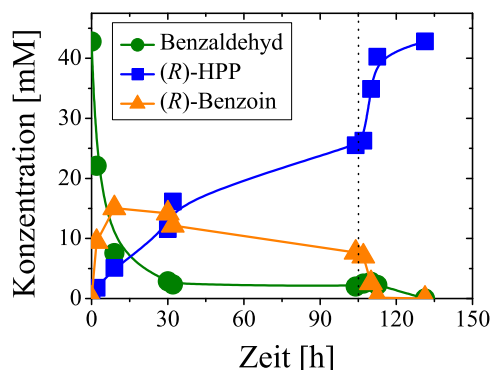
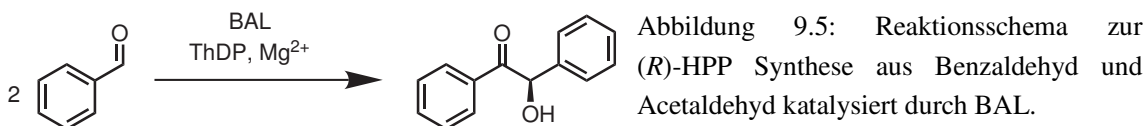


Abbildung 9.4: Konzentrations-/ Zeit-Verlauf der (*R*)-HPP Synthese ausgehend von 43 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd im 1 L-Maßstab katalysiert durch BAL. Nach 105 h wurde nochmals BAL (160 U + 40 U) nachdosiert (gestrichelte Linie). Rechts: Isoliertes (*R*)-HPP.

9.3 Darstellung von (*R*)-Benzoin; ((*R*)-2-Hydroxy-1,2-diphenylethan-1-on)



Für die Synthese von (*R*)-Benzoin wurden in 50 mL Phosphatpuffer die Cofaktoren ThDP (0,5 mM) und Mg^{2+} (2 mM) sowie 5 % (v/v) MTBE gelöst. Das Substrat Benzaldehyd wurde zu 20 mmol hinzugeben, wobei unter Rühren ein zweiphasiges flüssig/flüssig System entsteht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 U BAL gestartet und nach 48 h bei Vollumsatz durch Extraktion mit Dichlormethan beendet. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Waschen des Rohproduktes mit Isohexan wurden 1,6 g (*R*)-Benzoin isoliert (75,1 % isolierte Ausbeute). Der Enantiomerenüberschuss betrug $ee_{(R)\text{-Benzoin}} > 99,9 \%$.

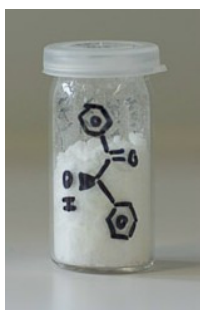
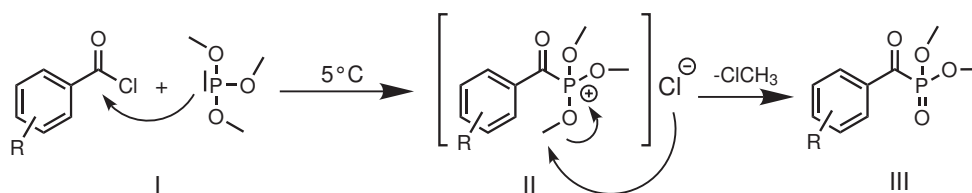


Abbildung 9.6:
Isoliertes (*R*)-Benzoin in kristalliner Form

9.4 Darstellung von 3-Chlor-, 4-Chlor- und 4-Methoxybenzoylphosphonatmethylester

Die Darstellung von 3-Chlorbenzoylphosphonatmethylester (3-Chloro-MBP), 4-Chlorbenzoylphosphonatmethylester (4-Chloro-MBP) und 4-Methoxybenzoylphosphonatmethylester (4-Methoxy-MBP) erfolgte in Anlehnung an die Synthesewege von Karaman et al. und O'Brien et al., die die Synthese von nicht substituierten Benzoyl- bzw. Acetylphosphonateestern beschreiben (Karaman et al. 1989), (O'Brien et al. 1980). Hier erfolgt die Darstellung der Produkte in einer Zweistufensynthese, wobei zunächst der Dimethylbenzoylphosphonatester klassisch in einer Michaelis-Arbuzov Reaktion aus dem entsprechenden Benzoylchlorid und Trimethylphosphit erhalten wird (Abbildung 9.4) (Michaelis, Kaehne 1898), (Arbuzov 1964). Hierbei greift das Trimethylphosphit in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion als Nukleophil die elektrophile Carbonylgruppe des Benzoylchlorids an (I) und bildet als Übergangskomplex das Phosphoniumchlorid des Trimethylbenzoylphosphonatesters (II).

Schritt 1: Michaelis-Arbuzov Reaktion



Schritt 2: Demethylierung

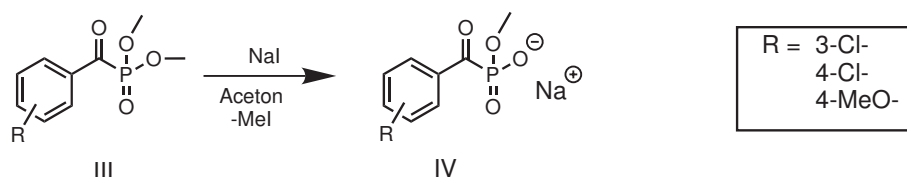


Abbildung 9.7: Zweistufiges Reaktionsschema zur Synthese der spezifischen Inhibitoren für ThDP-abhängige Enzyme 3-Chloro-, 4-Chloro- und 4-Methoxy-MBP.

In einer zweiten S_N2 -Reaktion reagiert das Chloridion mit dem Phosphoniumsalz unter Abspaltung von Chlormethan zum Dimethylbenzoylphosphonatester (III). In einem weiteren Schritt der Reaktion erfolgt die Demethylierung des Dimethylbenzoylphosphonatester (III) durch in Aceton gelöstem Natriumiodid. Unter Abspaltung von Methyljodid wird hierbei das Endprodukt Methylbenzoylphosphonatester (MBP; IV) als Natriumsalz gewonnen. Als Abwandlung zu den genannten Literaturstellen wurde in dieser Arbeit generell auf eine Destillation des Dimethylbenzoylphosphonatester (III) als ersten Aufreinigungsschritt verzichtet und der jeweilige Dimethylbenzoylphosphonatester (III) direkt als Edukt für die Demethylierung (Schritt 2) eingesetzt. Als Ausgangssubstanzen dienen die für diese Reaktion bislang noch nicht beschriebenen Substrate 3-Chlor-, 4-Chlor- und 4-Methoxybenzoylchlorid. Nach der Zugabe des Trimethylphosphit wechseln alle Reaktionsansätze von einer farblosen zu einer hellgelben Farbe der Lösung, aus der die synthetisierten Phosphonatester nach der Demethylierung als weiße Natriumsalze auskristallisieren. Diese wurden nach dem Abfiltrieren mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die isolierten Ausbeuten sind in Tabelle 9.1 angegeben.

Tabelle 9.1: Übersicht der eingesetzten Eduktmengen, Auswaagen und isolierten Ausbeuten für die Synthesereaktionen der Enzyminhibitoren 3-Chloro-, 4-Chloro- und 4-Methoxy-Benzoylphosphonatemethylester.

Produkt	Eduktmenge an substituiertem Benzoylchlorid [mmol]	Auswaage [g]	isolierte Ausbeute η [%]
3-Chloro-MBP	143	32,0	87,4
4-Chloro-MBP	250	57,4	89,6
4-Methoxy-MBP	147	30,2	81,6



Abbildung 9.8:

Auskristallisierte Natriumsalze der ThDP-Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Methoxy-MBP und 4-Chloro-MBP (von links nach rechts).

10. Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse der einzelnen Kapitel wurden bereits in den jeweiligen Kapiteln diskutiert, sodass hier eine kapitelübergreifende Diskussion stattfinden kann sowie die sich daraus ergebenden Perspektiven für weitere Untersuchungsansätze aufgezeigt werden können.

10.1 Beeinflussung der Enantioselektivität der BFD katalysierten 2-HPP Bildung

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ThDP abhängigen Enzyme wtBFD sowie der Varianten BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I wurden reaktionstechnisch bezüglich der Parameter

- Benzaldehydkonzentration,
- Acetaldehydkonzentration,
- pH-Wert,
- Temperatur sowie
- hydrostatischer Druck

untersucht. Dabei wurde die Bildung des Carboligationsprodukts 2-Hydroxy-1-phenylpropanon (2-HPP) ausgehend von den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd verfolgt, sowie in besonderer Weise die Beeinflussung der Stereoselektivität durch die aufgeführten Parameter.

Die Beeinflussung der Enantioselektivität durch die Benzaldehydkonzentration war für die wtBFD bereits durch Iding et al. bekannt sowie für die Varianten BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I durch Siegert et al. und bilden die Grundlage für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit (Iding et al. 2000), (Siegert et al. 2005). Durch Versuche in Anlehnung zu denen von Iding et al. und Siegert et al. konnten die bereits publizierten Ergebnisse reproduziert werden, wobei für alle Varianten eine eindeutige Abnahme des gebildeten (*S*)-HPP mit steigender Benzaldehydkonzentration beobachtet werden kann, was equivalent der Zunahme des gebildeten (*R*)-HPP ist. Besonders groß ist der Einfluss bei der Variante BFD A460I-F464I mit einem $\Delta ee = 27\%$ in einem Konzentrationsbereich bis 40 mM Benzaldehyd. Wesentlich geringer ist der Einfluss des Acetaldehyds, für den nur ein signifikanter Einfluss bei der Variante BFD A460I-F464I beobachtet werden konnte. In Verbindung mit dem Reaktionsmodell und den Kristallstrukturen zur Inhibierung der wtBFD und der BFD A460I-F464I durch MBP ist der geringe Einfluss des Acetaldehyds bislang nicht erklärbar, da nach jetzigem Kenntnisstand die Bindung des Acetaldehyds an das Enamin-Carbanion der stereoselektivitätsbeeinflussende Schritt ist. Darüber hinaus ist mit den momentan akzeptierten Reaktionsmodellen auch der im Vergleich wesentlich stärkere Einfluss des Benzaldehyds auf die Enantioselektivität der 2-HPP Bildung nicht erklärbar.

Als neuer Parameter konnte der pH-Wert identifiziert werden, durch den es besonders im leicht sauren Bereich zu einer Veränderung der Stereoselektivität kommt. Bei der wtBFD kann im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu keine Veränderung des Enantiomerenüberschusses beobachtet werden, eindeutig ist die Abhängigkeit jedoch bei den

anderen drei Varianten. Hier wird für alle drei Varianten ein gemeinsames lokales Maximum an gebildetem (*S*)-HPP bei einem pH-Wert von etwa 6,5 beobachtet, wobei durch gleichzeitige Erhöhung der Benzaldehydkonzentration der jeweils gegenteilige Effekt zu mehr gebildetem (*R*)-HPP auftritt. Durch eine Modellberechnung lässt sich der pK_S -Wert des Histidin281 zu $pK_S = 5,9$ bestimmen, womit rein phänomenologisch eine De-/Protonierung des Histidin281 mit dem beobachteten Effekt in Verbindung gebracht werden kann. Ähnliche Effekte einer pH-Beeinflussung wurden von Lummer et al. beobachtet, wobei auch hier die De-/Protonierung von Aminosäuren in der *active site* eine Rolle zu spielen scheint (Lummer et al. 1999). Bei hydrolytischen Enzymen wird hingegen eine strukturelle Veränderung der Enzymstruktur vermutet, die sich in einer Umlagerung eines entsprechenden Loops an der Enzymoberfläche auswirkt (Cipiciani et al. 2001). Die momentan zur Verfügung stehenden Analysemethoden sind jedoch noch nicht in der Lage, ein möglichst detailliertes Bild der Enzymstruktur bei Veränderung des pH-Wertes zu geben.

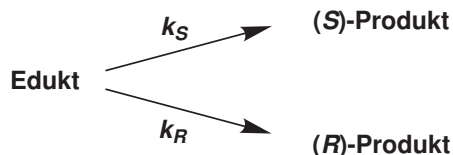
Die Temperaturabhängigkeit der Stereoselektivität, wie sie von Iding et al. für die wtBFD beobachtet wurde, kann auch für die drei Varianten gezeigt werden. Jedoch ist hier nicht eine generelle Verschiebung zu mehr (*R*)-HPP durch eine Temperaturerhöhung zu beobachten (im Kontrast zur Benzaldehydkonzentration), sondern generell ein Racemisierungsverhalten zu kleineren *ee*-Werten.

Als vollkommen neuer Parameter zur Beeinflussung der Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme wurde der hydrostatische Druck des Reaktionssystems (bis 250 MPa) identifiziert. Analog zum beobachteten Substrateffekt des Benzaldehyds findet hier durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks des Reaktionssystems eine Verschiebung der Stereoselektivität zugunsten des gebildeten (*R*)-HPP statt. Besonders interessant ist dieser Effekt bei der Variante BFD A460I, da im beobachteten Druckbereich von 0 bis 250 MPa eine Inversion der Stereoselektivität von (*S*) zu (*R*) zu beobachten ist. Für enzymatische Prozesse ist solch eine Inversion bis dato noch nicht beschrieben worden. Für den Einfluss des hydrostatischen Drucks konnte weiterhin gezeigt werden, dass die beobachtete Modifikation der Stereoselektivität reversibel ist und lediglich unter Hochdruck stattfindet. Da für alle Varianten eine Verschiebung des *ee* zu höheren (*R*)-HPP Werten unter Erhöhung des Drucks beobachtet wird und der Einfluss des Drucks auf den pH-Wert als erniedrigend gilt (für Phosphatpuffer), kann der Druckeffekt als eigenständiger Effekt postuliert werden. Auch eine eventuelle Temperaturvarianz im Reaktionssystem kann für den beobachteten Effekt ausgeschlossen werden, da der Temperatureffekt als generell *ee* erniedrigend und nicht wie beim Druck als *ee* verschiebend ist. Dieser gegenläufige Trend wird vor allem bei der Variante BFD A460I-F464I deutlich.

Der Enantiomerenüberschuss einer Reaktion stellt zwar ein gutes Maß dar, um das Produktverhältnis der Enantiomere zueinander zu bewerten, aus ihm lassen sich jedoch direkt keine Rückschlüsse auf die thermodynamischen Parameter der betrachteten Reaktionen ableiten. Dafür geeigneter ist das sogenannte Enantiomerenverhältnis *er* (*er* = enantiomeric ratio). Für das (*S*)- und (*R*)-Enantiomer sind *ee* und *er* definiert nach:

$$ee = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} \qquad er = \frac{[S]}{[R]}$$

Für eine irreversible Reaktion erster Ordnung gilt dabei ferner folgendes Reaktionsschema:



k_S und k_R sind die beiden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zur Bildung der beiden Enantiomere. Für die weitere Verknüpfung von ee und er gilt dann:

$$er = \frac{k_S * [\text{Edukt}]}{k_R * [\text{Edukt}]} \Leftrightarrow er = \frac{k_S}{k_R}$$

$$ee = \frac{k_S * [\text{Edukt}] - k_R * [\text{Edukt}]}{k_S * [\text{Edukt}] + k_R * [\text{Edukt}]} \Leftrightarrow ee = \frac{k_S - k_R}{k_S + k_R}$$

$$ee = \frac{er - 1}{er + 1} \Leftrightarrow er = \frac{ee + 1}{1 - ee}$$

Aus dem Zusammenhang von ee und er ist direkt ersichtlich, dass sie nicht linear voneinander abhängig sind und somit zwei Betrachtungsweisen von stereoselektiven Reaktionen darstellen, die sich grundlegend voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 10.1). So zeigt sich vor allem eine starke Veränderung des ee bei Veränderungen von kleinen Enantiomerenverhältnissen und umgekehrt eine sehr starke Beeinflussung des Enantiomerenverhältnisses bei Veränderungen von sehr hohen ee -Werten. An dieser Darstellung kann auch sehr gut veranschaulicht werden, dass besonders im Bereich von sehr niedrigen ee -Werten bereits kleine Messfehler einen relativ hohen Fehler in der Bestimmung des ee verursachen und somit die Fehlerbetrachtung des Systems vom jeweiligen ee -Bereich abhängt.

Für die thermodynamische Betrachtung der Stereoselektivität ist allerdings der er von höherer Bedeutung, da die Reaktionsgeschwindigkeiten von der Aktivierungsenergie ΔG abhängig sind:

$$k = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$$

Für die Betrachtung einer stereoselektiven Reaktion gilt danach:

$$er = \frac{k_S}{k_R} = \frac{e^{\frac{\Delta G_S}{RT}}}{e^{\frac{\Delta G_R}{RT}}} = e^{\frac{\Delta G_R - \Delta G_S}{RT}}$$

$$\Leftrightarrow er = e^{\frac{\Delta \Delta G}{RT}} \Leftrightarrow \Delta \Delta G = RT * \ln(er)$$

Aus dem Enantiomerenverhältnis der Reaktion kann somit auf die Differenz $\Delta \Delta G$ der beiden Aktivierungsenergien ΔG_S und ΔG_R geschlossen werden. Durch die Korrelation von er und ee ergibt sich die Abhängigkeit zu $\Delta \Delta G$ nach:

$$ee = \frac{e^{\frac{\Delta \Delta G}{RT}} - 1}{e^{\frac{\Delta \Delta G}{RT}} + 1} \Leftrightarrow \Delta \Delta G = RT * \ln\left(\frac{-(ee + 1)}{ee - 1}\right)$$

Der Zusammenhang von ee und $\Delta \Delta G$ ist in Abbildung 10.1 gezeigt.

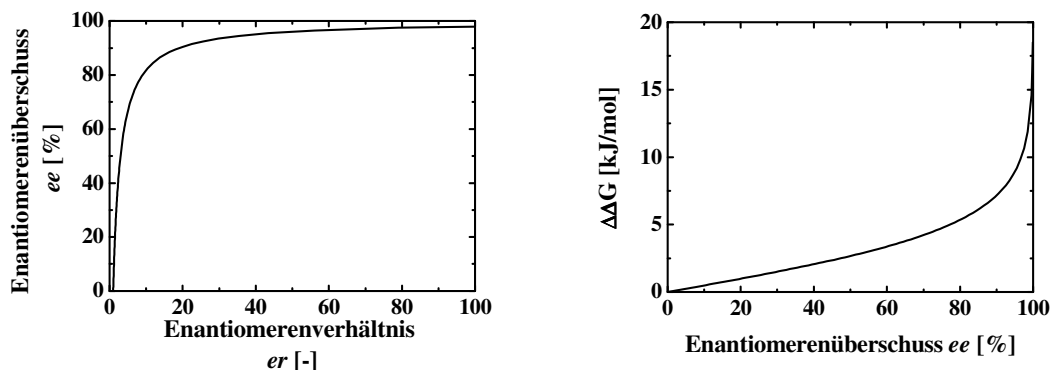


Abbildung 10.1: Auftragung des Enantiomerenüberschusses ee in Abhängigkeit vom Enantiomerenverhältnis er (links) sowie der Veränderung der Differenz der Aktivierungsenergien $\Delta \Delta G$ als Funktion des Enantiomerenüberschusses (rechts).

Für hohe ee -Werte ergibt sich somit eine wesentlich höhere Aktivierungsenergiedifferenz als für niedrige Enantiomerenüberschüsse. Betrachtet man also jeweils die Abnahme des ee von 95 % auf 90 % mit einer Abnahme von 25 % auf 20 %, so entspricht dies einer Differenz von $\Delta \Delta G = 1,75$ bzw. 0,26 kJ/mol.

Für das hier betrachtete Reaktionssystem aus Benzaldehyd, Acetaldehyd sowie der BFD als Enzym ist eine solche Betrachtung nur unter der Voraussetzung möglich, wenn man das Reaktionssystem auf ein System erster Ordnung reduzieren kann. Für enzymatische Reaktionen ist dies näherungsweise der Fall, wenn die durchgeführten Reaktionen bei Substratsättigung ablaufen und somit möglichst alle aktiven Zentren als Enzym-Substrat Komplexe bzw. für die BFD als ThDP-Benzaldehyd-Acetaldehyd Komplexe vorliegen. In einem solchen Substratsättigungsfall ist die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit dann nur

noch von der Katalysatorkonzentration abhängig. Für die durchgeführten Experimente unter hohem hydrostatischem Druck betrug die Benzaldehydkonzentration jeweils 30 mM sowie die Acetaldehydkonzentration 300 mM. Damit liegt die Benzaldehydkonzentration zwar näherungsweise im Sättigungsbereich ($K_{M,BA}$ -Werte zwischen 10,6-19,4 mM), die Acetaldehydkonzentration jedoch deutlich darunter ($K_{M,AA}$ -Werte zwischen 270-1350 mM). Experimentell ist die Erhöhung der Acetaldehydkonzentration jedoch nicht sinnvoll, da ansonsten die Inhibierung bzw. Deaktivierung der BFD durch Acetaldehyd zu stark wird. Auch gilt die Betrachtung nur für irreversible Reaktionen, wobei die Bildung des 2-HPP bzw. die Racemisierung der einzelnen Enantiomere ineinander nur als quasi irreversibel im direkten Vergleich zur Bildungsgeschwindigkeit unter Synthesebedingungen betrachtet werden darf. Eine vergleichende energetische Betrachtung soll dennoch an dieser Stelle durchgeführt werden, die entsprechenden Werte sind jedoch unter den gegebenen Bedingungen zu betrachten und zu bewerten.

Tabelle 10.1: Berechnung der $\Delta\Delta\Delta G$ -Werte für die unterschiedlichen Enantioselektivitäten im Bereich von 0-250 MPa unter Annahme einer irreversiblen Reaktionsführung für Reaktionen erster Ordnung.

Variante	$ee_{0\text{ MPa}}-ee_{250\text{ MPa}}$ [%]	$\Delta ee_{0-250\text{ MPa}}$ [%]	$\Delta\Delta G_{0\text{ MPa}}/\Delta\Delta G_{250\text{ MPa}}$ [kJ/mol]	$\Delta\Delta\Delta G$ [kJ/mol]
wtBFD	90 (S) – 79 (S)	11	7,2 / 5,2	2,0
BFD F464I	49 (S) – 26 (S)	23	2,6 / 1,3	1,3
BFD A460I	24 (S) – 17 (R)	41	1,2 / 0,8	2,0
BFD A460I-F464I	51 (R) – 79 (R)	28	2,7 / 5,2	2,5

Vergleicht man die Werte für die Differenzen in $\Delta\Delta G$ bei den unterschiedlichen Drücken für die einzelnen Varianten, so erhält man Werte für $\Delta\Delta\Delta G$ im Bereich von etwa 2 kJ/mol, wobei die Werte für die BFD F464I mit 1,3 kJ/mol und mit 2,5 kJ/mol für die Variante BFD A460I-F464I etwas davon abweichen. Im Rahmen der erwähnten Näherungen liegen jedoch alle Werte im gleichen Größenbereich, sodass man trotz der großen Unterschiede in den betrachteten Enantiomerenüberschüssen aus thermodynamischer Sicht von einem sehr ähnlichen Effekt sprechen kann. Im Vergleich zu den absoluten Aktivierungsenergien E_A (siehe Tabelle 4.7; 40 – 55 kJ/mol) für die 2-HPP Bildung (nicht stereoselektiv betrachtet) sind die beobachteten $\Delta\Delta G$ Werte bei Atmosphärendruck mit 1,2 – 7,2 kJ/mol deutlich geringer. Für die genaue Charakterisierung des Systems sind daher die Abschätzung der Aktivierungsenergien und deren Differenzen als Ergänzung zu den beobachteten Enantiomerenüberschüssen unabdingbar, da die Änderungen in den Enantiomerenüberschüssen letztendlich nur die Konsequenz von veränderten Aktivierungsenergien ist.

Betrachtet man das Reaktionssystem zur enantioselektiven 2-HPP Synthese unter produktiven Aspekten, so muss man alle beeinflussenden Parameter betrachten – sowohl zur

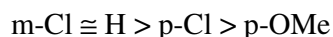
Enantioselektivität wie auch zur Aktivität der BFD Varianten und deren Stabilität. Zwar konnte in den Stabilitätsuntersuchungen in dieser Arbeit kein Aktivitätsverlust der BFD und der Varianten bei Lagerung in Phosphatpuffer beobachtet werden, jedoch wird von Iding et al. von einer äußerst negativen Beeinflussung für die wtBFD bei Zugabe der Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd berichtet (Iding et al. 2000). Auf Grund der Homologie der wtBFD zu ihren Varianten ist daher auch von einem negativen Effekt für diese auszugehen. Bei der Planung eines Verfahrens zur 2-HPP Synthese muss darüber hinaus festgelegt werden, welche Gewichtung die Enantioselektivität des zu synthetisierenden 2-HPP Gemisches hat. Bei der wtBFD werden beispielsweise die höchsten Enantioselektivitäten bei geringen Benzaldehydkonzentrationen und Atmosphärendruck erzielt, bei der BFD A460I-F464I hingegen bei hohen Benzaldehydkonzentrationen und hohen Drücken. Die Aktivität nimmt bei hohem Druck signifikant ab, bei hohen Benzaldehydkonzentrationen jedoch signifikant zu. Darüber hinaus spielt die (Langzeit-) Stabilität eine wichtige Rolle, die sowohl von den Substraten wie auch der Temperatur negativ beeinflusst wird (Iding et al. 2000). Ähnlich verhält es sich mit dem pH Wert, da auch hier die Beeinflussung der Enantioselektivität im leicht sauren Bereich gezeigt werden konnte, jedoch die Carboligationsaktivität deutlich verringert ist (Iding et al. 2000). Aus dieser Sichtweise ist daher zwischen Aktivitäts- und Selektivitätsmaxima sowie Aktivitäts- und Selektivitätsoptima klar zu unterscheiden. Letztere werden nur durch den Anspruch eines Prozesses bestimmt.

Neben der direkten asymmetrischen Synthese der 2-HPP Enantiomere wird die Enantioselektivität, wenn auch nur in sehr geringem Maße, durch die Spaltung des 2-HPP mit einer einhergehenden Racemisierung beeinflusst. Diese Eigenschaft der BFD, neben der Bildung des 2-HPP und Benzoin auch die Spaltung zu katalysieren konnte hier zum erstenmal gezeigt werden. Die analoge Lyaseaktivität des homologen Enzyms Benzaldehydlyase ist hingegen schon seit langem bekannt. Dabei spielt die Wahl des Puffersystems bei der BFD eine entscheidende Rolle, da eine wesentlich höhere Aktivität in Triethanolaminpuffer im Vergleich zu Phosphatpuffer beobachtet werden konnte. Die Racemisierungsgeschwindigkeit bzw. die Bildung des (*S*)-HPP aus (*R*)-HPP und vice versa zeigt dabei ein eindeutig enzymatisches Verhalten bezüglich des Substrats 2-HPP nach der Michaelis-Menten Kinetik und wird durch die Zugabe von Acetaldehyd stark inhibiert. Als weiteres typisches Verhalten zur Lyaseaktivität ThDP abhängiger Enzyme konnte die kinetische Racematspaltung von Benzoin gezeigt werden, wobei lediglich das (*R*)-Benzoin gespalten wird und daraus quantitativ 2-HPP in racemischer Form (wtBFD und BFD A460I-F464I) gebildet wird. Die Lyaseaktivität kann durch Hitzedeaktivierung der BFD sowie der Zugabe von spezifischen Enzyminhibitoren unterdrückt werden, wodurch der indirekte Beweis zur Lyaseaktivität gegeben ist. In allen Lyaseversuchen konnte Benzaldehyd nachgewiesen werden, wodurch offensichtlich wird, dass die Racemisierung von 2-HPP bzw. die Bildung von 2-HPP aus Benzoin und Acetaldehyd ein jeweils zweistufiger Prozess ist:

1. Spaltung von 2-HPP bzw. (*R*)-Benzoin zu Benzaldehyd + Acetaldehyd bzw. 2 Benzaldehyd
2. Rückbildung bzw. Bildung von 2-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd

Auch wenn die Lyaseaktivitäten bzw. Bildungsgeschwindigkeiten ausgehend von 2-HPP und Benzoin im Vergleich zur herkömmlichen 2-HPP Synthese ausgehend von Benzaldehyd wesentlich geringer sind, so muss die Reversibilität des ganzen Systems dennoch im Reaktionsmechanismus berücksichtigt werden. Ein weiterer Nachweis der Reversibilität des gesamten Reaktionssystems aus Benzaldehyd, Acetaldehyd, 2-HPP und Benzoin ist die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts aller Reaktionspartner. Dieses konnte für die wtBFD sowie die Varianten BFD F464I und BFD A460I-F464I erreicht werden. Da die Enzyme lediglich als Katalysatoren fungieren und somit keinen Einfluss auf die Gleichgewichtskonzentrationen der Substrate haben, müssen auch die beobachteten Gleichgewichtskonstanten K gleich sein, was hier mit Werten zwischen $6,3 \cdot 10^5$ und $9,5 \cdot 10^5 \text{ L}^2/\text{mol}^2$ gezeigt wurde.

Für den Nachweis der selektiven Inhibierung der BFD und der damit verbundenen Überprüfung der Reversibilität des Reaktionssystems wurden die drei Enzyminhibitoren 3-Chloro-Methylbenzoylphosphonat (3-Chloro-MBP), 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP in einer Michaelis-Arbuzov Reaktion synthetisiert. Alle drei Substanzen besitzen einen stark inhibierenden Charakter, der auf der reversiblen Bindung der Phosphonate an die Thiazoleinheit des ThDP basiert. Das Inhibierungspotential kann dabei sowohl durch Detektion des Inhibitor-ThDP Komplexes mittels CD-Spektroskopie sowie durch Überprüfung in direkten Aktivitätsassays bestimmt werden. Der rein kompetitive Charakter des unsubstituierten MBP wechselt dabei in Abhängigkeit der Substituenten von *meta*-Cl über *para*-Cl nach *para*-OMe zu einem verstärkt unkompetitiven Anteil. Mit dem einher geht auch das Inhibierungspotential der einzelnen Inhibitoren, was sich in folgender Reihenfolge der Substituenten am Phenylring abschwächt:



Hierbei beträgt die Spanne der Inhibierungsstärken $K^{0.5}$ nahezu drei Zehnerpotenzen.

In Kooperation mit Dr. Marc Bruning von der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie wurden die Inhibitoren MBP, 3-Chloro-MBP sowie 4-Methoxy-MBP mit der wtBFD sowie der Variante BFD A460I-F464I kokristallisiert und die Strukturen mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst. Durch das analoge Anbindungsverhalten aller Inhibitoren bzw. der Ausrichtung des Phenylrings des MBP können die unterschiedlichen Inhibierungsstärken zum Einen auf den elektronischen Charakter und zum Anderen auf den sterischen Platzbedarf der Substituenten zurückgeführt werden. Die Substitution des Chlors in *meta*-Stellung scheint dabei einen besonders starken Effekt auf die Inhibierung zu haben. Die Bindung des somit elektronenarmen ThDP-Ylids wäre besonders begünstigt.

Bei den Kristallstrukturen der wtBFD und der Variante BFD A460I-F464I sind besonders im Bereich der Mutationspositionen Veränderungen in der Oberflächenstruktur der Elektronendichteverteilung zu erkennen. Besonders im Bereich zwischen der Position 461 und 460 ist bei der Mutationsvariante eine verstärkte Ausbildung der Proteinseitenkette zu beobachten, wodurch der von Pohl et al. postulierte Substratbindungsplatz eingeschränkt wird (Knoll et al. 2006). Durch die Überlagerung der Kristallstrukturen von wtBFD und BFD A460I-F464I wird eine Verschiebung des Methoxyrests des ThDP-MBP Komplexes erkennbar. Übertragen auf die Ausrichtung des Akzeptorsubstrats Acetaldehyd bei der 2-HPP Synthese würde dies bedeuten, dass durch die Mutationen in der Variante BFD A460I-F464I die Ausrichtung und Bindung dahingehend verändert wird, dass die Möglichkeit zur Ausbildung einer zum (*S*)-Enantiomer führenden Struktur diskriminiert wird.

10.2 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit konnten zahlreiche und neue Erkenntnisse zur stereoselektiven Bildung von 2-HPP gewonnen werden, jedoch ergeben sich daraus auch zum Teil neue Fragenstellungen. Besonders gilt dies für den Einfluss des hydrostatischen Drucks auf die Enantioselektivität. Hier konnte zum ersten Mal der Einfluss des Drucks auf die Enantioselektivität eines ThDP abhängigen Enzyms gezeigt werden. Für die Variante BFD A460I-F464I wurde darüber hinaus zum ersten Mal eine Enantioselektivitätserhöhung für ein Enzym unter Einfluss hoher hydrostatischer Drücke gezeigt. Um diesen Effekt weiter zu untersuchen bietet sich beispielsweise die Untersuchung von anderen homologen ThDP Enzymen an, wie z.B. der Benzaldehydlyase oder der Verzweigtketten- α -Ketosäuredecarboxylasen (KdcA). Im Falle der KdcA wäre neben der Stereoselektivitätsbetrachtung in besonderem Maße auch die reine Produktselektivität äußerst interessant, da die KdcA unter Atmosphärendruck die Konstitutionsisomere 2-HPP sowie PAC bildet. In einer anderen Versuchsreihe wäre es äußerst interessant zu überprüfen, ob solche Effekte auch auf andere Enzymklassen wie z.B. Hydrolasen übertragbar sind. Dies könnte sowohl ein Effekt auf die stereoselektive Veresterung von racemischen Alkoholen aber auch auf die stereoselektive Verseifung bzw. Hydrolyse von racemischen Estern sein.

Aus den Inhibierungsstudien sowie den Kristallisationsexperimenten ergeben sich ebenfalls einige Anknüpfungspunkte. Durch die Inhibitoren aus der MBP-Gruppe konnten Rückschlüsse auf die Ausrichtung des aromatischen Rings und somit auf das katalytisch aktive Enamin-Carbanion geschlossen werden sowie durch die Ausrichtung der Methoxygruppe auch Hinweise auf die Ausrichtung des Akzeptoraldehyds im aktiven Zentrum. Was bislang jedoch noch nicht geklärt werden konnte ist die Ausrichtung eines Aromaten als Akzeptorsubstrat. Zwar werden Benzoinen von der BFD nur in geringen Mengen als Nebenprodukte gebildet, jedoch sind beispielsweise mit der BAL Benzoinen auch im größeren Maßstab zugänglich. Bei der BAL müsste es daher auch möglich sein, neben einem reinen ThDP-MBP Komplex auch einen analogen Komplex aus dem Enamin (gebildet aus ThDP und Benzaldehyd) und MBP zu beobachten. Alternativ wäre auch der Einsatz eines

MBP analogen Inhibitors möglich, der nicht als Methylester sondern als Phenylester vorliegt. Dies könnte beispielsweise Phenylbenzoylphosphonat sein.

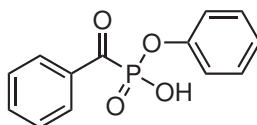


Abbildung 10.2: Struktur von Phenylbenzoylphosphonat als potentieller Inhibitor ThDP abhängiger Enzyme mit substratanaloger Struktur der Benzoinne.

Interessant wäre natürlich auch dessen Anbindung an die BFD. Da die BFD jedoch Benzoinne nur äußerst schlecht als Substrate akzeptiert, kann die Beobachtung eines solchen Inhibitor-ThDP Komplexes bei der BFD als äußerst schwierig eingeschätzt werden. Bei der Inhibierung der BAL wäre wahrscheinlich auch die Kristallisation mit dem Inhibitor möglich.

Aus der Inhibierungsstudie mit dem Inhibitor 4-Methoxy-MBP konnte ein eindeutig zunehmend unkompetitiver Inhibierungsanteil beobachtet werden, der eventuell von einem solchen ThDP/Benzaldehyd/4-Methoxy-MBP Komplex hervorgerufen wird. Aufschluss hierzu könnte eine Intermediatanalyse liefern, wie sie auch von anderen ThDP-Inhibitor-Komplexen bekannt ist. Nach der Bildung der Komplexe im Enzym werden diese mittels Trichloressigsäure gequench und die betreffenden Intermediate bzw. Komplexe durch NMR-Spektroskopie sowie hochauflöser Massenspektrometrie nachgewiesen.

Sollte die Bildung eines solchen ThDP-Benzaldehyd-MBP Komplexes tatsächlich die Ursache für den zunehmend unkompetitiven Inhibierungsanteil sein, so sollte dieser auch in besonderem Maße bei der Inhibierung der BAL zu beobachten sein.

11. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die wtBFD sowie die drei Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I hinsichtlich ihrer Stereoselektivität bei der Bildung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon (2-HPP) charakterisiert.

Als stark enantioselektivitätsbeeinflussende Parameter konnten die Temperatur sowie die Benzaldehydkonzentration in Anlehnung an vorhandene Literaturdaten bestätigt und näher charakterisiert werden. Für Temperaturerhöhungen kann dabei generell ein selektivitäts-erniedrigender Effekt beobachtet werden sowie für die Benzaldehyderhöhung eine Verschiebung zu erhöhter (*R*)-HPP Bildung. Als vollständig neue Parameter für die Beeinflussung der Stereoselektivität wurden der pH-Wert sowie der hydrostatische Druck des Reaktionssystems identifiziert. Für den pH-Wert wurden maximale *ee*-Werte zur Bildung von (*S*)-HPP im Bereich von pH 6,5 ermittelt, wobei im alkalischen Bereich keine Veränderung des *ee* beobachtet werden konnten. Der Einfluss des hydrostatischen Drucks zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Benzaldehydkonzentration, da auch hier durch Erhöhung eine Verschiebung der Stereoselektivität zu Gunsten des gebildeten (*R*)-Produktes stattfindet. Im Falle der Variante BFD A460I zeigt sich eine Inversion der Stereoselektivität über den betrachteten Druckbereich bis 250 MPa sowie für die Variante BFD A460I-F464I eine Erhöhung der Enantioselektivität. Im Kontrast zur Benzaldehydkonzentration bewirkt die Erhöhung des Druckes jedoch eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität. Durch die Relaxation von Hochdruckexperimenten sowie die Preinkubation der BFD konnte der Einfluss des hydrostatischen Drucks auf die Stereoselektivität und Aktivität als eindeutig reversibel nachgewiesen werden.

Neben der Kinetik zur 2-HPP Bildung ausgehend von Benzaldehyd sowie Acetaldehyd konnte für das Reaktionssystem auch erstmalig die Reversibilität und somit eine Lyaseaktivität der BFD nachgewiesen werden. Die Umwandlung der 2-HPP Enantiomere ineinander folgt dabei einer Michaelis-Menten Kinetik und ist stark durch Acetaldehyd inhibiert. Neben der Lyaseaktivität bezogen auf 2-HPP konnte diese auch für (*R*)-Benzoin in einer kinetischen Racematspaltung bei allen Varianten gezeigt werden. Als Produkte wurden enantiomerenreines (*S*)-Benzoin sowie 2-HPP in nahezu racemischer Form beobachtet. In einer Versuchsreihe zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts der Substrate Benzaldehyd, Acetaldehyd, 2-HPP sowie Benzoin konnten für die wtBFD sowie die BFD F464I und BFD A460I-F464I Gleichgewichtskonstanten ermittelt werden. Ausgehend von der beobachteten Lyaseaktivität wurde der bislang akzeptierte Reaktionsmechanismus dementsprechend ergänzt.

Als neue und selektive Enzyminhibitoren für ThDP abhängige Enzyme wurden 3-Chloro-, 4-Chloro- sowie 4-Methoxy-MBP synthetisiert und bezüglich ihres Inhibierungsverhaltens charakterisiert. In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe Proteindynamik (Dr. Bartunik und Dr. Bruning) der Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie am DESY/Hamburg konnten die Inhibitoren erfolgreich mit der wtBFD sowie der Variante BFD A460I-F464I kokristallisiert und die Strukturen durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt

werden. Besonders im Bereich der Position 460 konnte eine Ausweitung des Proteinrückgrats beobachtet werden, der für die Substratbindung des Akzeptorsubstrats verantwortlich ist. Bei analogen Strukturen der wtBFD und der BFD A460I-F464I in Komplex mit dem Inhibitor MBP konnte eine Verschiebung des Akzeptorsubstrat analogen Methoxyrests gezeigt werden.

Anhang

A Material und Methoden

A.1 Material

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Acros Organics (Geel, Belgien), Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka Chemie (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Geräte

Blue Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
CD-Spektropolarimeter:	JASCO Inc., Easton/Maryland, USA
Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter	
<i>E. coli</i> SG13009 Zellen	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage Sartorius CP224S	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage Christ alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode am Harz, Deutschland
HPLC-System Agilent 1100 Series mit binärer Pumpe, thermostatisiertem Probengeber, Dioden-Array und Multiwellenlängendetektor	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland
HPLC System Sykam mit Solvent delivery system S1100, HPLC controller S2000, Column thermo controller S4010 sowie	Sykam GmbH, Eresing, Deutschland
Intelligent Sampler Jasco 851-AS und UV-Detektor UVIS 200	Jasco GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland
HPLC-Säule LiChrospher® 100 RP8, 250x5	Linear Instruments, San Jose, USA
HPLC-Säule Chiralcel® OD-H, 250x4,6	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kolbenpumpe P500	Chiral Technologies, Illkirch, Frankreich
Laborwaage PC440	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
LC Säule Superformance 600-26	Mettler GmbH, Gießen, Deutschland
	Götec Labortechnik GmbH, Mühlthal, Deutschland
LC Säule Pharmacia XK26	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Massenspektrometer:	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland,
Bruker MicrOTOF	Bruker Daltonics Inc., USA
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden, Deutschland
NMR: Bruker Avance 400	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
NMR: Varian Gemini-2000BB	Varian Inc., Palo Alto, USA
pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, Deutschland

Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Q-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Rotationsverdampfer R-200	Büchi Labortechnik GmbH, Flaviil, Schweiz
Stopped Flow Spektrophotometer:	Applied Photophysics Limited
Stopped Flow	Leatherhead, United Kingdom.
Spektrophotometer/Fluorimeter	
<i>SX-18MV</i>	
Superdex 200	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Thermostat E100	Lauda GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Ultrafiltrationszellen	Amicon GmbH, Witten, Deutschland
Ultrafiltrationsmembran 30 kDa	Millipore GmbH, Schwallbach, Deutschland
Ultraschallhomogenisator Sonifier 450	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
UV-Detektor LKB 2151	LKB, Bromma, Schweden
NMR: Spinworks 3.1 Software	University of Manitoba, Winnipeg, Canada
pK _s -Berechnung: H ⁺⁺	http://biophysics.cs.vt.edu/H++/index.php
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

A.2 Methoden

Die benötigten Plasmide wurden freundlicher Weise von Frau Prof. Dr. Martina Pohl (AG Biokatalyse und Biosensoren; Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

A.2.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* SG13009 Zellen

In einem 1 L Schikanekolben werden 125 mL SOB-Medium vorgelegt und mit *Escherichia coli* SG13009 Zellen angeimpft. Die Kultur wird bei 25°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ inkubiert und danach für 10 min auf Eis gestellt. Das Kulturmedium wird 10 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet anschließend bei 0°C in 40 mL TB-Puffer resuspendiert, 10 min inkubiert und wiederholt zentrifugiert. Nach wiederholter Resuspension des Zellpellets in 10 mL TB-Puffer werden 7% (v/v) DMSO zugefügt und die Kultur für 10 min inkubiert. Die erhaltene nun kompetente Zellkultur wird in Kryogefäßen zu jeweils 800 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

A.2.2 Transformation der Plasmide in *E. coli* SG13009 und Stammerhaltung

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und 200 µL entnommen. Dazu werden 5 µL Plasmidlösung gegeben und die Zellen anschließend für 30 min im Eisbad inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 42°C für 30 Sekunden einem Hitzeschock unterzogen und danach 800 µL SOC-Medium zugegeben. Die Zellen werden nach der Transformation für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm inkubiert und anschließend auf LB-Agar Platten ausplattiert.

Allen Medien wird das Antibiotikum Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/mL zugegeben, da der Stamm *E. coli* SG13009 über eine Kanamycin-Stammresistenz verfügt.

Dem LB-Agar sowie LB-Medium wird zusätzlich das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/mL zugegeben, da die transformierten Zellen über eine erworbene Ampicillin-Plasmidresistenz verfügen. Als Negativkontrolle zur Transformationsüberwachung dient das Ausplattieren von nicht transformierten kompetenten Zellen.

Zur Stammerhaltung werden 125 mL LB-Medium in einem 1 L Schikanekolben mit beiden Antibiotika (s.o.) versetzt und mit den transformierten Zellen von den LB-Agarplatten beimpft. Die Zellkulturen werden einmal in frisches LB-Medium mit Antibiotika übergeimpft und die Kulturen bis zu einer $OD_{600}=1-2$ bei 38°C und 150 rpm inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Kultur wird zu jeweils 10 mL aliquotiert und bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets werden in 20%igem (v/v), eisgekühltem Glycerin resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung kompetenter Zellen, Transformation sowie Stammerhaltung werden unter sterilen Laborbedingungen und soweit möglich in einer Sterilbank durchgeführt.

Tabelle A1-A5. : Zusammensetzung der zur Transformation und Zellkultur benötigten Medien und Puffer.

SOB-Medium	Konzentration	SOC-Medium	Konzentration
Trypton	20 [g/L]	SOB-Medium mit zusätzlich	
Hefeextrakt	5 [g/L]	D-Glukose Monohydrat	20 [mM]
NaCl	0,5 [g/L]		
KCl	2,5 [mM]		
der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt, danach Zugabe von:			
MgCl ₂	10 [mM]		
TB-Puffer	Konzentration [mM]	LB-Medium	Konzentration [g/L]
PIPES	10	Pepton	10
CaCl ₂	15	Hefeextrakt	5
KCl	250	NaCl	5
der pH-Wert wird auf 6,7 eingestellt, Zugabe von :			
MnCl ₂	55		
LB-Agar	Konzentration [g/L]		
		LB-Medium mit zusätzlich	
		Agar	18,75

A.2.3 Fermentation von *E. coli* SG13009

Alle benötigten Zellen wurden in einem 2 L Folienfermenter der Firma Bioengineering unter Substrat limitierenden Bedingungen fermentiert. Zum Animpfen des Fermenters wurden zunächst Zellen aus der Stammerhaltung in LB-Medium angezogen und diese Kultur direkt verwendet.

Der Fermenter wird zur Zellkultur zunächst mit etwa 850 mL RO-Wasser befüllt, die pH- sowie O₂-Sonde eingesetzt und der Fermenter entsprechend der Betriebsanleitung autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden 100 mL Batch-Medium, jeweils 5 mL Glukose-, Magnesiumsulfat- und Vitaminlösung, 4 mL Spurenelementelösung sowie 0,5 mL Desmophen als Antischaummittel zugegeben. Ampicillin und Kanamycin werden auf eine Endkonzentration von 100 bzw. 50 µg/mL zugegeben.

Tabelle A6-A11 : Zusammensetzung der für die Fermentation benötigten Medien und Lösungen.

Batch-Medium	Konzentration [g/L]
KH ₂ PO ₄	130
K ₂ HPO ₄	100
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	60
(NH ₄) ₂ SO ₄	20
NH ₄ Cl	2
Hefeextrakt	30

Glukoselösung	Konzentration [g/L]
D-Glukose Monohydrat	636

Magnesiumsulfatlösung	Konzentration [g/L]
MgSO ₄ *7H ₂ O	200

Spurenelemente	Konzentration [g/L]
CaCl ₂ *2H ₂ O	10
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,5
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,25
MnSO ₄ *H ₂ O	2,5
CoCl ₂ *6H ₂ O	1,75
H ₃ BO ₃	0,125
AlCl ₃ *6H ₂ O	2,5
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,5
FeSO ₄ *7H ₂ O	10

Vitaminlösung	Konzentration [g/L]
Thiamin-Hydrochlorid	10
Nicotinsäure	0,5
Pyridoxin-Hydrochlorid	0,5
Ca-Panthotenat	0,5
Riboflavin	0,1
Cyanocobalamin	0,01
Folsäure	0,002
Biotin	0,001

Feed-Lösung	Volumen [mL]
Batch-Medium	50
Glukoselösung	418
MgSO ₄ -Lösung	25
Vitaminlösung	2,5
Spurenelemente	2

Der Fermenter wird mit etwa 4-5 mL der vorbereiteten Zellkultur angeimpft und die Kultur über Nacht als Batchfermentation betrieben. Nach durchschnittlich 12-14 h sind die Substrate des komplexen Medienanteils sowie die Glukose verbraucht und die Fermentation wird als Fed-Batch durch Anschluss der Feed-Lösung fortgeführt.

Die Sauerstoffsättigung wird mittels Rührerdrehzahl, Luft- sowie Sauerstoffbegasung eingeregelt und permanent über 40 % Sättigung gehalten. Der pH Wert wird während der Fermentation mit 25 %iger Ammoniaklösung auf konstant pH 7,1 eingestellt und die Fermentationstemperatur auf 38°C. Nach etwa 24 h werden die Zellen durch Zugabe von 1,5 mM IPTG induziert und die Temperatur zur Verringerung des Anteils von nicht löslichem Zielproteins während der Expression auf 28°C verringert (Kube et al. 2006). Nach etwa 36 h Gesamtfermentationsdauer werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert.

A.2.4 Enzymreinigung

Aufarbeitung der Benzoylformiatdecarboxylase Varianten

Für die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurden verschiedene Enzymchargen der wtBFD wie auch der einzelnen Mutanten verwendet, sodass hier des Umfanges wegen jeweils nur eine Aufarbeitung beispielhaft für die wtBFD wie für die Mutanten beschrieben wird. Die durchgeführten Aufarbeitungen variierten dabei in der Menge der genutzten Zellmengen, die Mengen der verwendeten Puffer wurden den Zellmengen angepasst.

Da die rekombinante wtBFD im Gegensatz zu den Mutanten BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I als His-tag Fusionsprotein vorlag, wurden auch verschiedene Aufreinigungsstrategien verfolgt. Die wtBFD wurde standardmäßig über immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie und Ultrafiltration gereinigt, wohingegen die Mutanten per Anionenaustauschchromatographie, Ultra- und Gelfiltration gereinigt wurden. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Arbeitsschritte bei einer Temperatur von 4°C. Der Fortschritt der Aufreinigung wurde mittels Aktivitätsassays und Gelelektrophorese verfolgt.

Zellaufschluss von *Escherichia coli* SG13009

Der Zellaufschluss der *E. coli* Zellen erfolgte teils enzymatisch wie auch mechanisch durch einen partiellen Verdau der Zellwände durch Lysozym mit anschließender Ultraschallbehandlung. Hierzu wurden ca. 70 g tiefgekühlte Zellen (Zellfeuchtmasse) in 100 mL Aufschlusspuffer aufgetaut und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 20 mg Lysozym versetzt und 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Nach dem partiellen Verdau wurde die Zellsuspension zu jeweils 30 mL aliquotiert und per Ultraschall für 3*5 min bei 0°C aufgeschlossen. Der erhaltene Zellaufschluss wurde auf pH 7,5 eingestellt und für 30 min bei 25.000 rpm zentrifugiert. Der so erhaltene zellfreie Extrakt (*cell free extract* = CFE) wurde für die weiteren Aufreinigungsschritte verwendet.

Tabelle A12. : Zusammensetzung der Aufschlusspuffer zur Herstellung der zellfreien Extrakte.

Aufschlusspuffer	Konzentrationen [mM]	Konzentrationen [mM]
	für wtBFD	für BFD-Mutanten
K ₂ HPO ₄	50	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2	2
ThDP	0,5	0,5
NaCl	***	50
pH	7,0	7,5
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ eingestellt.		

Reinigung der wtBFD

Die benutzte wtBFD lag als Fusionsprotein mit His-tag vor, was eine standardmäßige Aufreinigung per immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) (Hochuli et al. 1987) ermöglicht. Benutzt wurde dazu eine Pharmacia XK 26 Säule mit einer Füllmenge von 100 mL Ni(II)-NTA-Agarose Partikeln, die mit Aufschlusspuffer equilibriert wurden. Nach dem Auftragen des zellfreien Extraktes (CFE) wurden die unspezifisch bindenden Proteine mit Waschpuffer (50 mM Imidazol) und anschließend die wtBFD mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert. Der CFE wurde mit einer Pharmacia P 500 Pumpe und einer Flussrate von 60 mL/h aufgetragen, der Wasch- und Elutionsschritt erfolgte hingegen bei einer Flussrate von 120 mL/h.

Tabelle A13-A14.: Zusammensetzung des Wasch- und Elutionspuffers für die wtBFD Aufreinigung mittels Ni(II)-NTA Agarose Partikel.

Waschpuffer	Konzentrationen [mM]	Elutionspuffer	Konzentrationen [mM]
K ₂ HPO ₄	50	K ₂ HPO ₄	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2	MgCl ₂ *7H ₂ O	2
ThDP	0,1	ThDP	0,1
Imidazol	50	Imidazol	250
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 7,0 eingestellt		der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 7,5 eingestellt	

Die aktiven wtBFD Fraktionen wurden vereinigt, in einer Ultrafiltrationszelle (cut off 30 kDa) aufkonzentriert und mit Entsalzungspuffer umgepuffert. Die Enzymlösung wurde bei -80°C eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Das Enzym wurde danach als weißes Pulver bei -20°C gelagert und für die Versuche portionsweise entnommen.

Tabelle A15.: Zusammensetzung des Entsalzungspuffers für die Umpufferung der wtBFD aus der IMAC.

Entsalzungspuffer	Konzentrationen [mM]
K ₂ HPO ₄	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2
ThDP	0,1
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 6,5 eingestellt	

Reinigung der BFD Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I

Da die BFD Mutanten über keinen His-tag verfügen, wurden sie alternativ über einen Anionenaustauscher mit Hilfe eines Chloridgradienten aufgereinigt.

Der zellfreie Extrakt wurde mit einer Flussrate von 120 mL/min auf eine Merck Superformance 600/26 Säule mit einer Füllmenge von 300 mL Q-Sepharose Fast Flow gegeben, die zuvor mit Aufschlusspuffer equilibriert wurde. Nicht bzw. sehr schwach bindende Proteine wurden mit zwei Säulenvolumina Elutionspuffer 1 von der Säule eluiert. Die Elution der BFD Mutanten erfolgte per linearem Gradient über drei Säulenvolumina von Elutionspuffer 1 zu Elutionspuffer 2. Die Flussrate während der Wasch- und Elutionsschritte wurde je nach Systemdruck zwischen 120 und 180 mL/h eingestellt.

Tabelle A16-A17: Zusammensetzung der Elutionspuffer für die Anionenaustauschchromatographie (ANX).

Elutionspuffer 1	Konzentrationen [mM]	Elutionspuffer 2	Konzentrationen [mM]
K ₂ HPO ₄	50	K ₂ HPO ₄	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2	MgCl ₂ *7H ₂ O	2
ThDP	0,1	ThDP	0,1
NaCl	150	NaCl	300
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 7,5 eingestellt		der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 7,5 eingestellt	

Die Fraktionen mit signifikant enzymatischer Aktivität wurden vereinigt und der pH auf 6,5 eingestellt. Das Volumen wurde mittels Ultrafiltration (cut off 30 kDa) auf 20 mL reduziert und die Enzymlösung zu zwei mal 10 mL aliquotiert. Die Entsalzung der so gewonnenen Enzymlösungen erfolgte per Gelfiltration mit einer Superdex 200 Matrix in einer Pharmacia XK 26 Säule (Säulenvolumen = 300 mL). Aufgetragen wurden jeweils die 10 mL Aliquots und die Entsalzung erfolgte mit Entsalzungspuffer (siehe Tabelle A15) bei einer Flussrate von 120 mL/h. Die aktive Enzymfraktion wurde jeweils aufgefangen, bei -80°C tiefgefroren und gefriergetrocknet. Die so erhaltenen BFD Präparationen wurden bei -20°C als weiße Pulver aufbewahrt und für die Versuche portionsweise entnommen.

A.2.5 Reinigung der Variante BFD A460I-F464I für die Enzymkristallisation

Die Aufreinigung erfolgte direkt mit dem zellfreien Rohextrakt per Farbstoff-Affinitätschromatographie über eine Blue-Sepharose Säule (Pharmacia XK 26; 100 mL). Nach dem Durchbruch der Gesamtproteinfraktion (Equilibrierungspuffer, 120 mL/h) wurde gebundene BFD A460I-F464I mittels 5 mM ThDP (Elutionspuffer 3, 120 mL/h) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden bei -80°C tiefgefroren, gefriergetrocknet und als weißes Pulver zur Kristallisation gegeben.

Die Blue-Sepharose wurde mit Equilibrierungspuffer equilibriert. Das Säulenvolumen betrug 100 mL.

Tabelle A18-A19: Zusammensetzung des Equilibrierungs- und Elutionspuffers für die Farbstoffaffinitätschromatographie.

Equilibrierungs- puffer	Konzentrationen [mM]	Elutionspuffer 3	Konzentrationen [mM]
K ₂ HPO ₄	50	K ₂ HPO ₄	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2	MgCl ₂ *7H ₂ O	2
		ThDP	5
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 6,0 eingestellt		der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 6,0 eingestellt	

Aktivitätsassays für die Proteinaufreinigungsüberwachung

Jeweils 300 µL der zu testenden Fraktion wurden mit 300 µL Aktivitätspuffer versetzt und für 5 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µL Stopplösung gequencht und für 3,5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC auf Produktbildung untersucht.

Tabelle A20-A21: Zusammensetzung des Aktivitätspuffers und der Stopplösung zur Aufreinigungsüberwachung.

Aktivitätspuffer	Konzentrationen [mM]	Stopplösung	Anteil [% (v/v)]
K ₂ HPO ₄	100	Acetonitril	95
Benzaldehyd	40	konz. H ₃ PO ₄	5
Acetaldehyd	400		
MgCl ₂ *7H ₂ O	2		
ThDP	0,5		
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 7,5 eingestellt			

A.2.6 Analytik

Analysebedingungen zur Konzentrationsbestimmung:

Säule: LiChrospher® 100 RP-8 (5µm), 250 x 4,6 mm
 Detektion: 254 nm
 Temperatur: 30°C
 Flussrate: 1 mL/min
 Eluent: isokratisch Acetonitril:TEA-Puffer 40:60 (v/v)
 TEA-Puffer: 0,2 % (w/w) Triethanolamin aq. pH 3,0

Retentionszeiten:

t_{R,2-HPP}= 5,0 min
 t_{R,Benzaldehyd}= 8,1 min
 t_{R,Benzoin}= 11,9 min

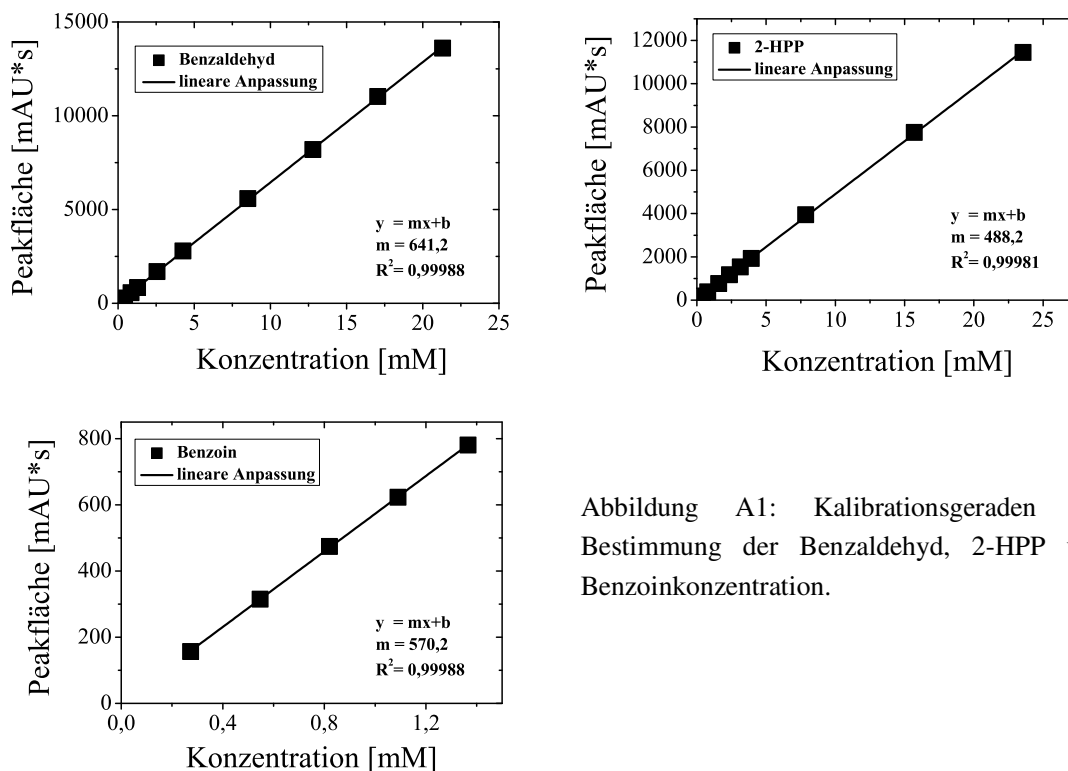


Abbildung A1: Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Benzaldehyd, 2-HPP und Benzoinkonzentration.

Analysebedingungen zur Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen

Säule: Chiralcel® OD-H, (5µm), 250 x 4,6 mm
 Detektion: 254 nm
 Temperatur: 20°C
 Flussrate: 0,75 mL/min
 Eluent: für 2-HPP
 Isohexan:Isopropanol 98:2 (v/v)
 für Benzoin
 Isohexan:Isopropanol 95:5 (v/v)

Retentionszeiten:

$t_{R,(S)\text{-HPP}} = 17,8 \text{ min}$
 $t_{R,(R)\text{-HPP}} = 21,8 \text{ min}$
 $t_{R,(S)\text{-Benzoin}} = 30 \text{ min}$
 $t_{R,(R)\text{-Benzoin}} = 47 \text{ min}$

A.2.7 Allgemeine Vorgehensweise für enzymatische Umsetzungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Versuche wie folgt beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Proben aufgearbeitet. Verwendet wurde ein mit Phosphat gepufferter Reaktionspuffer unter Zugabe der beiden Cofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+} . Die Enzyme wurden als lyophilisierte Pulver verwendet, die in Reaktionspuffer vor den Reaktionen gelöst wurden. Als Reaktionsgefäß wurden doppelwandige, temperierbare Glasreaktoren mit maximalen Nennvolumina von 5 bis 50 mL verwendet.

Tabelle A22: Standardmäßige Zusammensetzung des Reaktionspuffers.

Reaktionspuffer	Konzentrationen [mM]
K_2HPO_4	50
$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
ThDP	0,5
der pH wird mit konz. H_3PO_4 auf 7,5 eingestellt	

Die Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd wurden standardmäßig in den Konzentrationen 40 bzw. 400 mM verwendet und in Reaktionspuffer gelöst. Die Reaktionen wurden bei 30°C unter Rühren mit einem Magnetrührstab durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 4,9 mL an Substratpuffern im Glasreaktor vorgelegt und für 2-3 min bis zur Temperatureinstellung unter Rühren inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 100 μL Enzymlösung gestartet und Proben zeitabhängig durch quenchen mit Stopplösung (Probenvolumen zu Stopplösung = 2:1) abgestoppt. Nach Zentrifugation für 3,5 min bei 13.000 g wurden die Proben per RP-HPLC zur Konzentrationsbestimmung vermessen. Zur Analyse des Enantiomerenüberschusses wurde die abgestoppte Reaktionslösung mit Isohexan versetzt und die Substrate und Produkte extrahiert. Nach vollständiger Phasentrennung wurde die organische Phase mittels chiraler NP-HPLC untersucht.

Bei sehr hohen Stoffkonzentrationen wurden die zu analysierenden Proben nochmals mit Stopplösung (RP-HPLC) bzw. Isohexan (chirale NP-HPLC) verdünnt.

Substratkonzentrationsabhängige Messungen

Für die konzentrationsabhängigen Messungen betrug bei Variation der Benzaldehydkonzentration die Acetaldehydkonzentration 400 mM und bei Variation der Acetaldehydkonzentration die Benzaldehydkonzentration 40 mM.

pH abhängige Messungen

Die pH abhängigen Versuche wurden in 100 mM Phosphatpuffer durchgeführt. Der pH Wert wurde nach dem Lösen der Substrate mit 25 %iger H_3PO_4 bzw. 1 M NaOH eingestellt.

Druckabhängige Messungen

Die Versuche in Abhängigkeit des Druckes wurden in einem Edelstahlreaktorsystem des Instituts für Thermodynamik, insbesondere Stofftrennung, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Niemeyer, an der Helmut-Schmidt Universität Hamburg durchgeführt. Bei dem Reaktor handelt es sich um einen Kapillaren-Umlaufreaktor, der in Jansen und Niemeyer sowie Niemeyer und Jansen näher beschrieben ist und für die hier durchgeführten Experimente leicht modifiziert wurde (Jansen, Niemeyer 2005), (Niemeyer, Jansen 2007). Zum Druckaufbau und zur Reaktordurchmischung wurden zwei unabhängig voneinander arbeitende Pumpensysteme verwendet. Eine Hochdruckmembranpumpe (HMP) liefert hierbei einen maximalen Arbeitsdruck von bis zu 380 MPa und eine Boxerspindelpresse (BSP) durchmischt das Reaktorvolumen mit einer Flussrate von 8,75 mL/min.

Tabelle A23: Übersicht der hochdruckreaktorspezifischen Parameter.

Reaktorparameter	Wert
$V_{\text{Substratvorlage}}$	3*50 mL
V_{Reaktor}	37,5 mL
$V_{\text{Enzymvorlage}}$	1,7 mL
$V_{\text{Zylinder, BSP}}$	7,5 mL
$\text{Kolbenvorhub}_{\text{BSP}}$	70 %
$\text{Pumpzyklus}_{\text{BSP}}$	1,2 min
Flussrate	8,75 mL/min
$\text{Druckbereich}_{\text{HMP}}$	bis 380 MPa

Zur Säuberung des Reaktorsystems wurde der Reaktor zunächst mit etwa 1 L RO-Wasser gespült und dieses danach mit Stickstoff ausgetragen und der Reaktor weitgehend getrocknet. Zur Equilibrierung wurde der leere Reaktor über die Substratvorlagebehälter mit dem entsprechenden Substratpuffer zunächst gespült und anschließend befüllt. Zur Herstellung der Substratpuffer wurde Reaktionspuffer mit einer Phosphationenstärke von 100 mM und pH 8,0 verwendet. Die Enzyme wurden jeweils in Reaktionspuffer ohne Substrate gelöst und in den 1,7 mL Enzymvorlagebehälter eingefüllt. Der gewünschte Betriebsdruck wurde mit einer Hochdruckmembranpumpe eingestellt und diese danach vom Reaktorsystem abgekoppelt. Erst hiernach wurde der Fließweg vom By-Pass auf den Enzymvorlagebehälter gewechselt, wodurch die Biotransformationen gestartet wurden. Eine Probe pro Reaktion wurde jeweils an der Probenahme durch Öffnen des Auslassventils generiert, mittels Stopplösung gequencht und anschließend analysiert.

Versuche zur Reversibilität der enantioselektiven Carboligation

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Enzymaktivitäten in Units_{2-HPP} [U] angegeben, wobei 1 U_{2-HPP} definiert ist als die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt. Unter Standardbedingungen wird die Bildung von 2-HPP bei den Substratkonzentrationen 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd in Reaktionspuffer (siehe Tabelle A22) bei 30°C verfolgt.

Alle Versuche zur Reversibilität der BFD katalysierten Carboligationen wurden im 2 mL Maßstab durchgeführt. Als Reaktoren wurden 2 mL Glasrollrandflaschen verwendet, die mit Aluminiumbördelkappen verschlossen wurden. Die Aluminiumbördelkappen verfügen zur Abdichtung über eine mit PTFE beschichtete Kunststoffdichtung. Zur Thermostatisierung der Glasreaktoren wurde ein temperierbarer Aluminiumblock mit passgenauen Bohrungen verwendet, in denen die Reaktoren eingelassen werden können. Die Versuchstemperatur betrug 25°C.

Wahl eines geeigneten Puffersystems und pH Wertes zur Benzoinspaltung

Für die Versuche wurden benzoinhaltige Substratpuffer mit jeweils 50 mM K₂HPO₄ bzw. Triethanolamin (TEA) angesetzt und der pH mittels konz. HCl bzw. NaOH auf pH 6,0 bzw. pH 7,0 und pH 8,0 eingestellt. Pro Versuch wurden jeweils 4,3 U_{2-HPP} der Variante BFD A460I (bezogen auf die standardmäßige HPP Bildung) in 2 mL der Substratpuffer gelöst und 60 h inkubiert. Entnommene Proben wurden mit 0,5 Anteilen Stopplösung gequencht und per HPLC vermessen.

Tabelle A24: Zusammensetzung der benzoinhaltigen Substratpuffer.

benzoinhaltiger Substratpuffer	Konzentrationen [mM]
rac-Benzoin	1,5
Acetaldehyd	100
K ₂ HPO ₄ bzw. TEA	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2
ThDP	0,5
DMSO	30 % (v/v)

Konzentrationsabhängige Racemisierungen von enantiomerenreinem 2-HPP

2-HPP abhängig:

Die Versuche zur Racemisierung von enantiomerenreinem (*S*)- bzw. (*R*)-HPP wurden in Abhängigkeit der 2-HPP Konzentration durchgeführt. Für alle Versuche wurde TEA-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 benutzt, in dem die jeweiligen Substrate (*S*)- bzw. (*R*)-HPP als Stammlösung in einer Konzentration von 180 mM und Acetaldehyd in einer Konzentration von 25 mM gelöst wurden. Zur Verdünnung der Stammlösungen wurden die gleichen Lösungen benutzt, jedoch ohne die Substrate (*S*)- bzw. (*R*)-HPP.

Tabelle A25: Zusammensetzung des TEA-Puffers.

TEA-Puffer	Konzentration [mM]
TEA	50
MgCl ₂ *7H ₂ O	2
ThDP	0,5
der pH Wert wurde mit konz. HCl auf pH 7,5 eingestellt	

Aus den Enzymlyophilisaten wurden ebenfalls mit TEA-Puffer und Acetaldehyd (25 mM) Stammlösungen hergestellt und die Reaktionen durch Durchmischung gestartet. Gemessen wurde bei den 2-HPP Konzentrationen 5, 50, 80, 110 140 und 180 mM und die eingesetzten Enzymmengen pro Reaktion betrugen für wtBFD 51 U_{2-HPP}, für BFD F464I 29 U_{2-HPP}, für BFD A460I 8,9 U_{2-HPP} und für die Doppelvariante BFD A460I-F464I 22 U (jeweils bezogen auf die standardmäßige 2-HPP Bildung). Proben wurden über einen Zeitraum von 30 h genommen, mit Stopplösung gequencht und standardmäßig analysiert.

Acetaldehydabhängig:

Analog zu den Versuchen in Abhängigkeit der 2-HPP Konzentration wurden auch die Versuche in Abhängigkeit der Acetaldehydkonzentration durchgeführt. Hierbei wurde eine Stammlösung mit 2 M Acetaldehyd in TEA-Puffer angesetzt und die Konzentration von (*S*)- bzw. (*R*)-HPP bei konstant 30 mM in den Reaktionen gehalten. Gemessen wurde bei den Acedaldehydkonzentrationen 0, 25, 50, 200, 400 und 700 mM. Die eingesetzten Enzymmengen pro Reaktion betrugen für wtBFD 21 U_{2-HPP}, für BFD F464I 22 U_{2-HPP}, für BFD A460I 7,6 U_{2-HPP} und für die Doppelvariante BFD A460I-F464I 16,4 U_{2-HPP}. Abweichend wurde in dem Versuch bei 30 mM (*R*)-HPP eine Enzymmenge von 33 U_{2-HPP} wtBFD eingesetzt (jeweils bezogen auf die standardmäßige 2-HPP Bildung). Proben wurden über einen Zeitraum von 30 h genommen, mit Stopplösung gequencht und standardmäßig analysiert.

Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin

Die Versuche zur kinetischen Racematspaltung von Benzoin wurden im 1,93 mL Maßstab durchgeführt unter Einsatz von 30 % (v/v) DMSO als Lösungsvermittler. Die Enzymlösungen wurden durch direktes Lösen der Enzymlyophilisate in 1,35 mL TEA-Puffer hergestellt, dem zusätzlich 50 mM Acetaldehyd zugesetzt wurden. Eingesetzt wurden hier 156 U_{2-HPP} wtBFD, 106 U_{2-HPP} BFD F464I, 20 U_{2-HPP} BFD A460I und 92 U_{2-HPP} BFD A460I-F464I (jeweils bezogen auf die standardmäßige 2-HPP Bildung). Als Stammlösung wurde eine 5,19 mM rac-Benzoinlösung in DMSO angesetzt, in der zusätzlich 50 mM Acetaldehyd gelöst wurden. Die Enzymlösungen wurden auf Eis abgekühlt und die Reaktionen durch Zugabe von 0,58 mL der rac-Benzoin Stammlösung gestartet. Proben wurden nach definierten Zeiten über einen Gesamtzeitraum von 312 h genommen und standardmäßig gequench, aufbereitet und analysiert.

Erreichen des Gleichgewichtszustands ausgehend von 2-HPP und Acetaldehyd

Zur Einstellung der Gleichgewichtskonzentrationen der Substrate 2-HPP, Acetaldehyd, Benzoin und Benzaldehyd wurden zunächst zwei Stammlösungen mit jeweils 180 mM (*S*)- bzw. (*R*)-HPP in TEA-Puffer mit zusätzlich 50 mM Acetaldehyd hergestellt. Die Enzymlyophilisate wurden in 444 µL TEA-Puffer mit zusätzlich 50 mM Acetaldehyd gelöst und die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 778 µL der beiden 2-HPP Stammlösungen gestartet. Eingesetzt wurden hierbei 204 U_{2-HPP} wtBFD, 136 U_{2-HPP} BFD F464I, 41 U_{2-HPP} BFD A460I und 86 U_{2-HPP} BFD A460I-F464I (jeweils bezogen auf die standardmäßige 2-HPP Bildung). Proben wurden über einen Zeitraum von 92 h genommen und wie beschrieben aufbereitet und analysiert.

A.2.8 Charakterisierung der auf Phosphonatester basierenden Enzyminhibitoren

Bestimmung von Inhibierungskonstanten mittels Enzymaktivität

Zur Bestimmung von Inhibierungskonstanten der Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP wurden standardmäßige Aktivitätstest zur Bildung von 2-HPP aus den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd unter Zugabe des jeweiligen Inhibitors durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivitäten bei den Benzaldehydkonzentrationen 5, 10, 20, 30 und 40 mM bei einer konstanten Acetaldehydkonzentration von 400 mM in Standard Reaktionspuffer (siehe Tabelle A22). Zugesetzt wurden den Aktivitätsassays die Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP wie in Tabelle A26 angeführt.

Tabelle A26: Konzentrationen der BFD-Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP für die Aktivitätsassays bei 5, 10, 20, 30 und 40 mM Benzaldehyd zur Inhibierungscharakterisierung.

3-Chloro-MBP	4-Chloro-MBP	4-Methoxy-MBP
0 μ M	0 mM	0 mM
2,5 μ M	0,35 mM	2,5 mM
10 μ M	1,4 mM	10 mM
20 μ M	2,8 mM	20 mM

Bestimmung der inhibitorspezifischen Dissoziationskonstanten mittels CD-Spektroskopie

Die Anbindung der BFD Inhibitoren MBP an die Varianten wtBFD, BFD A460I, BFD F464I und BFD A460I-F464I sowie des Inhibitors 3-Chloro-MBP an die Variante wtBFD wurde titrimetrisch mittels CD-Spektroskopie gemessen (Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter). Als Basis wurden die Varianten in Puffer gelöst und mit MBP bzw. 3-Chloro-MBP in aufsteigender Konzentrationsfolge bei 20°C titriert, wobei pro Titrationsreihe zwischen 14 bis 17 verschiedene Inhibitorkonzentrationen vermessen wurden. Alle Lösungen wurden mit CD-Puffer angesetzt.

Die Absorption des Messsignals wurde von 290-400 nm verfolgt.

Tabelle A27-28: Zusammensetzung des CD-Puffers sowie die Mengen der eingesetzten BFD Varianten zur Bestimmung der spezifischen Dissoziationskonstanten von MBP bzw. 3-Chloro-MBP.

CD-Puffer	Konzentrationen [mM]	Variante	Konzentration [mg/mL]
K ₂ HPO ₄	50	wtBFD	2,0
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5	BFD A460I	3,0
ThDP	0,25	BFD F464I	3,0
der pH wird mit konz. H ₃ PO ₄ auf 6,5 eingestellt		BFD A460I-F464I	3,3

Tabelle A29: Übersicht der gemessenen Konzentrationsbereiche von MBP bzw. 3-Chloro-MBP bei den jeweiligen BFD Varianten.

Variante vs. Inhibitor	Konzentrationsbereich _{Inhibitor}
wtBFD vs. MBP	0-1000 μ M
BFD A460I vs. MBP	0-1030 μ M
BFD F464I vs. MBP	0-1300 μ M
BFD A460I-F464I vs. MBP	0-1114 μ M
wtBFD vs. 3-Chloro-MBP	0-790 μ M

A.2.9 Enzymkristallisationen

Für die Kristallisationsversuche wurden die Enzyme wtBFD und BFD A460I-F464I wie beschrieben aufgereinigt. Die Enzymkristallisationen sowie die Cokristallisationen mit den Enzyminhibitoren Methylbenzoylphosphonat (MBP) sowie den substituierten Derivaten 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP wurden von Dr. Marc Bruning bei den Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie in der Arbeitsgruppe Proteindynamik von Dr. Hans Bartunik am DESY/Hamburg durchgeführt. Das MBP wurde von Dr. Ralph Golbik zur Verfügung gestellt. Die substituierten MBP-Derivate wurden wie beschrieben synthetisiert. Die Kristallisation des wtBFD-MBP Komplexes erfolgte wie in Bruning et al. 2009 beschrieben (Bruning et al. 2009). Analog dazu wurde auch die Variante BFD A460I-F464I mit kovalent gebundenem MBP kristallisiert sowie die wtBFD mit den substituierten MBP-Derivaten 3-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP.

A.3 Synthesen

A.3.1 Darstellung von (S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ((S)-HPP)

47,25 g Benzaldehyd (445 mmol) und 195 g Acetaldehyd (4,42 mol) wurden in 10,5 L Kaliumphosphatpuffer gelöst (20 mM) und die Cofaktoren ThDP



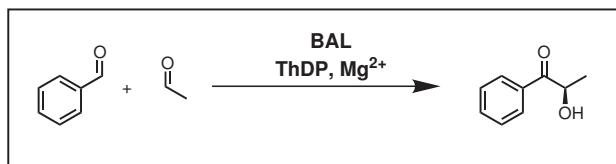
(0,2 mM) und $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mM) zugegeben. Der pH wurde mit konz. H_3PO_4 und NaOH auf 7,5 eingestellt und dem Reaktionsansatz anschließend 1400 U frisch aufgereinigte wtBFD zugefügt. Nach 36 h bei Raumtemperatur wurde der komplette Reaktionsansatz mit Dichlormethan extrahiert (5*200 mL; redestilliert) und die organische Phase mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt (68,3 g; $ee_{(S)\text{-HPP}}=85\%$) wurde als gelbes, zähflüssiges Öl erhalten. Nach Umkristallisation aus *i*-Hexan konnte das (S)-HPP als ca. 3 cm lange, nadelförmige Kristalle isoliert werden. Ausbeute = 44,85 g (67,2 %); $ee_{(S)\text{-HPP}} > 99,9\%$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,47 (d, 3H, $^3J = 7,1$ Hz; CH_3); 3,82 (br, 1H; OH); 5,19 (q, 1H, $^3J = 7,1$ Hz; CHOH); 7,52 („t“, 2H, $^3J = 7,47$ Hz; Ar-H); 7,64 (tt, 1H, $^3J = 7,47$ Hz, $^4J = 1,3$ Hz; Ar-H); 7,95 (dd, 2H, $^3J = 7,07$ Hz, $^4J = 1,3$ Hz; Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 22,32 (CH_3); 69,32 (CHOH); 128,67 / 128,89 (CH); 133,31 (C_q); 134,01 (CH); 202,4 (CO).

A.3.2 Darstellung von (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ((*R*)-HPP)

4,6 g Benzaldehyd (43 mmol) und 17,64 g Acetaldehyd (0,4 mol) wurden in 1 L Kaliumphosphatpuffer gelöst (50 mM) und die Cofaktoren ThDP



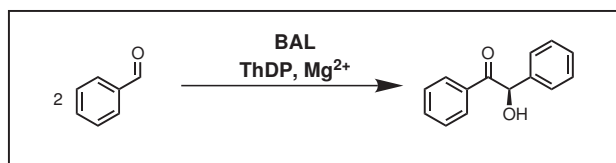
(0,5 mM) und $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mM) sowie 5 % MTBE (v/v) als Lösungsvermittler zugegeben. Der pH wurde mit konz. H_3PO_4 und NaOH auf 8,0 eingestellt und die Reaktion durch Zugabe von 40 mg Benzaldehydlyase (BAL; von Dr. Nils Kurlemann zur Verfügung gestellt) bei Raumtemperatur gestartet. Nach 130 h wurde der Reaktionsansatz mit Dichlormethan extrahiert (5*100 mL), die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt (9,69 g) wurde in gelblicher, hochviskoser Form erhalten und in *i*-Hexan umkristallisiert. Das (*R*)-HPP wurde als ca. 4 cm lange, nadelförmige Kristalle isoliert. Ausbeute = 6,3 g (97 %); $ee_{(R)\text{-HPP}} > 99,9 \%$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,47 (d, 3H, $^3J = 7,05$ Hz; CH_3); 3,82 (br, 1H; OH); 5,19 (q, 1H, $^3J = 7,05$ Hz; CHOH); 7,52 („t“, 2H, $^3J = 7,4$ Hz; Ar-H); 7,64 (tt, 1H, $^3J = 7,4$ Hz, $^4J = 1,3$ Hz; Ar-H); 7,95 (dd, 2H, $^3J = 7,0$ Hz, $^4J = 1,3$ Hz; Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 22,32 (CH_3); 69,32 (CHOH); 128,67 / 128,89 (CH); 133,31 (C_q); 134,01 (CH); 202,4 (CO).

A.3.3 Darstellung von (*R*)-Benzoin; ((*R*)-2-Hydroxy-1,2-diphenylethan-1-on)

Zu 50 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM; 0,5 mM ThDP; 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; pH 8,0) wurden 5 % MTBE (v/v) gegeben und unter Rühren



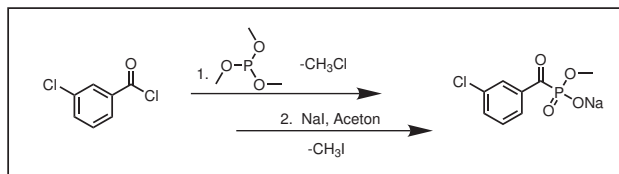
gelöst. Zu der Lösung wurden 2,12 g (20 mmol) Benzaldehyd gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 20 mg BAL gestartet. Nach 48 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan (2*50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde mit Isohexan gewaschen und das (*R*)-Benzoin als weißer, feinkristalliner Niederschlag isoliert. Ausbeute = 1,6 g (75,1 %); $ee_{(R)\text{-Benzoin}} > 99,9 \%$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,5 (d, 1H, $^2J = 5,0$ Hz); 5,87 (d, 1H, $^2J = 5,0$ Hz); 7,16-7,46 (m, 8H; Ar-H); 7,83-7,86 (m („d“, 2H; Ar-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 76,2; 127,8; 128,6; 128,7; 129,16; 129,18; 133,5; 134,0; 139,1; 199,0.

A.3.4. Darstellung von 3-Chlorbenzoylphosphonatmethylester (3-Chloro-MBP)

In einem doppelwandigen 500 mL Rundkolben wurden 25 g (143 mmol) 3-Chlorbenzoylchlorid vorgelegt und auf 5°C abgekühlt. Unter Rühren wurden langsam 17,74 g (143 mmol)



Trimethylphosphit zugegeben und die Reaktionslösung 2 h bei 5°C gerührt. Diese Lösung wurde langsam zu einer Lösung aus 22,5 g Natriumiodid (150 mmol) in 100 mL Aceton gegeben und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Niederschlag wurde mit einer Glasfritte Pore 4 abfiltriert und mit eisgekühltem Aceton gewaschen. Das Produkt 3-Chlorbenzoylphosphonatmethylester wurde als Natriumsalz erhalten und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 31,95 g (125 mmol; 87,4 %).

^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 3,44 (d, 3H, $^3J(\text{CH}_3\text{-P}) = 10,3$ Hz); 7,52 (t, 1H; $^2J = 7,85$ Hz); 7,64 (dq, 1H, $J = 7,97$ Hz; $J = 1,04$ Hz); 8,12 (dt, 1H, $J = 7,76$ Hz; $J = 1,2$ Hz); 8,23 (t, 1H, $J = 1,78$ Hz).

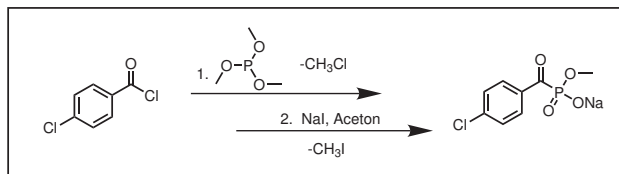
^{13}C -NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 52,11 (d, $^2J(\text{CH}_3\text{-P}) = 6,46$ Hz); 127,3 (s); 129 (s); 130,3 (s); 132,4 (s); 133 (s); 139,1 (d, $^2J(\text{C}_{\text{arom.}}\text{-P}) = 50,96$ Hz); 209,1 (d, $^1J(\text{CO-P}) = 166,9$ Hz).

^{31}P -NMR (162 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): -1,12 (s)

$\text{MS}^\ominus$, m/z: $[\text{M}]^\ominus - \text{Na}^\oplus = 232,98 (\text{C}_8\text{H}_7\text{ClO}_4\text{P}^-)$

A.3.5. Darstellung von 4-Chlorbenzoylphosphonatmethylester (4-Chloro-MBP)

In einem doppelwandigen 500 mL Rundkolben wurden 43,75 g (250 mmol) 4-Chlorbenzoylchlorid vorgelegt und auf 5°C abgekühlt. Unter Rühren wurden langsam 31 g



(250 mmol) Trimethylphosphit zugegeben und die Reaktionslösung 2 h bei 5°C gerührt. Diese Lösung wurde langsam zu einer Lösung aus 44,97 g Natriumiodid (300 mmol) in 200 mL Aceton gegeben und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Niederschlag wurde mit einer Glasfritte Pore 4 abfiltriert und mit eisgekühltem Aceton

gewaschen. Das Produkt 4-Chlorbenzoylphosphonatmethylester wurde als Natriumsalz erhalten und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 57,4 g (224 mmol; 89,6 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 3,46 (d, 3H, $^3J(\text{CH}_3\text{-P}) = 10,5$ Hz); 7,50 (d, 2H; $J = 8,4$ Hz); 8,13 (dt, 2H, $J(\text{CH}_{\text{arom}}\text{-P}) = 8,58$ Hz; $J = 1,85$ Hz).

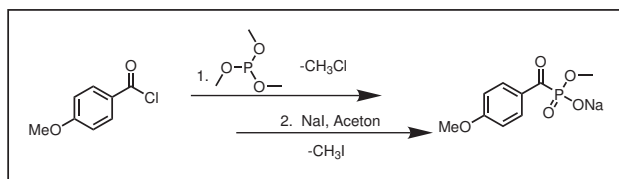
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 52,4 (d, $^2J(\text{CH}_3\text{-P}) = 6,48$ Hz); 128,5 (s); 130,9 (s); 135,0 (d, $^2J(\text{C}_{\text{arom}}\text{-P}) = 52,75$ Hz); 138,4 (s); 133 (s); 207,5 (d, $^1J(\text{CO-P}) = 170,2$ Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): -1,15 (s)

$\text{MS}^\ominus$, m/z: $[\text{M}]^\ominus - \text{Na}^\oplus = 232,98 (\text{C}_8\text{H}_7\text{ClO}_4\text{P}^-)$

A.3.6. Darstellung von 4-Methoxybenzoylphosphonatmethylester (4-Methoxy-MBP)

In einem doppelwandigen 500 mL Rundkolben wurden 25 g (147 mmol) p-Anissäurechlorid vorgelegt und auf 5°C abgekühlt. Unter Rühren wurden langsam 18,2 g (147 mmol) Trimethyl-



phosphit hinzugegeben und die Reaktionslösung 2 h bei 5°C gerührt. Diese Lösung wurde langsam zu einer Lösung aus 22,5 g Natriumiodid (150 mmol) in 100 mL Aceton gegeben und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Niederschlag wurde mit einer Glasfritte Pore 4 abfiltriert und mit eisgekühltem Aceton gewaschen. Das Produkt 4-Methoxybenzoylphosphonatmethylester wurde als Natriumsalz erhalten und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 30,24 g (120 mmol; 81,6 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 3,45 (d, 3H, $^3J(\text{CH}_3\text{-P}) = 10,5$ Hz); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 6,98 (d, 2H; $J = 8,75$ Hz); 8,14 (dt, 2H, $J(\text{CH}_{\text{arom}}\text{-P}) = 8,92$ Hz; $J = 1,95$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 52,26 (d, $^2J(\text{CH}_3\text{-P}) = 6,42$ Hz); 55,36 (s, OCH_3); 113,6 (s); 129,73 (d, $^2J(\text{C}_{\text{arom}}\text{-P}) = 53,19$ Hz); 131,7 (s); 163,2 (s); 206,6 (d, $^1J(\text{CO-P}) = 169,2$ Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): -0,39 (s)

$\text{MS}^\ominus$, m/z: $[\text{M}]^\ominus - \text{Na}^\oplus = 229,03 (\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5\text{P}^-)$

B. Symbolverzeichnis

σ	Sigma-Parameter; Maß der elektronischen Eigenschaften eines Substituenten
θ	Theta: Symbol für den Verdrehwinkel. [mdeg]
λ	Lambda: Symbol der Wellenlänge [nm]
Δ	Delta: Symbol für Differenzen
δ	Delta: Symbol für die chemische Verschiebung; [ppm]
xJ	Kopplungskonstante im NMR; [Hz]; x = Kernabstand
Akz	Akzeptorsubstrat
Da	Molekulargewicht von Proteinen [g/mol]
Don	Donorsubstrat
k	Reaktionsrate
K	Gleichgewichtskonstante nach dem Massenwirkungsgesetz
K_M	Michaelis-Menten Konstante [mM]
$K_{M,BA}$	Michaelis-Menten Konstante für Benzaldehyd [mM]
$K_{M,AA}$	Michaelis-Menten Konstante für Acetaldehyd [mM]
K_D	Dissoziationskonstante
K_{ic}	Inhibierungskonstante für kompetitive Anteile
K_{iu}	Inhibierungskonstante für unkompetitive Anteile
$K^{0,5}$	InhibitorKonzentration für 50 %-ige Inhibierung [mM; μ M]
p	Druck [MPa]
T	Temperatur [°C]
U	Unit; katalytische Aktivität [μ mol/min]
V	Volumen [L]

C. Abkürzungsverzeichnis

<i>active-site</i>	aktives Zentrum
A	allgemeine Abkürzung für Enzym-Substrat
AA	Acetaldehyd
AChE	Acetylcholinesterase
ANX	anion exchange chromatographie = Anionenaustauschchromatographie
A460I	Substitution der Aminosäure Alanin durch Isoleucin an der Position 460 der Aminosäuresequenz der wtBFD
AP	Acetylphosphonat
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiat Decarboxylase
BA	Benzaldehyd
BP	Benzylphosphonat
CD	<i>circular dichroism</i> = zirkularer Dichroismus
CFE	cell free extract (zellfreier Extrakt)
DeazaThDP	3-Deazathiamindiphosphat
DHAS	Dihydroxyacetonsynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
d ₆ -DMSO	deutiertes Dimethylsulfoxid
DXPS	1-Deoxyxylulose-5-phosphat Synthase
E	Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
<i>er</i>	Enantiomerenverhältnis (<i>enantiomeric ratio</i>)
F464I	Substitution der Aminosäure Phenylalanin durch Isoleucin an der Position 464 der Aminosäuresequenz der wtBFD
GF	Gelfiltration
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochdruck Flüssigkeitschromatographie
HPP	2-Hydroxy-1-phenylpropanon; 2-Hydroxy-1-phenylpropiophenon
HZDF	Hochzelldichtefermentation
I	Inhibitor
<i>i</i> -Hexan	iso-Hexan = 2-Methylpentan
IMAC	Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KP _i	Phosphatpuffer aus Kaliumhydrogenphosphatsalzen
LYO	Gefriertrocknung; Lyophilisierung
MAP	Methylacetylphosphonat = Acetylphosphonatmethylester
MBP	Methylbenzoylphosphonat = Benzoylphosphonatmethylester

mM	mmol/L
MS	Massezahl
MTBE	<i>tert</i> -Buthylmethylether
NMR	Kernspinresonanz; engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilo Triacetat
P	Produkt
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	(Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure))
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
R,R',R''	organische Reste bzw. Substituenten
(R)-	(R)-Enantiomer nach CIP-Regeln; IUPAC-Nomenklatur
(R)-HPP	(R)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon
rac-	racemisch; racemisches Gemisch
S	Substrat
(S)-	(S)-Enantiomer nach CIP-Regeln; IUPAC-Nomenklatur
(S)-HPP	(S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon
S _N 2	Nukleophile Substitution 2. Ordnung
TEA	Triethanolamin
ThDP	Thiamin pyrophosphat = Thiamindiphosphat = Vitamin-B1 diphosphat
ThthiaDP	Thiaminthiazolondiphosphat
TK	Transketolase
<i>t</i> ÜZ _{2-HPP}	tetrahedrale Übergangszustand in der <i>active site</i> bei der 2-HPP Bildung
U	Unit; Einheit für Enzymaktivität [μmol/min]
U _{2-HPP}	Einheit in Unit für die Carboligationsaktivität von 2-HPP aus Benzaldehyd und Acetaldehyd unter standardisierten Bedingungen
UF	Ultrafiltration
ÜZ	Übergangszustand
wt	<i>wild-type</i> ; Protein ohne Aminosäurenaustausch
Zm	<i>Zymomonas mobilis</i>

D. Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 1.1: Darstellung der beiden Enantiomere von Alanin in der Fischer-Projektion (links) und der herkömmlichen chemischen Schreibweise mit Nomenklatur nach den CIP-Regeln (rechts). Zusätzlich ist jeweils die andere Nomenklatur angegeben (grau).	1
Abbildung 1.2: Energiediagramm einer nicht katalysierten (racemischen) und katalysierten (katal.) asymmetrischen Reaktion. Aufgetragen sind die Energieniveaus der Produkte und Edukte sowie die benötigten Aktivierungsenergien (E_A) und frei werdenden Reaktionsenthalpien (ΔH_R) in Abhängigkeit der Reaktionskoordinate ξ .	2
Abbildung 1.3: Struktur des Cofaktors Thiamindiphosphat; bestehend aus einer Pyrimidin- (blau) und Thiazoleinheit (grün) sowie einem Diphosphatrest (rot).	4
Abbildung 1.4: Strukturen der Enantiomere des Methadons und Carvons. Jeweils beide Enantiomere besitzen unterschiedliche physiologische Wirkungen.	5
Abbildung 1.5: Reaktionszyklus der asymmetrischen 2-Hydroxyketonbildung durch ThDP abhängige Enzyme.	8
Abbildung 1.6: Mögliche Anwendung von chiralen 2-Hydroxyketonen als Intermediate für die Produktion pharmazeutischer Produkte.	9
Abbildung 3.1: Dihydroxyaceton synthase katalysierte Bildung von ^{13}C markiertem Dihydroxyaceton (a) als Vorstufe für isotopenmarkiertes Dihydroxyacetonphosphat (b). Die ^{13}C angereicherten Positionen sind jeweils gekennzeichnet (*).	13
Abbildung 3.2: Transketolase katalysierte Transformation der C5-Zucker Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat in die C3- und C7-Einheiten Glycerin-3-phosphat und Sedoheptulose-7-phosphat aus dem Pentosephosphatweg.	14
Abbildung 3.3: Benzaldehydlyase (BAL) katalysierte Spaltung von (<i>R</i>)-Benzoin zu Benzaldehyd sowie die Carboligationsreaktion mit Acetaldehyd zu (<i>R</i>)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ((<i>R</i>)-HPP).	15
Abbildung 3.4: Synthese von L-(-)-Ephedrin. Im ersten Reaktionsschritt wird das chirale Intermediat (<i>R</i>)-PAC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd durch die PDC katalysiert gebildet. Nach Aminierung und Reduktion ist L-(-)-Ephedrin als Endprodukt zugänglich.	15

Abbildung 3.5: Übersicht der Reaktionsschritte im Mandelsäurekatabolismus.	16
Abbildung 3.6: BFD katalysierte Bildung von (S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd.	16
Abbildung 3.7: Übersicht der Fermentation von <i>E. coli</i> SG13009-pBFD A460I Zellen.	19
Abbildung 3.8: Elutionsprofil der Variante BFD A460I-F464I über eine Q-Sepharose Säule. Die Elution erfolgt über einen linearen Chloridgradienten von 150 mM (A) zu 300 mM (B) NaCl.	20
Abbildung 3.9: SDS-PAGE der Aufreinigungen von BFD A460I-F464I (links) und wtBFD (rechts).	22
Abbildung 4.1: Untersuchung der Lagerstabilität von wtBFD sowie der Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I.	25
Abbildung 4.2: Übersicht der Substrate und Carboligationsprodukte der BFD: Benzoylformiat (a), Benzaldehyd (b), Acetaldehyd (c), 2-HPP (d), Benzoin (e) und Acetoin (f).	27
Abbildung 4.3: 2-HPP Bildung ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd durch wtBFD (A; 400 mM Acetaldehyd), BFD F464I (B; 300 mM Acetaldehyd), BFD A460I (C; 500 mM Acetaldehyd) und BFD A460I-F464I (D; 300 mM Acetaldehyd).	28
Abbildung 4.4: 2-HPP Bildung ausgehend von Benzaldehyd (40 mM) und Acetaldehyd durch wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D).	29
Abbildung 4.5: Vergleich der Aktivitäten der 2-HPP Bildung von frisch redestilliertem und nicht redestilliertem, kommerziellem Benzaldehyd.	31
Abbildung 4.6: Einfluss der Benzaldehyd- (A; bei 400 mM Acetaldehyd) und der Acetaldehydkonzentration (B; bei 40 mM Benzaldehyd) auf den Enantiomerenüberschuss der durch BFD-Varianten katalysierten 2-HPP Bildung. Abbildungsteil (C): Enantiomerenüberschüsse übernommen aus Siegert et al. nach 20 h Reaktionsführung bei 500 mM Acetaldehyd für wtBFD (□), BFD F464I (■), BFD A460I (◇) und BFD A460I-F464I (▲) (Siegert et al. 2005).	33
Abbildung 4.7: Einfluss des pH-Wertes und der Benzaldehydkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss der 2-HPP Bildung für wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D).	35

Abbildung 4.8: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Decarboxylierung von Benzoylformiat (links) nach Iding et al. sowie der 2-HPP Bildung nach Greiner et al. (rechts) für wtBFD (für die exponentielle Annäherung wurden nur Messwerte mit voll ausgefüllten Symbolen verwendet) (Iding et al. 2000), (Greiner 1999).	39
Abbildung 4.9: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der 2-HPP Bildung für wtBFD. Links: absolute Aktivitäten. Rechts: relative Aktivitäten bezogen auf die Standardtemperatur 30°C.	39
Abbildung 4.10: Auftragung der logarithmierten Aktivität und der reziproken absoluten Temperatur nach Arrhenius zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der 2-HPP Bildung.	40
Abbildung 4.11: Vergleich der Aktivitätsassays für die BFD A460I-F464I. Eine Abnahme der Enzymaktivität innerhalb eines Assays kann nicht beobachtet werden.	11
Abbildung 4.12: Aufsicht auf den peripheren Bereich der wtBFD (grün). Der Cofaktor ThDP (blau; hier als kovalenter Komplex mit dem Inhibitor 3-Chloro-MBP) wird vom Proteinrand durch eine Helix abgeschirmt. Die Aminosäure Phenylalanin 464 (rot) ist hieran beteiligt.	42
Abbildung 4.13: Einfluss der Temperatur auf den Enantiomerenüberschuss der 2-HPP Bildung für die BFD-Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Reaktionsbedingungen: 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd in Standardreaktionspuffer bei pH 7,5.	43
Abbildung 5.1: Fließschema der Hochdruckzirkulationsanlage im Institut für Verfahrenstechnik, insbesondere Stofftrennung, nach Jansen et al. und Niemeyer et al. (Jansen, Niemeyer 2005), (Niemeyer, Jansen 2007). Der Druck kann mittels einer Hochdruckmembranpumpe sowie einer Handpumpe eingestellt werden.	47
Abbildung 5.2: Umsätze und Enantiomerenüberschüsse für die wtBFD katalysierte (<i>S</i>)-HPP Bildung bei steigendem hydrostatischem Druck.	48
Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Enantiomerenüberschüsse der Produkte (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-HPP vom angewandten hydrostatischen Druck für wtBFD (blau), BFD F464I (grün), BFD A460I (gelb) und BFD A460I-F464 (türkis).	49
Abbildung 5.4: Aktivität sowie Enantioselektivität der (<i>R</i>)-HPP Bildung durch die BFD A460I-F464I nach Druckinkubation bei 250 MPa.	50

Abbildung 5.5: Druck-Stufengradient Versuche zum Nachweis der Reversibilität des Druckeinflusses auf die Enantioselektivität der 2-HPP Bildung für wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die ersten 5 % Umsatz wurden unter Hochdruck (HD) erzielt (schwarz umrandete Symbole) und die Systeme danach auf Atmosphärendruck (Atm) dekomprimiert (halb ausgefüllte Symbole). Zum Vergleich sind Umsatzkurven bei ausschließlich Atmosphärendruck abgebildet (nicht ausgefüllte Symbole).	51
Abbildung 5.6: Einfluss des Drucks auf die Dichte und Volumenveränderung von wässrigen Medien (der für die Veruche signifikante Bereich ist schraffiert). Die Grafiken wurden erstellt aus Daten der <i>International Association for the Properties of Water and Steam: Formulation 1995</i> nach Wagner und Pruß (Wagner, Pruß 2002).	54
Abbildung 6.1: Bildung der chiralen 2-Hydroxyketone 2-HPP (a), Benzoin (b) und Acetoin (c) ausgehend von den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd.	55
Abbildung 6.2: Reaktionsverlauf der Carbolygation von 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd durch wtBFD. Oben: Konzentrations/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.	56
Abbildung 6.3: Reaktionsverlauf der Carbolygation von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durch BFD F464I. Oben: Konzentrations/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.	59
Abbildung 6.4: Reaktionsverlauf der Carbolygation von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durch BFD A460I. Oben: Konzentrations/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.	60
Abbildung 6.5: Reaktionsverlauf der Carbolygation von 30 mM Benzaldehyd und 300 mM Acetaldehyd durch BFD A460I-F464I. Oben: Konzentrations/Zeit- Profile des Substrates Benzaldehyd und der Produkte 2-HPP und (R)-Benzoin. Unten: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des gebildeten 2-HPP von der Zeit und des Umsatzes.	61
Abbildung 6.6: Postulierte Reaktionssequenz der Spaltung von Benzoin (a) zu Benzaldehyd (b) und Weiterreaktion zu 2-HPP (c) durch BFD.	65

Abbildung 6.7: Bildung von 2-HPP aus rac-Benzoin und Acetaldehyd durch BFD A460I in TEA- und KP_i -Puffer im pH-Bereich 6,0-8,0.	65
Abbildung 6.8: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch wtBFD bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 20 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt.	67
Abbildung 6.9: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch BFD F464I bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt.	68
Abbildung 6.10: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch BFD A460I bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt.	69
Abbildung 6.11: Kinetische Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) durch BFD A460I-F464I bei Zugabe von 50 mM Acetaldehyd. Aufgetragen sind die Konzentrationsverläufe (A, C-E) und Enantiomerenüberschüsse (C, D) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd sowie der Massenbilanz als Summe aller aromatischen Einheiten (a.E.). Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des 2-HPP und Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen. Die Reaktionsverläufe sind teilweise durch visuelle Hilfslinien ergänzt.	70
Abbildung 6.12: Blindreferenz zur kinetischen Racematspaltung von rac-Benzoin (1,6 mM) und Acetaldehyd (50 mM) ohne Enzymzugabe. Aufgetragen ist der Konzentrationsverlauf und Enantiomerenüberschuss (A) der Substrate Benzoin, 2-HPP und Benzaldehyd. Der HPLC-Plot der Enantiomerenverteilung des Benzoin nach 72 h Reaktionszeit ist in B aufgetragen.	71

Abbildung 6.13: Reaktionsgleichung der kinetischen Racematspaltung von rac-Benzoin zu (<i>S</i>)-Benzoin und 2-HPP (A). Die Umsatzkurven von rac-Benzoin sind in Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des verbleibenden (<i>S</i>)-Benzoins für die Varianten wtBFD (B), BFD F464I (C), BFD A460I (D) und BFD A460I-F464I (E) aufgetragen. Die experimentellen Daten sind durch die Ideallinie einer kinetischen Racematspaltung ergänzt.	72
Abbildung 6.14: Bildungsmöglichkeiten von 2-HPP (c) und Benzoin (b) aus Benzaldehyd (a) und Acetaldehyd katalysiert durch Benzaldehydlyase (Stillger et al. 2006), (Hildebrand et al. 2007).	73
Abbildung 6.15: Postuliertes Reaktionsschema für die Spaltung von enantiomerenreinem (<i>S</i>)- bzw (<i>R</i>)-HPP zu Benzaldehyd und Acetaldehyd mit anschließender Rückbildung von 2-HPP in nicht enantiomerenreiner Form.	74
Abbildung 6.16: Konzentrationsabhängige Bildung des jeweilig komplementären 2-HPP Enantiomers katalysiert durch wtBFD. A: Bildung von (<i>R</i>)-HPP aus (<i>S</i>)-HPP und B: Bildung von (<i>S</i>)-HPP aus (<i>R</i>)-HPP.	75
Abbildung 6.17: Bildungsraten von (<i>R</i>)-HPP aus enantiomerenreinem (<i>S</i>)-HPP unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd. Die Messpunkte der Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D) sind durch einen hyperbolen Kurvenverlauf (nur ausgefüllte Messpunkte sind berücksichtigt) angepasst.	76
Abbildung 6.18: Bildungsraten von (<i>S</i>)-HPP aus enantiomerenreinem (<i>R</i>)-HPP unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd. Die Messpunkte der Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D) sind durch einen hyperbolen Kurvenverlauf angepasst.	77
Abbildung 6.19: Konzentrationsverlauf der Benzaldehydbildung bei verschiedenen (<i>S</i>)-HPP Konzentrationen durch wtBFD bei 25 mM Acetaldehyd (links). Rechts: maximale Benzaldehydkonzentrationen aus der exponentiellen Anpassung der Messwerte in linearer Korrelation zur Substratkonzentration von (<i>S</i>)-HPP.	78
Abbildung 6.20: Zeitlicher Verlauf der Enantiomerenüberschüsse von 30 mM (<i>S</i>)-HPP in Abhängigkeit verschiedener Acetaldehydkonzentrationen für die BFD Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D).	79
Abbildung 6.21: Zeitlicher Verlauf der Enantiomerenüberschüsse von 30 mM (<i>R</i>)-HPP in Abhängigkeit verschiedener Acetaldehydkonzentrationen für die BFD Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D).	80

Abbildung 6.22: Bildungsraten von (<i>R</i>)-HPP aus 30 mM (<i>S</i>)-HPP bei verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte mit ausgefüllten Symbolen sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt.	81
Abbildung 6.23: Bildungsraten von (<i>S</i>)-HPP aus 30 mM (<i>R</i>)-HPP bei verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte mit ausgefüllten Symbolen sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt.	82
Abbildung 6.24: Detektierbare Bildung von freiem Benzaldehyd aus 30 mM (<i>S</i>)-HPP bei unterschiedlichen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt.	83
Abbildung 6.25: Detektierbare Bildung von freiem Benzaldehyd aus 30 mM (<i>R</i>)-HPP bei unterschiedlichen Acetaldehydkonzentrationen für die Varianten wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D). Die Messpunkte sind durch einen exponentiellen Fit (schwarze Linie) ergänzt.	84
Abbildung 6.26: Kontrolle zur Racemisierung von (<i>R</i>)-HPP durch wtBFD sowie Entwicklung der Benzaldehydkonzentrationen in den Reaktionsansätzen. Eingesetzt wurden 30 mM (<i>R</i>)-HPP und 25 mM Acetaldehyd sowie wtBFD als Positivkontrolle, thermisch inaktiverter wtBFD und 20 mM 3-Cl-MBP als Negativkontrollen.	85
Abbildung 6.27: Übersicht der Konzentrationsverläufe von 2-HPP, Benzaldehyd und (<i>R</i>)-Benzoin bei der Gleichgewichtseinstellung der Substrate durch wtBFD (A), BFD F464I (B), BFD A460I (C) und BFD A460I-F464I (D).	87
Abbildung 6.28: Verlauf des Enantiomerenüberschusses (<i>ee</i>) von 2-HPP bei der Gleichgewichtseinstellung der Substrate 2-HPP, Benzaldehyd, Acetaldehyd und (<i>R</i>)-Benzoin für die Varianten wtBFD, BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I.	87
Abbildung 6.29: Schematische Darstellung der Gleichgewichtsbeziehung zwischen den Substraten Benzaldehyd und Acetaldehyd (a) sowie den Produkten 2-HPP (b) und (<i>R</i>)-Benzoin.	88
Abbildung 6.30: Erweiterter Reaktionsmechanismus der BFD basierend auf den Reaktionsmechanismen von Polovnikova et al. und Iding et al. (Polovnikova et al. 2003), (Iding et al. 2000).	91

Abbildung 7.1: Übersicht der wesentlichen Inhibierungstypen. Neben der irreversiblen Inhibierung liegt die reversible Inhibierung vor, die in vollständige und partielle Inhibierung unterteilt wird.	96
Abbildung 7.2: Allgemeiner Inhibierungsmechanismus für Enzym (E), Substrat (A), Produkt (P) und Inhibitor (I) bei der reversiblen Inhibierung.	96
Abbildung 7.3: Übersicht verschiedener Enzyminhibitoren diverser Enzyme	99
Abbildung 7.4: Vergleich der ThDP-Inhibitor Komplexe 3-Deazathiamindiphosphat (b) und Thiaminthiazolondiphosphat (d) sowie deren analogen Strukturen Thiamindiphosphat (a) und dem Enamin-Komplex (c).	100
Abbildung 7.5: Strukturen der BFD Substrate Benzoylformiat (a) und 2-HPP (b) sowie dem strukturell verwandten Inhibitor Methylbenzoylphosphonat (MBP; (c)).	101
Abbildung 7.6: Unterschiedliche Formen des Cofaktors ThDP. Mittels CD-Spektroskopie detektierbar sind das 4'-Aminopyrimidin (AP) und das 1'-4'-Iminopyrimidin (IP).	102
Abbildung 7.7: Reaktionsschema der Inhibierung von BFD durch MBP. Die Anbindung erfolgt in einem zweistufigen Mechanismus über die Bildung eines Michaelis-Komplexes (MM-Komplex). Detektierbar ist der Komplex aus kovalent gebunden MBP an ThDP (PMThDP) durch Ausbildung der CD-aktiven Iminopyrimidininform (IP) des Cofaktors.	102
Abbildung 7.8: CD-Titrationsspektrum von wtBFD mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1000 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\emptyset$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 93 \pm 8 \mu\text{M}$ (rechts).	103
Abbildung 7.9: CD-Titrationsspektrum von BFD F464I mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1300 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\emptyset$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 279 \pm 24 \mu\text{M}$ (rechts).	103
Abbildung 7.10: CD-Titrationsspektrum von BFD A460I mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1030 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\emptyset$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 204 \pm 26 \mu\text{M}$ (rechts).	104

Abbildung 7.11: CD-Titrationsspektrum von BFD A460I-F464I mit dem Inhibitor MBP im Konzentrationsbereich von 0-1114 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\emptyset$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 223 \pm 31 \mu\text{M}$ (rechts).	104
Abbildung 7.12: Strukturen der substituierten MBP-Derivate 3-Chloro-MBP (m-Cl-MBP), 4-Chloro-MBP (p-Cl-MBP) und 4-Methoxy-MBP (p-MeO-MBP).	106
Abbildung 7.13: CD-Titrationsspektrum von wtBFD mit dem Inhibitor 3-Chloro-MBP (m-Cl-MBP) im Konzentrationsbereich von 0-790 μM (links). Nach Normierung der Messsignale bei 300 nm ($\emptyset$ von 298-302 nm) ergibt sich durch hyperbole Kurvenanpassung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 11 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (rechts).	106
Abbildung 7.14: Übersicht der Inhibierung von wtBFD durch 3-Chloro-MBP. Aufgetragen sind die Messwerte als Lineweaver-Burk Diagramm (A), Eadie-Hofstee Diagramm (B) sowie als Hanes Diagramm (C).	107
Abbildung 7.15: Übersicht der Inhibierung von wtBFD durch 4-Chloro-MBP. Aufgetragen sind die Messwerte in doppelt reziproker Form (A), als Eadie-Hofstee Diagramm (B) sowie als Hanes Diagramm (C).	109
Abbildung 7.16: Übersicht der Inhibierung von wtBFD durch 4-Methoxy-MBP. Aufgetragen sind die Messwerte in doppelt reziproker Form (A), als Eadie-Hofstee Diagramm (B) sowie als Hanes Diagramm (C).	109
Abbildung 7.17: Inhibierung der wtBFD durch die Inhibitoren 3-Cl-MBP (A), 4-Cl-MBP (B) und 4-MeO-MBP (C). Die Inhibierungskonstanten $K^{0,5}$ sind bestimmt für halbe Maximalaktivität bei 40 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd.	111
Abbildung 7.18: Nachgewiesener kompetitiver Cofaktor-Inhibitor Komplex aus ThDP und 4-Methoxy-MBP (links) sowie der postulierte nicht kompetitive Cofaktor-Substrat-Inhibitor Komplex aus ThDP (blau), Benzaldehyd (grün) und 4-Methoxy-MBP (rot; rechts).	113
Abbildung 8.1: Anbindung der MBP-Inhibitoren an den Cofaktor ThDP im aktiven Zentrum der BFD.	115
Abbildung 8.2: Anbindung der reversiblen Inhibitoren MBP (A), 3-Chloro-MBP (B) sowie 4-Methoxy-MBP (C) an das ThDP im aktiven Zentrum der wtBFD. Die Überlagerung aller drei Strukturen zeigt die nahezu identische Ausrichtung der Inhibitor-ThDP Strukturen (D).	117

Abbildung 8.3: Überlagerung und Ausrichtung der substituierten Inhibitoren 3-Chloro-MBP (türkis; Chlor=grün) und 4-Methoxy-MBP (violett; Methylgruppe=violett) im aktiven Zentrum der wtBFD. Der hydrophobe Methoxyrest des 4-Methoxy-MBP steht in Nachbarschaft (grün gestrichelte Linien) mit den polaren Gruppen von Threonin380 und Threonin377. Der Chlorsubstituent des 3-Chloro-MBP steht in einer polaren Wechselwirkung (rot gestrichelte Linie) mit Threonin377	118
Abbildung 8.4: A: Anbindung des reversiblen Inhibitors MBP an das ThDP im aktiven Zentrum der Variante BFD A460I-F464I. B und C: Überlagerung der ThDP-MBP Komplexe von wtBFD (grün) und BFD A460I-F464I (braun).	120
Abbildung 8.5: Kristallstrukturen der ThDP-MBP Komplexe von wtBFD (grün) und BFD A460I-F464I (braun). Abgebildet sind die helicalen Strukturen mit den Aminosäureresten (links) sowie die Oberflächendarstellungen der Elektronendichte der wtBFD (mittig) und der Überlagerung von wtBFD und BFD A460I-F464I (rechts).	121
Abbildung 8.6: ThDP-MBP Komplexe in der wtBFD (A, B) und BFD A460I-F464I (E, F) sowie der daraus abgeleiteten potentiellen Ausrichtung der Carboxylierungsprodukte (<i>S</i>)-HPP (C, D) und (<i>R</i>)-HPP (G, H) bei der 2-HPP Bildung und Spaltung (C/G: kovalent gebunden sowie als Michaelis-Komplex(D/H)). Methoxygruppe = O-R; Ethyldiphosphat = R ₂ .	122
Abbildung 9.1: Reaktionsschema zur (<i>S</i>)-HPP Synthese aus Benzaldehyd und Acetaldehyd katalysiert durch wtBFD.	125
Abbildung 9.2: links: Konzentrations-/ Zeit-Verlauf der (<i>S</i>)-HPP Synthese ausgehend von 42 mM Benzaldehyd und 420 mM Acetaldehyd im 10,5 L-Maßstab katalysiert durch wtBFD. rechts: Auskristallisiertes (<i>S</i>)-HPP.	125
Abbildung 9.3: Reaktionsschema zur (<i>R</i>)-HPP Synthese aus Benzaldehyd und Acetaldehyd katalysiert durch BAL.	126
Abbildung 9.4: Konzentrations-/ Zeit-Verlauf der (<i>R</i>)-HPP Synthese ausgehend von 43 mM Benzaldehyd und 400 mM Acetaldehyd im 1 L-Maßstab katalysiert durch BAL. Nach 105 h wurde nochmals BAL nachdosiert (gestrichelte Linie). Rechts: Isoliertes (<i>R</i>)-HPP.	126
Abbildung 9.5: Reaktionsschema zur (<i>R</i>)-HPP Synthese aus Benzaldehyd und Acetaldehyd katalysiert durch BAL.	127
Abbildung 9.6: Isoliertes (<i>R</i>)-Benzoin in kristalliner Form	127

Abbildung 9.7: Zweistufiges Reaktionsschema zur Synthese der spezifischen Inhibitoren für ThDP-abhängige Enzyme 3-Chloro-, 4-Chloro- und 4-Methoxy-MBP.	128
Abbildung 9.8: Auskristallisierte Natriumsalze der ThDP-Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Methoxy-MBP und 4-Chloro-MBP (von links nach rechts).	129
Abbildung 10.1: Auftragung des Enantiomerenüberschusses ee in Abhängigkeit vom Enantiomerenverhältnis er (links) sowie der Veränderung der Differenz der Aktivierungsenergien $\Delta\Delta G$ als Funktion des Enantiomerenüberschusses (rechts).	134
Abbildung 10.2: Struktur von Phenylbenzoylphosphonat als potentieller Inhibitor ThDP abhängiger Enzyme mit substratanaloger Struktur der Benzoine.	139
Abbildung A1: Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Benzaldehyd, 2-HPP und Benzoinkonzentration.	152

E. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Einteilung der Enzyme in Enzymklassen.	3
Tabelle 1.2: Vitamine der Vitamin B Gruppe und ihr natürliches Vorkommen.	4
Tabelle 3.1: Reinigungsübersicht einer wtBFD Charge über eine Ni-NTA Säule. Eingesetzt wurden 48 g <i>E. coli</i> SG13009 Zellen mit dem Plasmid pBFDwt-His. Das Enzym wurde als zellfreier Extrakt (ZFE) mittels Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) sowie Ultra-(UF) gereinigt.	20
Tabelle 3.2: Reinigungsübersicht einer BFD F464I Charge aus 84 g <i>E. coli</i> SG13009. Das Enzym wurde als zellfreier Extrakt (ZFE) über Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) sowie Ultra-(UF) und Gelfiltration (GF) gereinigt.	21
Tabelle 3.3: Durchschnittlich erzielte Enzymaktivitäten nach der Gefriertrocknung für die verwendeten BFD Varianten (Aktivitäten unter Standardbedingungen).	21
Tabelle 3.4: Reinigungsübersicht einer BFD A460I-F464I Charge mittels Farbstoffaffinitätschromatographie zur Proteinkristallisation. Die Aktivitäten (U_{BF}) beziehen sich hier auf die Decarboxylierung von Benzoylformiat.	22
Tabelle 4.1: Kinetische Parameter zur Decarboxylierung von Benzoylformiat (BF) durch BFD Varianten nach Iding et al. ^a und Siegert et al. ^b (Iding et al. 2000), (Siegert et al. 2005).	26
Tabelle 4.2: Publierte kinetische Parameter der 2-HPP Bildung sowie der Enantioselektivität für die Carboligationsprodukte 2-HPP, Acetoin und Benzoin aus Benzaldehyd (BA) und Acetaldehyd (AA) durch BFD Varianten nach Iding et al. ^a und Siegert et al. ^b (Iding et al. 2000), (Siegert et al. 2005). n.b. = nicht bestimmt.	26
Tabelle 4.3: Kinetische Parameter für die 2-HPP Bildung bestimmt durch eine Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik. Im Vergleich sind für die wtBFD Werte nach Iding et al. ^a angegeben (Iding et al. 2000).	30
Tabelle 4.4: Kinetische Parameter für die 2-HPP Bildung bestimmt durch eine Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik mit Substratinhibierung durch Acetaldehyd.	30
Tabelle 4.5: Höchste und niedrigste erzielte Enantiomerenüberschüsse für 2-HPP durch Variation des pH-Wertes und der Benzaldehydkonzentration.	36

Tabelle 4.6: pK _S -Wert Berechnung für die Aminosäuren His70 und His281 der einzelnen BFD-Monomere mit dem Programm H ⁺⁺ . Bedingungen: 50 mM Salzgehalt, Dielektrizitätskonstante/Lösung = 80, Dielektrizitätskonstante/Protein = 15.	37
Tabelle 4.7: Aktivierungsenergien für die 2-HPP Synthese ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd. ^a Nach Greiner et al. (Greiner 1999).	40
Tabelle 5.1: Reaktorspezifische Parameter der Hochdruckzirkulationsanlage.	
Tabelle 5.1: Reaktorspezifische Parameter der Hochdruckzirkulationsanlage.	47
Tabelle 5.2: Übersicht der Daten nach dem Hochdruckumsatz sowie der Daten für die Umsatzkurven nach der Dekompression und unter reinem Atmosphärendruck für Umsätze, die in etwa zweimal dem Hochdruckumsatz entsprechen.	52
Tabelle 6.1: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für wtBFD .	63
Tabelle 6.2: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für BFD F464I .	63
Tabelle 6.3: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für BFD A460I .	63
Tabelle 6.4: Übersicht der im Modell verwendeten Parameter (untere Grenze = Min; obere Grenze = Max) sowie deren Anpassung durch Simulation (Wert (fit)) für BFD A460I-F464I .	64
Tabelle 6.5: Vergleich der Bildungsraten von 2-HPP unter Standardbedingungen und bei der Spaltung von rac-Benzoin.	73
Tabelle 6.6: Übersicht der kinetischen Parameter für (S)- und (R)-HPP als Substrat für die BFD-Varianten aus der hyperbolen Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten. Bestimmt wurden die Parameter unter Zusatz von 25 mM Acetaldehyd. Zum Vergleich sind die Werte für die 2-HPP Synthese unter Standardbedingungen angegeben (Spalte 6 und 7; in Klammern sind Literaturwerte nach Iding et al. angegeben Iding et al. 2000).	77
Tabelle 6.7: Übersicht der bestimmten Gleichgewichtskonzentrationen von 2-HPP, Acetaldehyd, Benzaldehyd und (R)-Benzoin, sowie den berechneten Gleichgewichtskonstanten.	89

Tabelle 7.1: Übersicht einiger Inhibitoren ThDP-abhängiger Enzyme.	100
Tabelle 7.2: Übersicht der per CD-Spektroskopie ermittelten Dissoziationskonstanten für MBP und 3-Cl-MBP für wtBFD sowie die Varianten BFD F464I, BFD A460I und BFD A460I-F464I. Spalte rechts: Michaelis-Menten Konstante für Benzaldehyd ($K_{M,BA}$) bei der 2-HPP Synthese zum Vergleich.	105
Tabelle 7.3: Umsätze und Enantioselektivitäten von verschiedenen substituierten 2-HPP Derivaten für wtBFD nach Dünnwald et al.. Die Umsätze wurden nach 20 h Reaktionszeit bei 10 mM Donoraldehyd, 500 mM Acetaldehyd und Umgebungstemperatur erreicht (Dünnwald et al. 2000).	105
Tabelle 7.4: Übersicht der kinetischen Parameter zur Inhibierung der wtBFD durch 3-Chloro-MBP. Die Daten wurden aus der Lineweaver-Burk-, Eadie-Hofstee- und Hanes-Auftragung als kompetitive Inhibierung ermittelt.	107
Tabelle 7.5: Übersicht der kinetischen Parameter zur Inhibierung der wtBFD durch 4-Chloro-MBP. Die Daten wurden aus der doppelt reziproken, Eadie-Hofstee- und Hanes-Auftragung als nicht kompetitive Inhibierung ermittelt.	108
Tabelle 7.6: Übersicht der kinetischen Parameter zur Inhibierung der wtBFD durch 4-Methoxy-MBP. Die Daten wurden aus der doppelt reziproken, Eadie-Hofstee- und Hanes-Auftragung als nicht kompetitive Inhibierung ermittelt.	110
Tabelle/Abbildung 7.7: Übersicht der elektronischen Eigenschaften von Substituenten an aromatischen Systemen (links) sowie deren Auftragung gegen die Inhibierungsstärken substituierter Methylbenzoylphosphonate.	112
Tabelle 8.1: Übersicht der röntgenstrukturkristallographischen Daten für die Kristallisationsexperimente mit der wtBFD.	116
Tabelle 8.2: Übersicht der röntgenstrukturkristallographischen Statistiken für die Kristallisationsexperimente mit der BFD A460I-F464I.	119
Tabelle 9.1: Übersicht der eingesetzten Eduktmengen, Ausbeuten und isolierten Ausbeuten für die Synthesereaktionen der Enzyminhibitoren 3-Chloro-, 4-Chloro- und 4-Methoxy-Benzoylphosphonatmethylester.	128
Tabelle 10.1: Berechnung der $\Delta\Delta G$ -Werte für die unterschiedlichen Enantioselektivitäten im Bereich von 0-250 MPa unter Annahme einer irreversiblen Reaktionsführung für Reaktionen erster Ordnung.	135

Tabelle A1-A5. : Zusammensetzung der zur Transformation und Zellkultur benötigten Medien und Puffer.	146
Tabelle A6-A11 : Zusammensetzung der für die Fermentation benötigten Medien und Lösungen.	147
Tabelle A12. : Zusammensetzung der Aufschlusspuffer zur Herstellung der zellfreien Extrakte.	148
Tabelle A13-A14.: Zusammensetzung des Wasch- und Elutionspuffers für die wtBFD Aufreinigung mittels Ni(II)-NTA Agarose Partikel.	149
Tabelle A15.: Zusammensetzung des Entsalzungspuffers für die Umpufferung der wtBFD aus der IMAC.	149
Tabelle A16-A17: Zusammensetzung der Elutionspuffer für die Anionenaustauschchromatographie (ANX).	150
Tabelle A18-A19: Zusammensetzung des Equilibrierungs- und Elutionspuffers für die Farbstoffaffinitätschromatographie.	151
Tabelle A20-A21: Zusammensetzung des Aktivitätspuffers und der Stopplösung zur Aufreinigungsüberwachung.	151
Tabelle A22: Standardmäßige Zusammensetzung des Reaktionspuffers.	153
Tabelle A23: Übersicht der hochdruckreaktorspezifischen Parameter.	154
Tabelle A24: Zusammensetzung der benzoinhaltigen Substratpuffer.	155
Tabelle A25: Zusammensetzung des TEA-Puffer.	156
Tabelle A26: Konzentrationen der BFD-Inhibitoren 3-Chloro-MBP, 4-Chloro-MBP und 4-Methoxy-MBP für die Aktivitätsassays bei 5, 10, 20, 30 und 40 mM Benzaldehyd zur Inhibierungscharakterisierung.	158
Tabelle A27-28: Zusammensetzung des CD-Puffers sowie die Mengen der eingesetzten BFD Varianten zur Bestimmung der spezifischen Dissoziationskonstanten von MBP bzw. 3-Chloro-MBP.	158
Tabelle A29: Übersicht der gemessenen Konzentrationsbereiche von MBP bzw. 3-Chloro-MBP bei den jeweiligen BFD Varianten.	158

F. MATLAB-Skripte zur Simulation der Konzentrationsverläufe

MATLAB-Skript zur Simulation der wtBFD:

```
function dy = ode_wtBFD(t,y,Parameter_Enzym)
dy = zeros(4,1);

vmaxI=Parameter_Enzym(1);
Km_BADo=Parameter_Enzym(2);
Km_A=Parameter_Enzym(3);

vmaxII=Parameter_Enzym(4);
Km_BAAcc=Parameter_Enzym(5);

vmaxIII=Parameter_Enzym(6);
Km_Benzoin=Parameter_Enzym(7);

c_HPP = y(1); %HPP
c_Benzoin = y(2); %Benzoin
c_BA = y(3); % Benzaldehyd
c_A = y(4); %Acetaldehyd

v_I=vmaxI*(c_BA*c_A)/((Km_BADo+c_BA)*(Km_A+c_A));

v_II=vmaxII*c_BA^2/((Km_BAAcc+c_BA)*(Km_BADo+c_BA))-
vmaxIII*c_Benzoin/(Km_Benzoin+ c_Benzoin);

BFD= 2; %mg/ mL;

% Diff Substanzen
dy(1) = BFD*v_I; %HPP Bildung
dy(2) = BFD*v_II; %Benzoin Bildung
dy(3) = BFD*(-2*v_II-v_I); %BA Abnahme
dy(4) = -BFD*v_I; %Acetaldehyd

*****

t = Data(:,1); % Zeit
c_HPP = Data(:,2);
c_Benzoin = Data(:,3);
c_BA = Data(:,4);

%X
A0=100; % Anfangskonzentration Acetaldehyd

%%Fitness function
fitnessFunction = @lse_res_wtBFD;
%%Number of Variables
nvars = 7;
%Linear inequality constraints
Aineq = [];
Bineq = [];
%Linear equality constraints
Aeq = [];
Beq = [];
%Bounds

LB= [40 5 250 1.6 0 0 0]; % lower boundary
```

```

UB= [45 17.5 750 3 150 0.065 50 ] ; % upper boundary

% [vmaxI Km_BADo Km_A vmaxII Km_BAAcc vmaxIII Km_Benzoin]

PopulationSize=500;

%Nonlinear constraints
nonlconFunction = [];
%Start with default options
options = gaoptimset;
%%Modify some parameters
options = gaoptimset(options,'PopInitRange' ,[LB;UB]);
options = gaoptimset(options,'PopulationSize',PopulationSize);
options = gaoptimset(options,'Generations',50);
options = gaoptimset(options,'StallGenLimit' ,inf);
options = gaoptimset(options,'StallTimeLimit',inf);
options = gaoptimset(options,'MutationFcn' ,@mutationadaptfeasible);
options = gaoptimset(options,'TolCon',1e-6);
options = gaoptimset(options,'TolFun',1e-6);
options = gaoptimset(options,'Display' , 'iter');
options = gaoptimset(options,'EliteCount',PopulationSize/10);
options = gaoptimset(options,'CrossoverFraction' ,0.6);
% options = gaoptimset(options,'Vectorized' , 'on');

options_a=options;

[X,FVAL,REASON,OUTPUT_a,POPULATION,SCORES] =
ga(fitnessFunction,nvars,Aineq,Bineq,Aeq,Beq,LB,UB,nonlconFunction,options)
;
y_0=[c_HPP(1) c_Benzoin(1) c_BA(1) A0];

t=[0:1:80];

[t,odesolv]=ode45(@ode_wtBFD,t,y_0,[],X);

figure(1)
clf(1)
plot(t,odesolv(:,1),'b-',t,odesolv(:,3),'g-',t,odesolv(:,2),'r-')
hold on
plot(Data(:,1),Data(:,2),'b+',Data(:,1),Data(:,3),'r*',Data(:,1),Data(:,4),
'g.')

```

MATLAB-Skript zur Simulation der BFD F464I:

```

function dy = ode_BFDf(t,y,Parameter_Enzym)
dy = zeros(4,1);

vmaxI=Parameter_Enzym(1);
Km_BADo=Parameter_Enzym(2);
Km_A=Parameter_Enzym(3);

vmaxII=Parameter_Enzym(4);
Km_BAAcc=Parameter_Enzym(5);
vmaxIII=Parameter_Enzym(6);
Km_Benzoin=Parameter_Enzym(7);

c_HPP = y(1); %HPP
c_Benzoin = y(2);%Benzoin

```

```

c_BA = y(3); % Benzaldehyd
c_A = y(4); %Acetaldehyd

% Rate equations

v_I=vmaxI*(c_BA*c_A)/((Km_BADo+c_BA)*(Km_A+c_A));

v_II=vmaxII*c_BA^2/((Km_BAAcc+c_BA)*(Km_BADo+c_BA))-
vmaxIII*c_Benzoin/(Km_Benzoin+ c_Benzoin);

BFD=0.3;

% Diff Substanzen
dy(1) = BFD*v_I; %HPP Bildung
dy(2) = BFD*v_II; %Benzoin Bildung
dy(3) = BFD*(-2*v_II-v_I); %BA Abnahme
dy(4) = -BFD*v_I; %Acetaldehyd

***
t = Data(:,1); % Zeit
c_HPP = Data(:,2);
c_Benzoin = Data(:,3);
c_BA = Data(:,4);

%X
A0=300; % Start concentration Acetaldehyd

%%Fitness function
fitnessFunction = @lse_res_BFDf;
%%Number of Variables
nvars = 7;
%Linear inequality constraints
Aineq = [];
Bineq = [];
%Linear equality constraints
Aeq = [];
Beq = [];
%Bounds

LB= [0 0 200 0 10 0 0]; % lower boundary
UB= [30 75 600 0.25 75 0.1 10]; % upper boundary

% [vmaxI Km_BADo Km_A vmaxII Km_BAAcc vmaxIII Km_Benzoin]

PopulationSize=500;

%Nonlinear constraints
nonlconFunction = [];
%Start with default options
options = gaoptimset;
%%Modify some parameters
options = gaoptimset(options,'PopInitRange' ,[LB;UB]);
options = gaoptimset(options,'PopulationSize',PopulationSize);
options = gaoptimset(options,'Generations',50);
options = gaoptimset(options,'StallGenLimit' ,inf);
options = gaoptimset(options,'StallTimeLimit',inf);
options = gaoptimset(options,'MutationFcn' ,@mutationadaptfeasible);
options = gaoptimset(options,'TolCon',1e-6);

```

```
options = gaoptimset(options,'TolFun',1e-6);
options = gaoptimset(options,'Display' , 'iter');
options = gaoptimset(options,'EliteCount',PopulationSize/10);
options = gaoptimset(options,'CrossoverFraction' ,0.6);
% options = gaoptimset(options,'Vectorized' , 'on');

options_a=options;

%Run GA

[X,FVAL,REASON,OUTPUT_a,POPULATION,SCORES] =
ga(fitnessFunction,nvars,Aineq,Bineq,Aeq,Beq,LB,UB,nonlconFunction,options)
;

y_0=[c_HPP(1) c_Benzoin(1) c_BA(1) A0];

t=[0:1:2415];

[t,odesolv]=ode45(@ode_BFDf,t,y_0,[],X);

figure(1)
clf(1)
plot(t,odesolv(:,1),'b-',t,odesolv(:,3),'g-',t,odesolv(:,2),'r-') % 1 HPP,
2 Benzoin, 3 BA
hold on
plot(Data(:,1),Data(:,2),'b+',Data(:,1),Data(:,3),'r*',Data(:,1),Data(:,4),
'g.')%
```

MATLAB-Skript zur Simulation der BFD A460I:

```
function dy = ode_BFDa(t,y,Parameter_Enzym)
dy = zeros(4,1);

vmaxI=Parameter_Enzym(1);
Km_BADo=Parameter_Enzym(2);
Km_A=Parameter_Enzym(3);

vmaxII=Parameter_Enzym(4);
Km_BAacc=Parameter_Enzym(5);
vmaxIII=Parameter_Enzym(6);
Km_Benzoin=Parameter_Enzym(7);

c_HPP = y(1); %HPP
c_Benzoin = y(2);%Benzoin
c_BA = y(3); % Benzaldehyd
c_A = y(4); %Acetaldehyd

% Rate equations

v_I=vmaxI*(c_BA*c_A)/((Km_BADo+c_BA)*(Km_A+c_A));

v_II=vmaxII*c_BA^2/((Km_BAacc+c_BA)*(Km_BADo+c_BA))-
vmaxIII*c_Benzoin/(Km_Benzoin+ c_Benzoin);

BFD=0.075; %mg/ mL;

% Diff Substanzen
```

```

dy(1) = BFD*v_I; %HPP Bildung
dy(2) = BFD*v_II; %Benzoin Bildung
dy(3) = BFD*(-2*v_II-v_I); %BA Abnahme
dy(4) = -BFD*v_I; %Acetaldehyd

***

t = Data(:,1); % Zeit
c_HPP = Data(:,2);
c_Benzoin = Data(:,3);
c_BA = Data(:,4);

%X
A0=300; % Start concentration Acetaldehyd

%%Fitness function
fitnessFunction = @lse_res_BFDa;
%%Number of Variables
nvars = 7;
%Linear inequality constraints
Aineq = [];
Bineq = [];
%Linear equality constraints
Aeq = [];
Beq = [];
%Bounds

LB= [4.2 6.4 300 0 0 0 0]; % lower boundary
UB= [5.4 9 834 0.2 300 0.002 3]; % upper boundary

% [vmaxI Km_BADo Km_A vmaxII Km_BAAcc vmaxIII Km_Benzoin]

PopulationSize=300;

%Nonlinear constraints
nonlconFunction = [];
%Start with default options
options = gaoptimset;
%%Modify some parameters
options = gaoptimset(options,'PopInitRange' ,[LB;UB]);
options = gaoptimset(options,'PopulationSize',PopulationSize);
options = gaoptimset(options,'Generations',20);
options = gaoptimset(options,'StallGenLimit' ,inf);
options = gaoptimset(options,'StallTimeLimit',inf);
options = gaoptimset(options,'MutationFcn' ,@mutationadaptfeasible);
options = gaoptimset(options,'TolCon',1e-6);
options = gaoptimset(options,'TolFun',1e-6);
options = gaoptimset(options,'Display' , 'iter');
options = gaoptimset(options,'EliteCount',PopulationSize/10);
options = gaoptimset(options,'CrossoverFraction' ,0.6);
% options = gaoptimset(options,'Vectorized' , 'on');

options_a=options;
%Run GA

[X,FVAL,REASON,OUTPUT_a,POPULATION,SCORES] =
ga(fitnessFunction,nvars,Aineq,Bineq,Aeq,Beq,LB,UB,nonlconFunction,options)
;

y_0=[c_HPP(1) c_Benzoin(1) c_BA(1) A0];

```

```
t=[0:1:1300];

[t,odesolv]=ode45(@ode_BFDa,t,y_0,[],X);

figure(1)
clf(1)
plot(t,odesolv(:,1),'b-',t,odesolv(:,3),'g-',t,odesolv(:,2),'r-') % 1 HPP,
2 Benzoin, 3 BA
hold on
plot(Data(:,1),Data(:,2),'b+',Data(:,1),Data(:,3),'r*',Data(:,1),Data(:,4),
'g.')%
```

MATLAB-Skript zur Simulation der BFD A460I-F464I:

```
function dy = ode_BFDaf(t,y,Parameter_Enzym)
dy = zeros(4,1);

vmaxI=Parameter_Enzym(1);
Km_BADo=Parameter_Enzym(2);
Km_A=Parameter_Enzym(3);

vmaxII=Parameter_Enzym(4);
Km_BAAcc=Parameter_Enzym(5);
vmaxIII=Parameter_Enzym(6);
Km_Benzoin=Parameter_Enzym(7);

c_HPP = y(1); %HPP
c_Benzoin = y(2); %Benzoin
c_BA = y(3); % Benzaldehyd
c_A = y(4); %Acetaldehyd

% Rate equations

v_I=vmaxI*(c_BA*c_A)/((Km_BADo+c_BA)*(Km_A+c_A));

v_II=vmaxII*c_BA^2/((Km_BAAcc+c_BA)*(Km_BADo+c_BA))-
vmaxIII*c_Benzoin/(Km_Benzoin+ c_Benzoin);

BFD=0.25; %mg/ mL;

% Diff Substanzen
dy(1) = BFD*v_I; %HPP Bildung
dy(2) = BFD*v_II; %Benzoin Bildung
dy(3) = BFD*(-2*v_II-v_I); %BA Abnahme
dy(4) = -BFD*v_I; %Acetaldehyd

***

t = Data(:,1); % Zeit
c_HPP = Data(:,2);
c_Benzoin = Data(:,3);
c_BA = Data(:,4);

%X
A0=300; % Start concentration Acetaldehyd

%%Fitness function
fitnessFunction = @lse_res_BFDaf;
%%Number of Variables
```

```

nvars = 7;
%Linear inequality constraints
Aineq = [];
Bineq = [];
%Linear equality constraints
Aeq = [];
Beq = [];
%Bounds

LB= [0 7.75 200 0 50 0.005 0]; % lower boundary
UB= [25 30 1000 1 75 0.05 1] ; % upper boundary

% [vmaxI Km_BADo Km_A vmaxII Km_BAAcc vmaxIII Km_Benzoin]

PopulationSize=200;

%Nonlinear constraints
nonlconFunction = [];
%Start with default options
options = gaoptimset;
%%Modify some parameters
options = gaoptimset(options,'PopInitRange' ,[LB;UB]);
options = gaoptimset(options,'PopulationSize',PopulationSize);
options = gaoptimset(options,'Generations',20);
options = gaoptimset(options,'StallGenLimit' ,inf);
options = gaoptimset(options,'StallTimeLimit',inf);
options = gaoptimset(options,'MutationFcn' ,@mutationadaptfeasible);
options = gaoptimset(options,'TolCon',1e-6);
options = gaoptimset(options,'TolFun',1e-6);
options = gaoptimset(options,'Display' , 'iter');
options = gaoptimset(options,'EliteCount',PopulationSize/10);
options = gaoptimset(options,'CrossoverFraction' ,0.6);
% options = gaoptimset(options,'Vectorized' , 'on');

options_a=options;
%Run GA

[X,FVAL,REASON,OUTPUT_a,POPULATION,SCORES] =
ga(fitnessFunction,nvars,Aineq,Bineq,Aeq,Beq,LB,UB,nonlconFunction,options)
;

y_0=[c_HPP(1) c_Benzoin(1) c_BA(1) A0];

t=[0:1:380];

[t,odesolv]=ode45(@ode_BFDaf,t,y_0,[],X);

figure(1)
clf(1)
plot(t,odesolv(:,1),'b-',t,odesolv(:,3),'g-',t,odesolv(:,2),'r-') % 1 HPP,
2 Benzoin, 3 BA
hold on
plot(Data(:,1),Data(:,2),'b+',Data(:,1),Data(:,3),'r*',Data(:,1),Data(:,4),
'g.')%

```


G. Literaturverzeichnis

- Adam, W.; Díaz, M. T.; Fell, R. T.; Saha-Möller, C. R. (1996): Kinetic Resolution of Racemic α -Hydroxy Ketones by Lipase-catalyzed Irreversible Transesterification. In: *Tetrahedron-Asymmetry*, Jg. 7, H. 8, S. 2207–2210.
- Antranikian, G. (1998): *Biotechnology of extremophiles*. Berlin u.a.: Springer (Advances in biochemical engineering, biotechnology, 61).
- Arbuzov, B. A. (1964): Michaelis–Arbusow- und Perkow-Reaktionen. In: *Pure And Applied Chemistry*, Jg. 9, S. 307–353.
- Barrowman, M. M.; Fewson, C. A. (1985): Phenylglyoxylate Decarboxylase and Phenylpyruvate Decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*. In: *Current Microbiology*, Jg. 12, H. 4, S. 235–239.
- Barrowman, M. M.; Harnett, W.; Scott, A. J.; Fewson, C. A.; Kusel, J. R. (1986): Immunological comparison of microbial TPP-dependent non-oxidative α -keto acid decarboxylases. In: *FEMS Microbiology Letters*, Jg. 34, H. 1, S. 57–60.
- Baumgart, J. (1974): The Effect of the Feedback Inhibition of Threonine Deaminase on Valine-Leucine Biosynthesis. In: *Archives of Microbiology*, Jg. 101, H. 3, S. 221–232.
- Bausewein, Claudia; Twycross, Robert G.; Wilcock, Andrew; Grüner, Kathrin (2005): *Arzneimitteltherapie in der Palliativmedizin*. 1., dt. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Bayer Vital GmbH: Bayer. Online verfügbar unter www.glucobay.de.
- Beckwith, J. R. (1967): Regulation of Lac Operon. In: *Science*, Jg. 156, H. 3775, S. 597–604.
- Benesch, R.; Benesch, R. E. (1967): The Effect of Organic Phosphates from the Human Erythrocyte on the Allosteric Properties of Hemoglobin. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, H. 26, S. 162–167.
- Bera, A. K.; Polovnikova, L. S.; Roestamadji, J.; Widlanski, T. S.; Kenyon, G. L.; McLeish, M. J.; Hasson, M. S. (2007): Mechanism-based inactivation of benzoylformate decarboxylase, a thiamin diphosphate-dependent enzyme. In: *Journal of The American Chemical Society*, Jg. 129, H. 14, S. 4120ff.
- Bey, T.; Walter, F. G. (2002): Sarin, Soman, Tabun und VX. Militärische Nervenkampfstoffe als terroristische Bedrohung gegen die Zivilbevölkerung. In: *Notfall & Rettungsmedizin*, H. 5, S. 462–468.
- Beyer, Hans; Walter, Wolfgang (1991): *Lehrbuch der organischen Chemie*. Mit 20 Tabellen. 22., überarb. und aktualisierte Aufl. / Stuttgart: Hirzel.
- Bisswanger, H. (2008): *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*. 2. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Brandt, G. S.; Kneen, M. M.; Chakraborty, S.; Baykal, A. T.; Nemeria, N.; Yep, A. et al. (2009): Snapshot of a Reaction Intermediate: Analysis of Benzoylformate Decarboxylase in Complex with a Benzoylphosphonate Inhibitor. In: *Biochemistry*, Jg. 48, H. 15, S. 3247–3257.
- Brandt, G. S.; Nemeria, N.; Chakraborty, S.; McLeish, M. J.; Yep, A.; Kenyon, G. L. et al. (2008): Probing the active center, of benzaldehyde lyase with substitutions and the pseudosubstrate analogue benzoylphosphonic acid methyl ester. In: *Biochemistry*, Jg. 47, H. 29, S. 7734–7743.
- Breslow, R. (1958): On The Mechanism of Thiamine Action .4. Evidence From Studies On Model Systems. In: *Journal of The American Chemical Society*, Jg. 80, H. 14, S. 3719–3726.

- Breuer, M.; Dittrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, M.; Sturmer, R.; Zelinski, T. (2004): Industrial methods for the production of optically active intermediates. In: *Angewandte Chemie-International Edition*, Jg. 43, H. 7, S. 788-824.
- Brown, A.; Nemeria, N.; Yi, J. Z.; Zhang, D. Q.; Jordan, W. B.; Machado, R. S. et al. (1997): 2-oxo-3-alkynoic acids, universal mechanism-based inactivators of thiamin diphosphate-dependent decarboxylases: Synthesis and evidence for potent inactivation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. In: *Biochemistry*, Jg. 36, H. 26, S. 8071-8081.
- Brunner, H. (1999): *Rechts oder links. In der Natur und anderswo*. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Bruning, M.; Berheide, M.; Meyer, D.; Golbik, R.; Bartunik, H.; Liese, A.; Tittmann, K. (2009): Structural and Kinetic Studies on Native Intermediates and an Intermediate Analogue in Benzoylformate Decarboxylase Reveal a Least Motion Mechanism with an Unprecedented Short-Lived Predecarboxylation Intermediate. In: *Biochemistry*, Jg. 48, H. 15, S. 3258-3268.
- Buckow, R.; Weiss, U.; Heinz, V.; Knorr, D. (2007): Stability and catalytic activity of alpha-amylase from barley malt at different pressure-temperature conditions. In: *Biotechnology And Bioengineering*, Jg. 97, H. 1, S. 1-11.
- Chiu, C. C.; Jordan, F. (1994): Novel Synthesis of 2-Oxo-4-phenyl-3-butyric Acid, a New Inhibitor and Alternate Substrate of Pyruvate Decarboxylase. In: *Journal of Organic Chemistry*, Jg. 59, S. 5763-5766.
- Cipiciani, A.; Bellezza, F.; Fringuelli, F.; Silvestrini, M. G. (2001): Influence of pH and temperature on the enantioselectivity of propan-2-ol-treated *Candida rugosa* lipase in the kinetic resolution of ($\pm$)-4 acetoxycyclohexyl-2,2,2-trifluoroethyl ether. In: *Tetrahedron-Asymmetry*, Jg. 12, S. 2277-2281.
- Collins, M. D.; Hummer, G.; Quillin, M. L.; Matthews, B. W.; Gruner, S. M. (2005): Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation. In: *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, Jg. 102, H. 46, S. 16668-16671.
- Curci, R.; D'Accolti, L.; Fusco, C.; Rosa, A. (1996): Selective Oxidation of O-Isopropylidene Derivatives of Diols to 2-Hydroxy Ketones Employing Dioxiranes. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 37, H. 1, S. 115-118.
- Demir, A. S.; Pohl, M.; Janzen, E.; Müller, M. (2001): Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage. In: *Journal of The Chemical Society-Perkin Transactions 1*, H. 7, S. 633-635.
- Demir, A. S.; Sesenoglu, O.; Eren, E.; Hosrik, B.; Pohl, M.; Janzen, E. et al. (2002): Enantioselective synthesis of alpha-hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction. In: *Advanced Synthesis & Catalysis*, Jg. 344, H. 1, S. 96-103.
- Dominguez de Maria, P.; Pohl, M.; Gocke, D.; Gröger, H.; Trauthwein, H.; Stillger, T. et al. (2007): Asymmetric synthesis of aliphatic 2-hydroxy ketones by enzymatic carbonylation of aldehydes. In: *European Journal of Organic Chemistry*, H. 18, S. 2940-2944.
- Dominguez de Maria, P.; Stillger, T.; Pohl, M.; Wallert, S.; Drauz, K.; Gröger, H. et al. (2006): Preparative enantio selective synthesis of benzoin and (R)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, Jg. 38, H. 1, S. 43-47.

- Dünnwald, T.; Demir, A. S.; Siegert, P.; Pohl, M.; Müller, M. (2000): Enantioselective Synthesis of (S)-2-Hydroxypropanone Derivatives by Benzoylformate Decarboxylase Catalyzed C-C Bond Formation. In: *European Journal of Organic Chemistry*, S. 2161–2170.
- Effenberger, F.; Null, V. (1992): Eine neue, effiziente Synthese von Fagomin. In: *Liebigs Annalen der Chemie*, H. 11.
- Effenberger, F.; Null, V.; Ziegler, T. (1992): Preparation of Optically Pure L-2-Hydroxyaldehydes with Yeast Transketolase. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 33, H. 36, S. 5157–5160.
- Eggers, R.; Jaeger, P. (2003): Aus: Extraction optimization in food engineering. Kapitel: Extraction Systems. New York: Dekker (Food science and technology, 128).
- Enders, D.; Breuer, K.; Teles, J. H. (1996): A Novel Asymmetric Benzoin Reaction Catalyzed by a Chiral Triazolium Salt. In: *Helvetica Chimica Acta*, Jg. 79, H. 4, S. 1217–1221.
- Fang, Q. K.; Han, Z.; Grover, P.; Kessler, D.; Senanayake, C. H.; Wald, S. (2000): Rapid access to enantiopure bupropion and its major metabolite by stereospecific nucleophilic substitution on an alpha-ketotriflate. In: *Tetrahedron-Asymmetry*, Jg. 11, H. 18, S. 3659–3663.
- Friedman, L.; Miller, J. G. (1971): Odor Incongruity and Chirality. In: *Science*, Jg. 172, S. 1044–1046.
- Gala, D.; DiBenedetto, D. J.; Clark, J. E.; Murphy, B. L. and Schumacher D. P.; Steinman, M. (1996): Preparations of antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative chromatographic resolution, and total asymmetric synthesis via enzymatic preparation of chiral alpha-hydroxy arylketones. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 37, H. 5, S. 611–614.
- Gestis: GESTIS-Stoffdatenbank Gefahrstoffinformationssystem der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Herausgegeben von Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. (2009) Online verfügbar unter <http://www.dguv.de/bgia/de/index.jsp>.
- Gocke, D.; Walter, L.; Gauchenova, E.; Kolter, G.; Knoll, M.; Berthold, C. L. et al. (2008): Rational protein design of ThDP-Dependent enzymes-engineering stereoselectivity. In: *Chembiochem*, Jg. 9, H. 3, S. 406–412.
- Gocke, D.; Graf, T.; Brosi, H.; Frindi-Wosch, I.; Walter, L.; Müller, M.; Pohl, M. (2009): Comparative characterisation of thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, Jg. 61, H. 1–2, S. 30–35.
- Gonzalez, B.; Vicuna, R. (1989): Benzaldehyde Lyase, A Novel Thiamine Ppi-Requiring Enzyme, From *Pseudomonas-Fluorescens* Biovar-I. In: *Journal of Bacteriology*, Jg. 171, H. 5, S. 2401–2405.
- Greiner, L. (1999): Reaktionstechnik der Benzoylformiatdecarboxylase. Diplomarbeit. Betreut von C. Wandrey. Bonn. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Biotechnologie.
- Gross, M.; Jaenicke, R. (1994): Proteins Under Pressure - The Influence of High Hydrostatic-Pressure On Structure, Function And Assembly of Proteins And Protein Complexes. In: *European Journal of Biochemistry*, Jg. 221, H. 2, S. 617–630.
- Gunsalus, C. F.; Stanier, R. Y.; Gunsalus, I. C. (1953a): The Enzymatic Conversion of Mandelic Acid To Benzoic Acid .3. Fractionation And Properties of The Soluble Enzymes. In: *Journal of Bacteriology*, Jg. 66, H. 5, S. 548–553.

- Gunsalus, I. C.; Gunsalus, C. F.; Stanier, R. Y. (1953b): The Enzymatic Conversion of Mandelic Acid To Benzoic Acid .1. Gross Fractionation of The System Into Soluble And Particulate Components. In: Journal of Bacteriology, Jg. 66, H. 5, S. 538-542.
- Gutowski, J. A.; Lienhard, G. E. (1976): Transition State Analogs for Thiamin Pyrophosphate-dependent Enzymes. In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 251, H. 9, S. 2663–2666.
- Hansch, C.; Leo, A. (1979): Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. New York: Wiley Interscience.
- Hashiyama, T.; Morikawa, K.; Sharpless, K. B. (1992): alpha-Hydroxy Ketones in High Enantiomeric Purity from Asymmetric Dihydroxylation of Enol Ethers. In: Journal of Organic Chemistry, Jg. 57, H. 19, S. 5067–5068.
- Hasson, M. S.; Muscate, A.; Henahan, G. T. M.; Guidinger, P. F.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; Kenyon, G. L. (1995): Purification And Crystallization of Benzoylformate Decarboxylase. In: Protein Science, Jg. 4, H. 5, S. 955-959.
- Hasson, M. S.; Muscate, A.; McLeish, M. J.; Polovnikova, L. S.; Gerlt, J. A.; Kenyon, G. L. et al. (1998): The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 angstrom resolution: Diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes. In: Biochemistry, Jg. 37, H. 28, S. 9918-9930.
- Hegeman, G. D. (1966): Synthesis of Enzymes of Mandelate Pathway By Pseudomonas Putida .1. Synthesis of Enzymes By Wild Type. In: Journal of Bacteriology, Jg. 91, H. 3, S. 1140ff.
- Hegeman, G. D.; Rosenberg, E. Y.; Kenyon, G. L. (1970): Mandelic Acid Racemase From Pseudomonas-Putida - Purification And Properties of Enzyme. In: Biochemistry, Jg. 9, H. 21, S. 4029ff.
- Heremans, K. (1982): High-Pressure Effects On Proteins And Other Biomolecules. In: Annual Review of Biophysics And Bioengineering, Jg. 11, S. 1-21.
- Heremans, K.; Smeller, L. (1998): Protein structure and dynamics at high pressure. In: Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology, Jg. 1386, H. 2, S. 353-370.
- Hildebrand, F.; Kuhl, S.; Pohl, M.; Vasic-Racki, D.; Müller, M.; Wandrey, C.; Lütz, S. (2007): The production of (R)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from Pseudomonas fluorescens in a continuously operated membrane reactor. In: Biotechnology And Bioengineering, Jg. 96, H. 5, S. 835-843.
- Hildebrandt, G.; Klavehn, W. (1930): Verfahren zur Herstellung von L-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol. Angemeldet durch Knoll A.-G. Chemische Fabriken in Ludwigshafen. Veröffentlichungsnummer: DE 548 459.
- Hochuli, E.; Döbeli, H.; Schacher, A. (1987): New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. In: Journal of Chromatography, Jg. 411, S. 177–184.
- Iding, H. (1998): Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der Benzoylformiatdecarboxylase aus Pseudomonas putida. Dissertation. Düsseldorf. Universität Düsseldorf.
- Iding, H.; Dünwald, T.; Greiner, L.; Liese, A.; Müller, M.; Siegert, P. et al. (2000): Benzoylformate decarboxylase from Pseudomonas putida as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. In: Chemistry-A European Journal, Jg. 6, H. 8, S. 1483-1495.

- Iding, H.; Siegert, P.; Mesch, K.; Pohl, M. (1998): Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology*, Jg. 1385, H. 2, S. 307-322.
- Jansen, J.; Niemeyer, B. (2005): Automated high-pressure plant for a continuous flow through a fixed bed - investigation of hydrodynamic behaviour. In: *Journal of Supercritical Fluids*, Jg. 33, H. 3, S. 285-293.
- Jordan, F.; Li, H. J.; Brown, A. (1999): Remarkable stabilization of zwitterionic intermediates may account for a billion-fold rate acceleration by thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. In: *Biochemistry*, Jg. 38, H. 20, S. 6369-6373.
- Kahlow, U. H. M.; Schmid, R. D.; Pleiss, J. (2001): A model of the pressure dependence of the enantio selectivity of *Candida rugosa* lipase towards (+/-)-menthol. In: *Protein Science*, Jg. 10, H. 10, S. 1942-1952.
- Takeya, H.; Morishita, M.; Koshino, H.; Morita, T.; Kobayashi, K.; Osada, H. (1999): Cytosaxone: A Novel Cytokine Modulator Containing a 2-Oxazolidinone Ring Produced by *Streptomyces* sp. In: *Journal of Organic Chemistry*, Jg. 64, H. 3, S. 1052-1053.
- Karaman, R.; Goldblum, A.; Breuer, E.; Leader, H. (1989): Acylphosphonic Acids And Methyl Hydrogen Acylphosphonates - Physical And Chemical-Properties And Theoretical Calculations. In: *Journal of The Chemical Society-Perkin Transactions 1*, H. 4, S. 765-774.
- Kiasat, A. R.; Badri, R.; Sayyahi, S. (2009): Polymer Supported Cyanide as an Efficient Catalyst in Benzoin Condensation: An Efficient Route to alpha-Hydroxy Carbonyl Compounds. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Jg. 30, H. 5, S. 1164-1166.
- Kihumbu, D. (2007): Stereoselektive Diolsynthese mit Lyasen und Oxidoreduktasen – Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens. Dissertation. Betreut von C. Wandrey. Bonn. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Biotechnologie. Online verfügbar unter http://hss.ulb.unibonn.de/diss_online/.
- Kihumbu, D.; Stillger, T.; Hummel, W.; Liese, A. (2002): Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol. In: *Tetrahedron-Asymmetry*, Jg. 13, H. 10, S. 1069-1072.
- Kitamura, Y.; Itoh, T. (1987): Reaction Volume of Protonic Ionization For Buffering Agents - Prediction of Pressure-Dependence of Ph And Poh. In: *Journal of Solution Chemistry*, Jg. 16, H. 9, S. 715-725.
- Kneen, M. M.; Pogozeva, I. D.; Kenyon, G. L.; McLeish, M. J. (2005): Exploring the *active site* of benzaldehyde lyase by modeling and mutagenesis. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics*, Jg. 1753, H. 2, S. 263-271.
- Knight, R. L.; Leeper, F. J. (1998): Comparison of chiral thiazolium and triazolium salts as asymmetric catalysts for the benzoin condensation. In: *Journal of The Chemical Society-Perkin Transactions 1*, H. 12, S. 1891-1894.
- Knoll, M.; Müller, M.; Pleiss, J.; Pohl, M. (2006): Factors mediating activity, selectivity, and substrate specificity for the thiamin diphosphate-dependent enzymes benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase. In: *Chembiochem*, Jg. 7, H. 12, S. 1928-1934.
- Kobori, Y.; Myles, D. C.; Whitesides, G. M. (1992): Substrate Specificity and Carbohydrate Synthesis Using Transketolase. In: *Journal of Organic Chemistry*, Jg. 57, H. 22, S. 5899-5907.

- Koike, T.; Murata, K.; Ikariya, T. (2000): Stereoselective Synthesis of Optically Active α -Hydroxy Ketones and anti-1,2-Diols via Asymmetric Transfer Hydrogenation of Unsymmetrically Substituted 1,2-Diketones. In: *Organic Letters*, Jg. 24, H. 2, S. 3833–3836.
- Koolman, J.; Röhm, K. H. (1997): *Taschenatlas der Biochemie*. 2. Aufl. 1 Bände. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kube, J.; Brokamp, C.; Machielsen, R.; van der Oost, J.; Märkl, H. (2006): Influence of temperature on the production of an archaeal thermoactive alcohol dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus* with recombinant *Escherichia coli*. In: *Extremophiles*, Jg. 10, S. 221–227.
- Kuboki, A.; Yamamoto, T.; Taira, M.; Arishige, T.; Ohira, S. (2007): Total synthesis of ($\pm$)-nitidanin and novel procedures for determination of the location of the side chains on 1,4-benzodioxane. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 48, H. 5, S. 771–774.
- Kurlemann, N.; Liese, A. (2004): Immobilization of benzaldehyde lyase and its application as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of a chiral 2-hydroxy ketone. In: *Tetrahedron-Asymmetry*, Jg. 15, H. 18, S. 2955–2958.
- Lee, L. G.; Whitesides, G. M. (1986): Preparation of Optically Active 1,2-Diols and α -Hydroxy Ketones Using Glycerol Dehydrogenase as Catalyst: Limits to Enzyme-Catalyzed Synthesis due to Noncompetitive and Mixed Inhibition by Product. In: *Journal of Organic Chemistry*, Jg. 51, H. 1, S. 25–36.
- Lehninger, Albert L; Nelson, David L; Cox, Michael M (2005): *Principles of biochemistry*. 4. ed., 6. print. New York, NY: Freeman.
- Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. (2006): *Industrial biotransformations*. 2., completely rev. and extended ed. Weinheim: Wiley-VCH.
- Lingen, B.; Kolter-Jung, D.; Dünkemann, P.; Feldmann, R.; Grötzinger, J.; Pohl, M.; Müller, M. (2003): Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution. In: *Chembiochem*, Jg. 4, H. 8, S. 721–726.
- Lingen, B.; Pohl, M.; Demir, A. S.; Liese, A.; Müller, M. (2004): Enantioselective Synthesis of Hydroxy Ketones via Benzoylformate Decarboxylase- and Benzaldehyde Lyase- Catalyzed C-C Bond Formation. In: Jordan, F.; Patel, M. S.: *Thiamine. Catalytic mechanisms in normal and disease states*. New York: Marcel Dekker (Oxidative stress and disease), S. 113–130.
- Lummer, K.; Rieks, A.; Galunsky, B.; Kasche, V. (1999): pH dependence of penicillin amidase enantioselectivity for charged substrates. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology*, Jg. 1433, H. 1-2, S. 327–334.
- Mann, S.; Melero, C. P.; Hawksley, D.; Leeper, F. J. (2004): Inhibition of thiamin diphosphate dependent enzymes by 3-deazathiamin diphosphate. In: *Organic & Biomolecular Chemistry*, Jg. 2, H. 12, S. 1732–1741.
- Marchal, S.; Torrent, J.; Masson, P.; Kornblatt, J. M.; Tortora, P.; Fusi, P. et al. (2005): The powerful high pressure tool for protein conformational studies. In: *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*, Jg. 38, H. 8, S. 1175–1183.
- Dominguez de Maria, P.; Stillger, T.; Pohl, M.; Wallert, S.; Drauz, K.; Gröger, H. et al. (2006): Preparative enantio selective synthesis of benzoin and (R)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, Jg. 38, H. 1, S. 43–47.

- Michaelis, A.; Kaehne, R. (1898): Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, Jg. 31, S. 1048–1055.
- Monsanto (2009): Roundup/Glyphosate Background Materials. Herausgegeben von Monsanto Company. Online verfügbar unter www.monsanto.com.
- Mosbacher, T. G.; Müller, M.; Schulz, G. E. (2005): Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. In: *Febs Journal*, Jg. 272, H. 23, S. 6067–6076.
- Myles, D. C.; Andrulis, P. J.; Whitesides, G. M. (1991): A transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicomine. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 32, H. 37, S. 4835–4838.
- Müller, M.; Gocke, D.; Pohl, M. (2009): Thiamin diphosphate in biological chemistry: exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis. In: *Febs Journal*, Jg. 276, H. 11, S. 2894–2904.
- Nemeria, N.; Chakraborty, S.; Baykal, A.; Korotchkina, L. G.; Patel, M. S.; Jordan, F. (2007): The 1',4'-iminopyrimidine tautomer of thiamin diphosphate is poised for catalysis in asymmetric active centers on enzymes. In: *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, Jg. 104, H. 1, S. 78–82.
- Nemeria, N. S.; Chakraborty, S.; Balakrishnan, A.; Jordan, F. (2009): Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: defining states of ionization and tautomerization of the cofactor at individual steps. In: *Febs Journal*, Jg. 276, H. 9, S. 2432–2446.
- Neuberg, C.; Hirsch, J. (1921): Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase). In: *Biochemische Zeitung*, Jg. 115, S. 282–310.
- Neuman, R. C.; Kauzmann, W.; Zipp, A. (1973): Pressure-Dependence of Weak Acid Ionization In Aqueous Buffers. In: *Journal of Physical Chemistry*, Jg. 77, H. 22, S. 2687–2691.
- Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. (2006): Chiral Drugs. An Overview. In: *International Journal of Biomedical Science*, Jg. 2, H. 2, S. 85–100.
- Niemeyer, B.; Jansen, J. (2007): An innovative approach for sorptive separation of amphiphilic biomolecules applying high hydrostatic pressure. In: *Journal of Supercritical Fluids*, Jg. 39, H. 3, S. 354–361.
- O'Brien, T. A.; Kluger, R.; Pike, D. C.; Gennis, R. B. (1980): Phosphonate Analogues of Pyruvate. In: *Biochimica Et Biophysica Acta*, Jg. 613, S. 10–17.
- Okada, H.; Mori, T.; Saikawa, Y.; Nakata, M. (2009): Formation of α -hydroxyketones via irregular Wittig reaction. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 50, H. 12, S. 1276–1278.
- Ornston, L. N.; Stanier, R. Y. (1966): The Conversion of Catechol and Protocatechuate to beta-Ketoadipate by *Pseudomonas putida*. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 241, H. 16, S. 3776–3786.
- Panke, S.; Wubbolts, M. (2005): Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. In: *Current Opinion In Chemical Biology*, Jg. 9, H. 2, S. 188–194.
- Patel, R. N. (2004): Biocatalytic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. In: *Food Technology And Biotechnology*, Jg. 42, H. 4, S. 305–325.
- Pohl, M.; Lingen, B.; Müller, M. (2002): Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: New aspects of asymmetric C-C bond formation. In: *Chemistry-A European Journal*, Jg. 8, H. 23, S. 5289–5295.

- Pohl, M.; Liese, A. (2007, erschienen 2006): Industrial Processes Using Lyases for C-C, C-N and C-O Bond Formation. In: Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries. Editor: Patel, R. N., Boca Raton, FL: CRC Press, Kapitel 27, S. 661-676.
- Polovnikova, E. S.; McLeish, M. J.; Sergienko, E. A.; Burgner, J. T.; Anderson, N. L.; Bera, A. K. et al. (2003): Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. In: Biochemistry, Jg. 42, H. 7, S. 1820-1830.
- Raghuraman, B.; Gustavson, G.; Mullins, O. C.; Rabbito, P. (2006): Spectroscopic pH measurement for high temperatures, pressures and ionic strength. In: Aiche Journal, Jg. 52, H. 9, S. 3257-3265.
- Russell, G. F.; Hills, J. I. (1971): Odor Differences between Enantiomeric Isomers. In: Science, Jg. 172, S. 1043-1044.
- Schenk, G.; Duggleby, R. G.; Nixon, P. F. (1998): Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. In: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Jg. 30, H. 12, S. 1297-1318.
- Schörken, U.; Sprenger, G. A. (1998): Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. In: Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology, Jg. 1385, H. 2, S. 229-243.
- Seifert, F.; Golbik, R.; Brauer, J.; Lilie, H.; Schröder-Tittmann, K.; Hinze, E. et al. (2006): Direct kinetic evidence for half-of-the-sites reactivity in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex through alternating sites cofactor activation. In: Biochemistry, Jg. 45, H. 42, S. 12775-12785.
- Sergienko, E. A.; Wang, J.; Polovnikova, L.; Hasson, M. S.; McLeish, M. J.; Kenyon, G. L.; Jordan, F. (2000): Spectroscopic detection of transient thiamin diphosphate-bound intermediates on benzoylformate decarboxylase. In: Biochemistry, Jg. 39, H. 45, S. 13862-13869.
- Siebert, P. (2000): Vergleichende Charakterisierung der Decarboxylase- und Carboligasereaktion der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* und der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* mittels gerichteter Mutagenese. Dissertation. Düsseldorf. Heinrich-Heine-Universität, Institut für Enzymtechnologie.
- Siebert, P.; McLeish, M. J.; Baumann, M.; Iding, H.; Kneen, M. M.; Kenyon, G. L.; Pohl, M. (2005): Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. In: Protein Engineering Design & Selection, Jg. 18, H. 7, S. 345-357.
- Sprenger, G. A.; Pohl, M. (1999): Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. In: Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, Jg. 6, H. 3, S. 145-159.
- Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; Graaf, A. A. de; Taylor, S. V. et al. (1997): Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. In: Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, Jg. 94, H. 24, S. 12857-12862.
- Stermitz, F. R.; Lorenz, P.; Tawara, J. N.; Zenewicz, L. A.; Lewis, K. (2000): Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. In: Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, Jg. 97, H. 4, S. 1433-1437.

- Stillger, T. (2004): Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen. Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I. Dissertation. Betreut von Prof. Dr. C. Wandrey. Jülich. Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 2.
- Stillger, T.; Pohl, M.; Wandrey, C.; Liese, A. (2006): Reaction engineering of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* catalyzing enantioselective C-C bond formation. In: *Organic Process Research & Development*, Jg. 10, H. 6, S. 1172-1177.
- Taylor, S. V.; Vu, L. D.; Begley, T. P.; Schörken, U.; Grolle, S.; Sprenger, G. A. et al. (1998): Chemical and Enzymatic Synthesis of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate. In: *Journal of Organic Chemistry*, Jg. 63, H. 7, S. 2375-2377.
- Topal, K. G.; Atilgan, C.; Demir, A. S.; Aviyente, V. (2010): Understanding the Mode of ThDP in Benzoylformate Decarboxylase. In: *Biopolymers*, Jg. 93, H. 1, S32-46.
- Toukoniitty, E.; Mäki-Arvela, P.; Kuzma, M.; Villela, A.; Neyestanaki, A. K.; Salmi, T. et al. (2001): Enantioselective Hydrogenation of 1-Phenyl-1,2 propanedione. In: *Journal of Catalysis*, Jg. 204, H. 2, S. 281-291.
- Tschirret-Guth, R. A.; Koo, L. S.; Hoa, G. H. B.; Montellano, P. R. O. de (2001): Reversible pressure deformation of a thermophilic cytochrome P450 enzyme (CYP119) and its active-site mutants. In: *Journal of The American Chemical Society*, Jg. 123, H. 15, S. 3412-3417.
- Turner, S. R.; Strohbach, J. W.; Tommasi, R. A.; Aristoff, P. A.; Johnson, P. D.; Skulnick, H. I. et al. (1998): Tipranavir (PNU-140690): A potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, Jg. 41, H. 18, S. 3467-3476.
- USDA (2007): USDA. Herausgegeben von United States Department of Agriculture. Online verfügbar unter www.usda.gov.
- Utsukihara, T.; Nakamura, H.; Watanabe, M.; Horiuchi, C. A. (2006): Microwave-assisted synthesis of alpha-hydroxy ketone and alpha-diketone and pyrazine derivatives from alpha-halo and alpha,alpha dibromo ketone. In: *Tetrahedron Letters*, Jg. 47, H. 52, S. 9359-9364.
- van der Plancken, I.; Delattre, M.; Indrawati; van Loey, A.; Hendrickx, M. E. G. (2004): Kinetic study on the changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis induced by heat and high hydrostatic pressure pretreatment. In: *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, Jg. 52, H. 18, S. 5621-5626.
- van Dijken, J. P.; Harder, W.; Beardsmore, A. J.; Quayle, J. R. (1978): Dihydroxyacetone: an intermediate in the assimilation of methanol by yeasts? In: *FEMS Microbiology Letters*, Jg. 4, H. 2, S. 97-102.
- Vazquez-Perez, A. R.; Fernandez-Velasco, D. A. (2007): Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: The monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. In: *Biochemistry*, Jg. 46, H. 29, S. 8624-8633.
- Gerd (Hg.). Weinheim: VCH.
- Weiss, P. M.; Garcia, G. A.; Kenyon, G. L.; Cleland, W. W.; Cook, P. F. (1988): Kinetics And Mechanism of Benzoylformate Decarboxylase Using C-13 And Solvent Deuterium-Isotope Effects On Benzoylformate And Benzoylformate Analogs. In: *Biochemistry*, Jg. 27, H. 6, S. 2197-2205.
- Wilcocks, R.; Ward, O. P. (1992): Factors Affecting 2-Hydroxypropiophenone Formation By Benzoylformate Decarboxylase From *Pseudomonas-Putida*. In: *Biotechnology And*

- Bioengineering, Jg. Wagner, W.; Pruß, A. (2002): The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use. In: Journal of Physical And Chemical Reference Data, Jg. 31, H. 2, S. 387–535.
- Wedler, G. (1985): Lehrbuch der physikalischen Chemie. 2. bearbeitete und erweiterte Auflage. Wedler, 39, H. 10, S. 1058-1063.
- Wilcocks, R.; Ward, O. P.; Collins, S.; Dewdney, N. J.; Hong, Y. P.; Prosen, E. (1992): Acyloin Formation By Benzoylformate Decarboxylase From Pseudomonas-Putida. In: Applied And Environmental Microbiology, Jg. 58, H. 5, S. 1699-1704.
- Wille, G.; Meyer, D.; Steinmetz, A.; Hinze, E.; Golbik, R.; Tittmann, K. (2006): The catalytic cycle of a thiamin diphosphate enzyme examined by cryocrystallography. In: Nature Chemical Biology, Jg. 2, H. 6, S. 324-328.
- Wolffenbittel, B. H. R.; Graal, M. B. (1996): New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. In: Postgraduate Medical Journal, Jg. 72, H. 853, S. 657-662.
- Yanase, H.; Okuda, M.; Kita, K.; Sato, Y.; Shibata, K.; Sakai, Y.; Kato, N. (1995): Enzymatic preparation of [1,3-¹³C Dihydroxyacetone Phosphate from [¹³C] Methanol and Hydroxypyruvate using methanol-assimilating system of methylotropic yeasts. In: Applied Microbiology and Biotechnology, Jg. 43, H. 2, S. 228–234.
- Yep, A.; Kenyon, G. L.; McLeish, M. J. (2008): Saturation mutagenesis of putative catalytic residues of benzoylformate decarboxylase provides a challenge to the accepted mechanism. In: Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, Jg. 105, H. 15, S. 5733-5738.
- Zhao, R.; Gao, F.; Goldman, D. (2001): Molecular cloning of human thiamin pyrophosphokinase. In: Biochimica Et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression, Jg. 1517, H. 2, S. 320–322.