

Inhaltsverzeichnis

1.	Vorbemerkungen und Abkürzungen	13
1.1.	Vorbemerkungen	13
1.2.	Abkürzungen	13
2.	Abstract	17
2.1.	Development of the selectivity screening.....	17
2.2.	DERA from <i>E. coli</i>	18
2.3.	Characterization of new DERAs.....	18
2.4.	Biocatalytic usage of the DERA	19
2.5.	Assignment of the screening results to unlabeled substrates.....	20
3.	Einleitung und Ziele.....	22
3.1.	Einleitung.....	22
3.2.	Ziele der Arbeit.....	23
4.	Kenntnisstand	25
4.1.	Enzymkatalyse	25
4.1.1.	Enzyme - eine Übersicht.....	25
4.2.	Aldolasen	26
4.2.1.	Dihydroxyaceton-abhängige Aldolasen.....	29
4.2.2.	Pyruvat-abhängige Aldolasen.....	29
4.2.3.	Glycin-abhängige Aldolasen	31
4.2.4.	Acetaldehyd-abhängige Aldolase	32
4.2.5.	Biokatalytische Anwendung der DERA	37
4.3.	Mutagenese.....	43
4.3.1.	Zufallsmutagenese	44
4.3.2.	Gerichtete Mutation	44
4.3.3.	Umkehr der Stereoselektivität	45
4.4.	Enzymscreening.....	49
4.4.1.	Screenings auf Basis von Farbveränderungen.....	49
4.4.2.	UV/VIS-Screenings.....	50
4.4.3.	Fluoreszenz-basiertes Screening	52
5.	Eigene Ergebnisse	57

5.1.	Etablierung des Selektivitätsscreenings	57
5.1.1.	Synthese der Screeningsubstanzen	57
5.1.2.	Etablierung des Screeningssystems	60
5.2.	DERA aus <i>E. coli</i>	63
5.2.1.	Klonierung und Reinigung	63
5.2.2.	Mutanten zur Inversion der Stereoselektivität	67
5.2.3.	<i>Docking</i> -Studien	80
5.3.	Klonierung und Charakterisierung neuer DERAs	89
5.3.1.	Identifizierung und Sequenzvergleiche	89
5.3.2.	Klonierung, Expression und Reinigung	93
5.3.3.	Charakterisierung der DERA _{RE}	99
5.4.	Anwendung der DERA als Biokatalysator	105
5.4.1.	Synthese von Referenzsubstanzen	105
5.4.2.	Aufbau der Enantiomerenanalytik	106
5.4.3.	Synthese eines Goniotalamin-Analogons	111
5.4.4.	Bereitstellung eines Bausteins für die Synthese von Strictifolion-Derivaten	113
5.5.	Übertragung der Screening Ergebnisse auf Synthese-Substrate	116
6.	Zusammenfassung und Ausblick	123
6.1.	Etablierung des Selektivitätsscreenings	123
6.2.	DERA aus <i>E. coli</i>	124
6.3.	Mutantenerstellung und Screening	124
6.4.	Klonierung und Charakterisierung neuer DERAs	129
6.5.	Anwendung der DERA als Biokatalysator	132
6.5.1.	Aufbau der Enantiomerenanalytik	133
6.5.2.	Anwendung Übersicht	134
6.5.3.	Goniotalamin	134
6.5.4.	Strictifolion-Diastereomere	136
6.5.5.	Weitere Naturstoffsynthesen	137
6.6.	Übertragung der Screeningergebnisse	138
7.	Experimentalteil	143
7.1.	Allgemeines	143
7.1.1.	Chemikalien und Glasgeräte	143
7.1.2.	Verwendete Software	143

7.1.3.	Chromatographie	143
7.1.4.	Drehwerte	144
7.1.5.	Massenspektrometrie	144
7.1.6.	NMR-Spektroskopie	144
7.1.7.	Infrarotspektroskopie.....	145
7.1.8.	Gaschromatographie.....	145
7.1.9.	HPLC-Analytik	145
7.2.	Allgemeine Synthesevorschriften	145
7.2.1.	Allgemeine Vorschrift Dihydroxylierung (Allg. Vorschrift 1)	145
7.2.2.	Reagenz zur Periodatspaltung.....	146
7.2.3.	Periodatspaltung (Allg. Vorschrift 2)	146
7.2.4.	Grignard Allyladdition (Allgemeine Vorschrift 3)	146
7.3.	Synthese eines DERA-Substrats.....	146
7.3.1.	Darstellung des Triethylsilyl-geschützten Aldehyds	146
7.4.	Referenzsubstanzen für die Aldolreaktion mit 3-Phenylpropanal.....	148
7.4.1.	1-Phenyl-hex-5-en-3-ol (rac-51)	148
7.4.2.	6-Phenylhexan-1,2,4-triol (rac-55)	149
7.4.3.	3-Hydroxy-5-phenylpentanal (rac-8).....	150
7.4.4.	5-Phenylpentan-1,3-diol (rac-53)	150
7.4.5.	1-Phenyloct-7-en-3,5-diol (rac-52)	151
7.4.6.	3,5-Dihydroxy-7-phenylheptanal (rac-7).....	152
7.4.7.	7-Phenylheptan-1,3,5-triol (rac-54)	152
7.5.	Substrate für das Fluoreszenzscreening.....	153
7.5.1.	α,β -Methyl-2-Desoxyribofuranosid (48)	153
7.5.2.	Methyl-5O-toluolsulfonyl-2-Desoxyribofuranosid (15).....	154
7.5.3.	Fluoreszente Screening-Substrate 4	154
7.5.4.	Xylosubstrate	156
7.6.	Enzymreaktionen.....	160
7.6.1.	3-Phenylpropanal – Reaktion 1 - Generierung 3,5-Dihydroxy-7-phenylheptanal (7).....	160
7.6.2.	3-Phenylpropanal – Reaktion 2 - Generierung 3-Hydroxy-5-phenylpentanal (8)	160
7.7.	Folgereaktionen	161
7.7.1.	Lacton-Synthese (63).....	161
7.7.2.	Goniothalamine-Derivat – 6-Phenethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (9)	162
7.7.3.	Vorstufe zu Strictifolion-Diastereomeren	163
7.8.	Untersuchung der Stereoselektivität	164
7.8.1.	3-Phenylpropanal als Substrat	164
7.8.2.	Propanal als Substrat – 3,5-Dihydroxyoctanal (81)	164

7.8.3.	4-Hydroxy-6-propyltetrahydro-2H-pyran-2-on (67)	165
7.9.	Molekularbiologische Arbeiten – Material und Methoden	167
7.9.1.	Geräte	167
7.9.2.	Chemikalien und Enzyme	168
7.9.3.	Bakterienstämme	169
7.9.4.	Plasmide	169
7.9.5.	Verwendete Oligonukleotide	171
7.9.6.	Sequenzierungen	172
7.9.7.	Stammlösungen und Medien	173
7.9.8.	DNA- und Proteinstandards	173
7.10.	Mikrobiologische Arbeiten	174
7.10.1.	Kultivierung von Bakterienstämmen	174
7.10.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	174
7.10.3.	Transformation von <i>E. coli</i>	174
7.10.4.	Induzierte Genexpression	174
7.11.	DNA-Techniken	175
7.11.1.	Plasmidisolierung	175
7.11.2.	DNA-Fällung	175
7.11.3.	DNA-Konzentrationsbestimmungen	175
7.11.4.	Agarosegelelektrophorese	175
7.11.5.	Gelelution von DNA	176
7.11.6.	Restriktion mit Restriktionsendonukleasen	176
7.11.7.	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	176
7.11.8.	Aufreinigung von PCR-Produkten	183
7.11.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	183
7.12.	Proteintechniken	183
7.12.1.	Zellaufschluss zur Proteinisolierung	183
7.12.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	183
7.12.3.	Aktivitätsbestimmung von DERA's	184
7.12.4.	Selektivitätsscreening von DERA's	185
7.12.5.	TCA-Fällung	185
7.12.6.	SDS-PAGE	185
7.12.7.	Silberfärbung	186
7.12.8.	Coomassiefärbung	187
7.12.9.	Proteinreinigung	187
7.12.10.	Größenausschlusschromatographie	188
7.12.11.	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	188

7.12.12.	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen mit PD10-Säulen	188
8.	Literatur	189
9.	Formelregister	201
9.1.	Verwendete Katalysatoren und Reagenzien	201
9.2.	Synthese eines DERA-Substrats.....	201
9.3.	Screeningsubstrate.....	201
9.4.	Synthese der Xylose-Screeningsubstanz	202
9.5.	Referenzsubstanzen und Produkte der Enzymreaktionen	202
9.6.	Synthese eines Goniotalamin-Analogons	202
9.7.	Synthese von Strictifolion-Derivaten	202
10.	Anhang.....	203
10.1.	Plasmidkarten und Sequenzen	203
10.1.1.	DERA _{EC}	203
10.1.2.	DERA _{LA}	205
10.1.3.	DERA _{PA}	206
10.1.4.	DERA _{RE}	207
10.1.5.	DERA _{TM}	208
10.2.	Alignment für die Energierechnung	209
10.3.	MALDI-Daten	211
10.4.	Script für die <i>Docking</i> -Studien	212
11.	Danksagung	213
12.	Erklärung.....	215