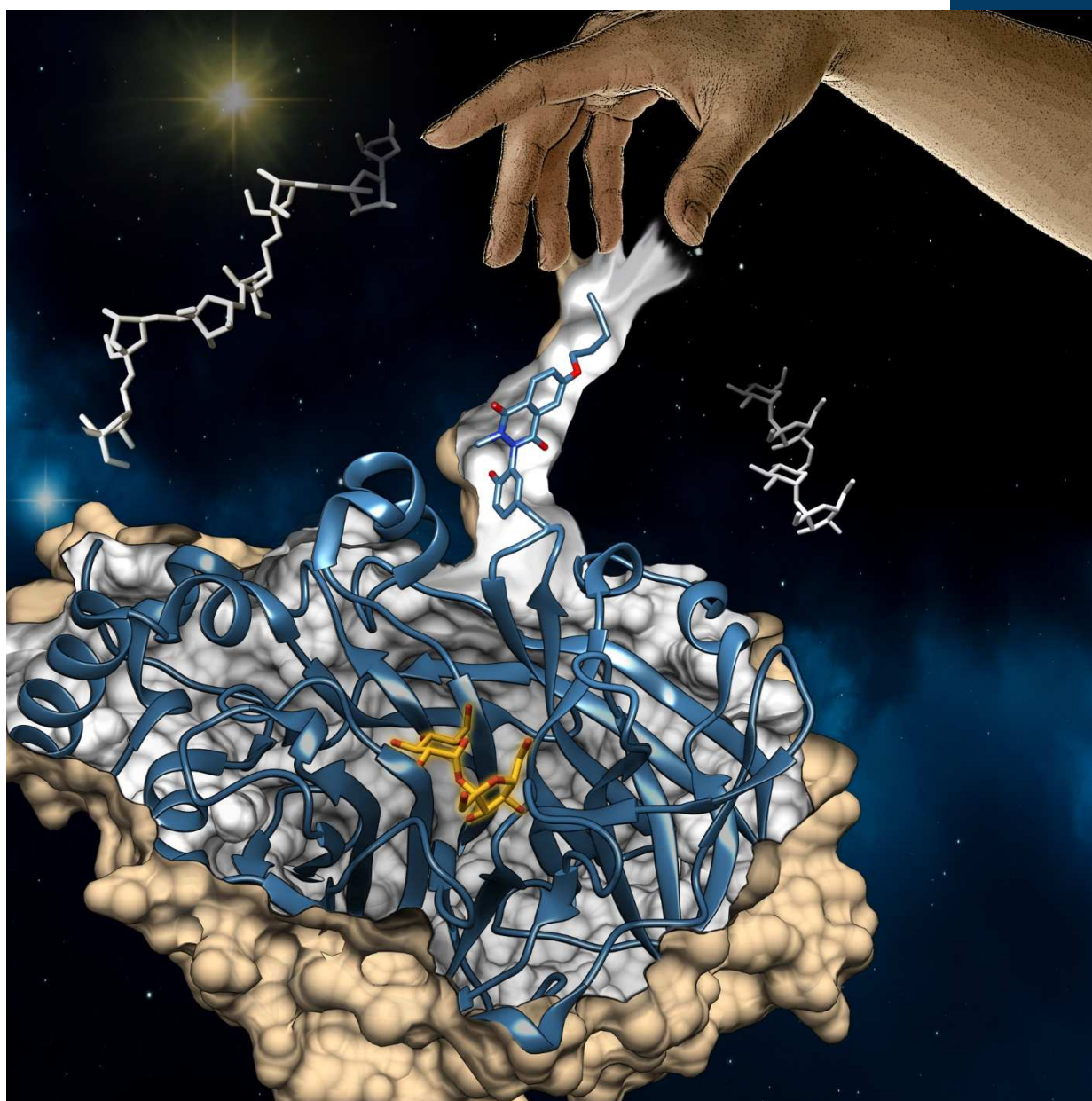


BIOORTHOGONALE CHEMISCHE MODIFIKATION
DER *Bm*-LEVANSUCRASE ZUR RATIONALEN
ANPASSUNG DER PRODUKTSPEZIFITÄT



Dissertation

von **Julia Andrea Ertl**

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



Cover Feature: Tuning the Product Spectrum of a Glycoside Hydrolase Enzyme by a Combination of Site-Directed Mutagenesis and Tyrosine-Specific Chemical Modification (Chem. Eur. J. 26/2019)^[1]

Bioorthogonale chemische Modifikation der *Bm*-Levansucrase zur rationalen Anpassung der Produktspezifität



Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Julia Andrea Ertl

Aus Biberach an der Riß

Würzburg 2020

eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

27. April 2020

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Seibel
2. Gutachter: Prof. Dr. Claudia Höbartner

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Seibel
2. Prüfer: Prof. Dr. Claudia Höbartner
3. Prüfer: Prof. Dr. Anke Krüger

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: 30. Juni 2020

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2017 bis April 2020 am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Jürgen Seibel angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Ortiz-Soto, M. E.; **Ertl, J.**; Mut, J.; Adelman, J.; Le, T. A.; Shan, J.; Teßmar, J.; Schlosser, A.; Engels, B.; Seibel, J. Product-oriented chemical surface modification of a levansucrase (SacB) via an ene-type reaction. *Chemical Science* **2018**, 9 (24), 5312.

Ertl, J.; Ortiz-Soto, M. E.; Le, T. A.; Bechold, J.; Shan, J.; Teßmar, J.; Engels, B.; Seibel, J. Tuning the Product Spectrum of a Glycoside Hydrolase Enzyme by a Combination of Site-Directed Mutagenesis and Tyrosine-Specific Chemical Modification. *Chemistry - A European Journal* **2019**, 25 (26), 6533.

Possiel, C.; Ortiz-Soto, M. E.; **Ertl, J.**; Münch, A.; Vogel, A.; Schmiedel, R.; Seibel, J. Exploring the sequence variability of polymerization-involved residues in the production of levan- and inulin-type fructooligosaccharides with a levansucrase. *Scientific Reports* **2019**, 9 (1), 7720.

weitere Veröffentlichung:

Klenk, J. M.; **Ertl, J.**; Rapp, L.; Fischer, M.-P.; Hauer, B. Expression and characterization of the benzoic acid hydroxylase CYP199A25 from *Arthrobacter* sp. *Molecular Catalysis* **2020**, *484*, 110739.

Konferenzen und Tagungsbeiträge:

Ertl, J.; Ortiz-Soto, M. E.; Seibel, J., „Carbohydrate Biocatalysis - Mini Symposium“, Mexiko Cuernavaca UNAM **2018**

Ertl, J.; Ortiz-Soto, M. E.; Mut, J.; Adelman, J.; Le, T. A.; Shan, J.; Teßmar, J.; Schlosser, A.; Engels, B.; Seibel, J. „29th International Carbohydrate Symposium (ICS 2018)“, Lissabon **2018**, Vortrag

Ertl, J.; Ortiz-Soto, M. E.; Mut, J.; Adelman, J.; Le, T. A.; Shan, J.; Teßmar, J.; Schlosser, A.; Engels, B.; Seibel, J. „Galenus-Workshop“, Würzburg **2018**, Vortrag

Ertl, J.; Ortiz-Soto, M. E.; Le, T. A.; Shan, J.; Teßmar, J.; Engels, B.; Seibel, J. „57. Naturstoff-treffen“, Jena **2019**, Vortrag

Danksagung

Vielen herzlichen Dank an alle Freunde und Mitmenschen, die mich auf meinem bisherigen Weg und im Laufe dieser Arbeit begleitet, unterstützt und ermutigt haben.

Besonders danken möchte ich *Herrn Prof. Dr. Jürgen Seibel* für die hervorragende Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit und für die Bereitstellung dieses vielseitigen und herausfordernden Themas. Vielen Dank für die vielen interessanten und hilfreichen Diskussionen, die überlassene Freiheit beim Bearbeiten der Dissertation sowie die Möglichkeit an internationalen Kooperationen und Konferenzen in Mexiko und Lissabon teilzunehmen.

Bei meinen Kooperationspartnern möchte ich mich ganz herzlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Danke *Thien Anh Le* und *Prof. Dr. Bernd Engels* für die spannenden Einblicke in die Theoretische Chemie und die hilfreichen Besprechungen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Organische Chemie, der NMR-Abteilung und der MS-Abteilung, die mich während meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben. Der Dank gilt insbesondere *Juliane Adelman*, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danke auch an *Maria Ortiz-Soto* für die Einführung in mein Projekt, die stetige Unterstützung durch Ratschläge und gemeinsame Diskussionen und die gelungene Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten. An dieser Stelle gilt mein Dank auch *Malte Timm* für die wertvollen Tipps und Hilfestellungen im Biolabor.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unseres Arbeitskreises danke ich herzlich für ihre hilfreichen Anregungen und die freundliche und offene Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank *Christine Sternstein*, *Jürgen Mut*, *Christian Possiel* und *Julian Bechold* für eure Hilfestellung oder Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Bachelorstudentinnen *Angela Münch* und *Nadine Müller* für ihre Mitarbeit und ihr Engagement in verschiedenen Abschnitten dieser Arbeit. Für eure weitere wissenschaftliche Laufbahn wünsche ich euch alles Gute.

Ein großer Dank gilt auch meinen lieben Freunden *Sabine Reising, Julian Fink* und *Natalia Wolf* für die vielen schönen und unvergesslichen Stunden sowohl während der Arbeitszeit als auch während vielen gemeinsamen Abenden darüber hinaus. Danke für eure Hilfe, Ratschläge und fachliche sowie moralische Unterstützung. Neben den vielen Zuckermolekülen, die ich hergestellt habe, habt vor allem ihr mir die Zeit während meiner Promotion versüßt.

Ein besonderer Dank geht an meine *Eltern* für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke, dass ihr immer an uns glaubt und uns jeden erdenklichen Weg ermöglicht habt. Eure Liebe und Fürsorge ermutigen mich immer weiterzumachen.

Liebe *Michaela* und liebe *Larissa*, ich empfinde tiefste Dankbarkeit dafür euch als Schwestern zu haben. Mit euch teile ich jede Freude und jedes Leid, ihr begleitet mich auf jedem Weg und steht immer hinter mir.

Mein größter Dank gilt dir lieber *Felix*. Dich an meiner Seite zu haben und zu wissen, dass du immer für mich da bist gibt mir den größten Rückhalt und macht mich jeden Tag glücklich und zuversichtlich. Danke für deine Liebe, deine bedingungslose Unterstützung und dein Verständnis in jeder denkbaren Situation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	2
2.1	Levansucrase und Levan	2
2.2	Chemische Protein-Modifikation	10
2.3	Click-Chemie	16
2.4	Photo-Biokatalyse	19
3	Zielsetzung	21
4	Ergebnisse und Diskussion	23
4.1	Selektive Tyrosin-spezifische Modifikation der <i>Bm</i>-Levansucrase	23
4.1.1	Entwicklung einer selektiven Modifikationsmethode an nativen Tyrosinen	23
4.1.2	Gezielte Inkorporierung und Modifikation nicht-nativer Tyrosine	42
4.2	Synthese und Isolation von 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose	56
4.3	Entwicklung einer photo-biokatalysierten Kaskaden-Reaktion	64
4.3.1	Expression und Charakterisierung der Halogenasen mit einem Co-Faktor-Regenerationssystem	65
4.3.2	Synthese eines clickbaren Photokatalysators	67
5	Zusammenfassung	73
6	Summary	79
7	Material und Methoden	85
7.1	Geräte	85
7.2	Material	86
7.2.1	Verbrauchsmaterial und Kits.....	86
7.2.2	Chemikalien.....	87
7.2.3	Enzyme	87
7.2.4	Verwendete Mikroorganismen	87
7.2.5	Verwendete Plasmide	87
7.2.6	Verwendete Oligonukleotide/Primer	88
7.2.7	Kulturmedien.....	89
7.2.8	Puffer und Lösungen	90
7.3	Molekularbiologische Methoden	92
7.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	92
7.3.2	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	93
7.3.3	DNA-Sequenzierung	93
7.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	93

7.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	94
7.3.6	QuikChange® - Ortsgerichtete Mutagenese.....	95
7.3.7	„Round-the-horn“ - Ortsgerichtete Mutagenese.....	96
7.3.8	Restriktionsverdau mit Restriktionsenzymen	98
7.3.9	Ligation von DNA Fragmenten	98
7.4	Mikrobiologische Methoden.....	98
7.4.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	98
7.4.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	99
7.4.3	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	99
7.4.4	Kultivierung von <i>Hansenula polymorpha</i>	100
7.4.5	Immobilisierung von <i>Hansenula polymorpha</i>	100
7.5	Biochemische Methoden	101
7.5.1	Proteinaufreinigung	101
7.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	101
7.5.3	Aktivitätstest und Bestimmung kinetischer Parameter	102
7.5.4	Bestimmung des optimalen pH-Wertes für Levansucrase-Enzyme	103
7.5.5	Tyrosin-spezifische Modifikations-Reaktion	103
7.5.6	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditions-Reaktion (CuAAC)	103
7.5.7	Differential Scanning Fluorimetry (DSF).....	103
7.6	Bioinformatische Methoden	104
7.7	Chemisch-analytische Methoden	105
7.7.1	HPAEC-PAD Analyse des Produktprofils.....	105
7.7.2	Gel-Permeations-Chromatographie.....	106
7.7.3	HPLC und LC-MS Analytik	106
7.7.4	NanoLC-MS Analytik.....	107
7.7.5	NMR-Spektroskopie	108
7.8	Synthesevorschriften.....	108
7.8.1	Allgemeine Vorschrift zur Synthese clickbarer Peptide	108
7.8.2	Allgemeine Vorschrift zur Synthese und Isolation von 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose	112
7.8.3	Synthese von (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2,4,5,6-Tetrakis(3-brom-9 <i>H</i> -carbazol-9-yl)isophthalonitril	115
7.8.4	Synthese von 3-((Trimethylsilyl)ethynyl)-9 <i>H</i> -carbazol	116
7.8.5	Synthese von (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2,4,5,6-Tetrakis(3-((trimethylsilyl)ethynyl)-9 <i>H</i> -carbazol-9-yl)isophthalonitril	117
7.8.6	Synthese von (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2,4,5,6-Tetrakis(3-ethynyl-9 <i>H</i> -carbazol-9-yl)isophthalonitril	118
7.8.7	Synthese von 3-Azido-9 <i>H</i> -carbazol.....	119
7.8.8	Synthese von (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2,4,5,6-Tetrakis(3-azido-9 <i>H</i> -carbazol-9-yl)isophthalonitril	120
7.8.9	Synthese von Photokatalysator 16	121
7.8.10	Synthese von Photokatalysator 18	122
7.8.11	Allgemeine Vorschrift für die photokatalysierte decarboxylierende Alkylierung	123

<i>Literaturverzeichnis</i>	124
<i>Anhänge</i>	132
NMR-Spektren	132
Massenspektrometrie	141
Biochemische Trennungs-Verfahren (GPC, Dionex HPAEC-PAC)	158
DNA-Sequenzen	162
7.9 Vektorkarten	164
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	165
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	167
<i>Tabellenverzeichnis</i>	175

1 Einleitung

„Carbohydrates: The Sweet Molecules of Life“^[2]

So lautet der Buchtitel von Robert V. Stick über die Grundlagen der Kohlenhydratchemie. Kohlenhydrate sind jedoch nicht nur süß, sondern gehören vor allem zu den essenziellen Bausteinen des Lebens und dienen sowohl den Pflanzen als auch uns Menschen als Energiespeicher. Als Produkt der Photosynthese machen Kohlenhydrate etwa zwei Drittel der weltweiten Biomasse aus und stellen neben den Proteinen und Nucleinsäuren eine der drei größten Klassen biologischer Makromoleküle dar.^[3] Im Gegensatz zu den beiden anderen Klassen, die hauptsächlich linear aufgebaut sind und über nur eine Verknüpfungsmöglichkeit verfügen, können Kohlenhydrate hochverzweigt vorkommen und deren monomere Zuckereinheiten über unterschiedliche Bindungsarten verknüpft sein. Diese Komplexität ermöglicht eine nahezu unbegrenzte Vielfalt an Kohlenhydratstrukturen.^[4] Sie tragen somit einen großen Teil zur funktionellen Diversität bei und sind für die Entwicklung und Differenzierung komplexer Organismen und für deren Wechselwirkung mit anderen Organismen unerlässlich. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass Kohlenhydrate und glycosylierte Verbindungen in biologischen Systemen allgegenwärtig sind und bei zahlreichen spezifischen Erkennungsprozessen, u. a. bei der Immunabwehr, eine wichtige Rolle einnehmen.^[5] Daher ist für die Grundlagenforschung und für die Entwicklung neuer Medikamente der Zugang zu gezielt synthetisierten komplexen Glycoverbindungen von großer Bedeutung.^[6] Da ihre chemische Synthese oft sehr aufwendig oder nicht realisierbar ist, wird schon seit über 60 Jahren die chemo-enzymatische Synthese von glycosidischen Bindungen mit Hilfe von kohlenhydrataktiven Enzymen erforscht.^[7] Zu diesen Enzymen gehören unter vielen anderen auch die Levansucrasen, die den Transfer von Fructose-Einheiten auf ein Akzeptor-Molekül katalysieren. Als Produkt der Levansucrase entstehen Fructooligosaccharide (Levan), deren biologische Eigenschaften von dem Polymerisationsgrad, der Verzweigung und dem Verknüpfungstyp abhängen.^[8] Um einen Einfluss auf diese Produktvariabilität zu haben, ist die chemische oder gentechnische Manipulation der Enzymaktivität ein großer Bestandteil der aktuellen Forschung.^[9] Sowohl die chemische als auch die genetische Protein-Modifizierung ist in vielen unterschiedlichen Forschungsbereichen zu einem unschätzbar wertvollen Werkzeug des Protein-Engineering geworden und ermöglicht das rationale Design von Enzym-Eigenschaften, wie z. B. der Kinetik, der Substratspezifität und der Produktspezifität.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Levansucrase und Levan

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts wurde eine spezielle Art von Enzymen, mit strukturell verwandten und kohlenhydratbindenden Domänen, in die „CAZY“-Familie (Carbohydrate-Active EnZymes) eingeteilt. Alle dieser Familie zugeordneten Enzyme besitzen die Eigenschaft glycosidische Bindungen zu modifizieren, abzubauen oder neue Bindungen zu bilden (<http://www.cazy.org/>).^[10] Den Hauptteil dieser Enzymfamilie bilden die in Enzymklassen eingeteilten Glycosidasen (GH), Glycosyltransferasen (GT), Polysaccharid-Lyasen (PL), Kohlenhydrat-Esterasen (CE) und Auxiliary Activities (AA).^[11-14] Basierend auf ihrer Sequenzähnlichkeit wurden die Glycosidasen, auch Glycosid-Hydrolasen genannt, in 145 Familien untergegliedert, welche dann zu 14 Clans von GH-A bis GH-N zusammengefasst wurden.^[15] Die Levansucrasen, Inulosucrasen sowie β -Fructofuranosidasen wurden aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten in der katalytischen Domäne und der β -Propellertopologie in die GH68-Familie eingeordnet und gehören zum GH-J Clan.^[16] Der fünffache β -Propeller erzeugt ein tief liegendes, negativ geladenes aktives Zentrum, in dem Saccharose und andere kleine Oligosaccharide binden können.^[17-18] Während Levansucrasen sowohl in gram-positiven Organismen, wie z. B. *Bacillus megaterium* (*Bm*) oder *Bacillus subtilis* (*Bs*), als auch in gram-negativen Bakterien vorkommen, wurden Inulosucrasen bislang nur in gram-positiven Bakterien nachgewiesen.^[19-20] Levansucrasen katalysieren durch einen Retentions-Mechanismus den Transfer von Fructose auf ein Akzeptor-Molekül, wobei das Disaccharid Saccharose als Donor dient (Abbildung 1).

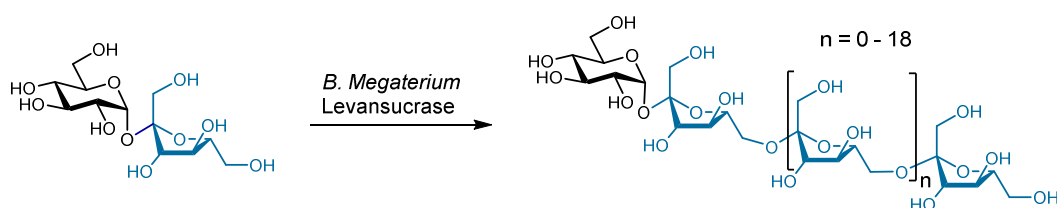


Abbildung 1: Allgemeine Reaktionsgleichung der Transfructosylierung durch die *Bm*-Levansucrase.

Die Fructosyl-Einheiten werden hauptsächlich über eine $\beta(2\rightarrow6)$ Bindung verknüpft. Je nach Art des Akzeptors werden zwei unterschiedliche Reaktionswege katalysiert: (i) Die Hydrolyse findet statt, wenn Wasser als Akzeptor verwendet wird; (ii) bei der Transglycosylierung werden die wachsende Fructankette (Polymerisation) oder Mono- und Oligosaccharide als Akzeptor-Substrate verwendet (Oligosaccharid-Synthese).^[21] Die

Levansucrase aus *Bacillus megaterium* katalysiert die Synthese von Oligosacchariden mit 2-20 Fructose-Einheiten.

Sowohl die Hydrolyse als auch die Transglycosylierung erfolgt über einen Doppel-Abspaltungsmechanismus, wobei im ersten Schritt ein kovalentes Glycosyl-Enzym-Intermediat entsteht, das anschließend über eine Carboxonium-Ion-Zwischenstufe wieder gespalten wird. Bei den GH68-Enzymen setzt sich die katalytische Triade aus zwei Aspartat-Resten (Asp⁹⁵: Nukleophil, Asp²⁵⁷: Stabilisator) und einem Glutamat-Rest (Glu³⁵²: Säure/Base-Katalysator) zusammen. Asp²⁵⁷ stabilisiert die Bindung der Saccharose in der aktiven Tasche durch starke Wasserstoffbrücken mit den C3- und C4-Hydroxygruppen der Fructosyl-Einheit.^[22-25] Glu³⁵² protoniert den glycosidischen Sauerstoff der Saccharose, wobei Glucose als Abgangsgruppe (LG) fungiert und die Fructosyl-Einheit einen Oxocarbenium-Ion-ähnlichen Übergangszustand einnimmt (Abbildung 2B).

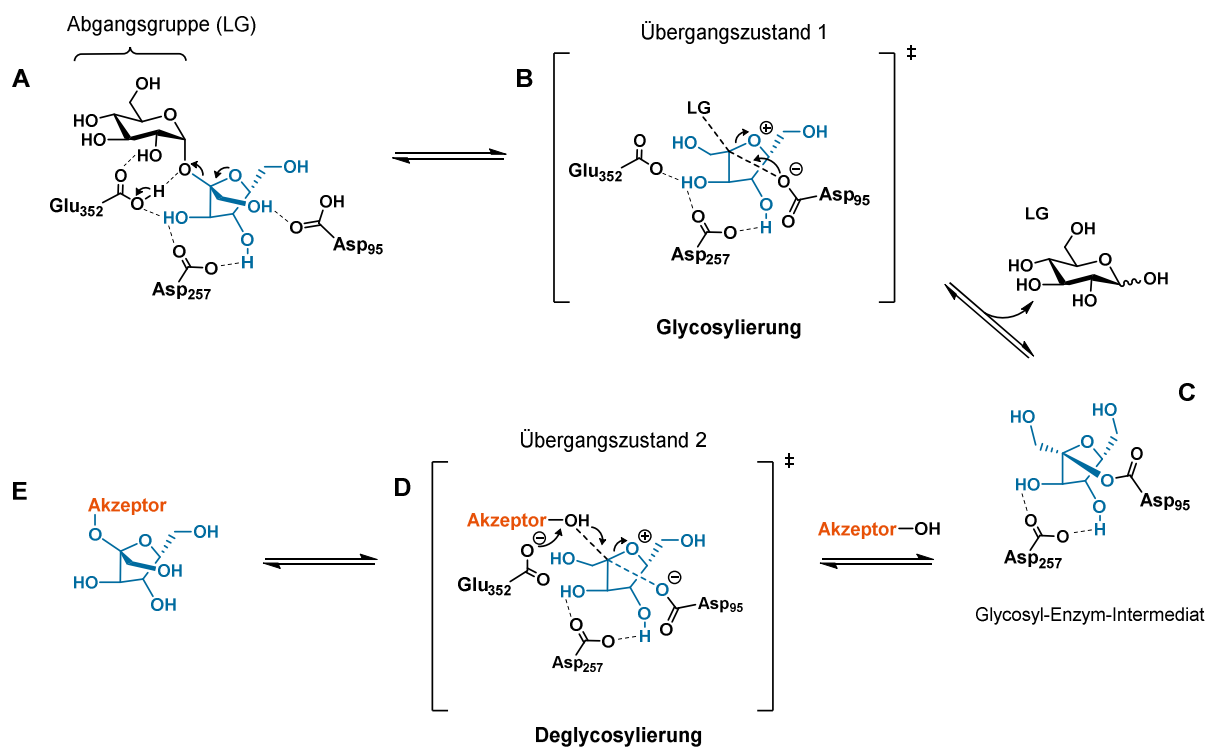


Abbildung 2: Postulierter Retentions-Mechanismus von GH68-Enzymen. A) Saccharose wird im aktiven Zentrum von der katalytischen Triade stabilisiert. B) D-Glucose wird freigesetzt und ein Oxocarbenium-Ion-ähnlicher Übergangszustand (ÜZ1) des Fructosyl-Rests gebildet. Zeitgleich findet ein nukleophiler Angriff von Asp⁹⁵ statt. C) Ein kovalentes Glycosyl-Enzym-Intermediat entsteht unter Abspaltung von Glucose. D) Der Akzeptor-Angriff führt über den zweiten Übergangszustand (ÜZ2) zum fructosylierten Produkt E).^[25-26]

Das Oxocarbenium-Ion erfordert eine koplanare Positionierung von C2, C3, C5 und O5, was auf eine ⁴E-Konformation im Übergangszustand hindeutet.^[27] Das Nukleophil Asp⁹⁵ kann somit den sp²-Kohlenstoff des Oxonium-Ions angreifen und ein kovalentes Fructosyl-Enzym-Intermediat (Abbildung 2C) durch Invertierung des stereogenen Zentrums von C2 bilden (α -Konfiguration). Der Retentions-Mechanismus verläuft weiter über den zweiten Übergangszustand (ÜZ2, Abbildung 2D), der durch einen nukleophilen Angriff des Akzeptor-Moleküls initiiert wird, und resultiert schließlich im fructosylierten Endprodukt.^[23, 28-29] Die Wechselwirkungen im zweiten Übergangszustand mit dem Akzeptor sowie thermodynamische Bedingungen spielen eine entscheidende Rolle für die Hydrolyse- versus Transferaktivität des Enzyms.^[26]

Bis dato wurden bereits 25 Levansucrasen aus 17 verschiedenen bakteriellen Organismen charakterisiert und evolutionäre Verwandtschaftsbeziehungen in einem phylogenetischen Baum zusammengefasst.^[10] Das Verhältnis zwischen Polymerisations-Reaktion und Oligosaccharid-Synthese unterscheidet sich jedoch stark, je nach Herkunft des Enzyms.^[30] Bei Levansucrasen, welche die Synthese von hochmolekularem Levan katalysieren, wird von einem prozessiven Elongationsmechanismus ausgegangen. Hierbei bleibt die wachsende Polymerkette an das Enzym gebunden, sodass keine Oligosaccharide als Zwischenprodukte akkumuliert werden. Im Gegensatz dazu gibt es Levansucrasen, die hauptsächlich kurze Fructooligosaccharide (z. B. Kestose und Nystose) produzieren, indem eine kontinuierliche Dissoziation der Fructankette nach der Transfer-Reaktion stattfindet (Abbildung 3). Dieser Reaktionstyp wird als nicht-prozessive Katalyse bezeichnet. Trotz vorhandener Kristallstrukturen unterschiedlicher Levansucrasen und struktureller Vergleiche der aktiven Zentren gibt es noch keinen Hinweis darauf, welche speziellen strukturellen Eigenschaften zu einer prozessiven oder nicht-prozessiven Katalyse führen.^[30-31]

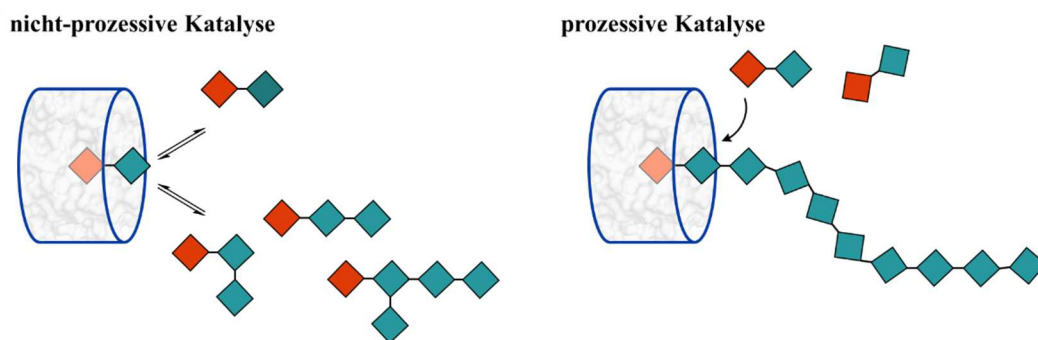


Abbildung 3: Schematische Darstellung des prozessiven und nicht-prozessiven Elongationsmechanismus der Levansucrasen. Das Enzym ist vereinfacht als blauer Zylinder abgebildet, das orangene Quadrat steht für Glucose und die Quadrate in cyan für Fructose.

Modulation der Levangröße

Zumal die Anwendung von Levan abhängig vom Verzweigungsgrad und Molekulargewicht ist, sind die gezielte Modulation der Levangröße, ebenso wie die Größenverteilung im Produktprofil, Gegenstand intensiver Forschung. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Strategien herangezogen, die sowohl gentechnische Methoden als auch einfache Anpassungen der Reaktionsbedingungen einschließen. Reaktionsparameter die in der Vergangenheit oft modifiziert wurden und zu signifikanten Veränderungen der Produktspezifität führten, sind die Zugabe organischer Lösungsmittel, die Erhöhung der Salzkonzentration, Variation der Reaktionstemperatur und die Immobilisierung der Proteine.^[18] Durch das Hinzufügen organischer Lösungsmittel, wie z. B. Ethanol oder 2-Methyl-2-propanol, wurde im Falle der *Bacillus subtilis* Levansucrase eine Erhöhung der globalen Aktivität des Enzyms beobachtet, was schließlich mit einer Verschiebung des Produktprofils zu hochmolekularem Levan einherging.^[32-33] Im Gegensatz dazu führt eine erhöhte Salzkonzentration ausschließlich zu kurzen Oligosacchariden, obwohl unter Normalbedingungen eine bimodale Verteilung zwischen kurzkettigem und hochmolekularem Levan vorherrscht. In diesem Zusammenhang wird durch die erhöhte Ionenstärke eine verringerte Wechselwirkung zwischen wachsender Fructankette und der Proteinoberfläche vermutet, was letztlich in der vorzeitigen Freisetzung des Substrats resultiert.^[34-35]

Darüber hinaus konnte für die Levansucrase aus *Bacillus subtilis* (*Bs*) gezeigt werden, dass auch die Enzymkonzentration ein entscheidender Faktor ist. Bei einer erhöhten Enzymkonzentration von $> 1,0 \mu\text{M}$ wurde der nicht-prozessive Wachstumsmechanismus induziert und somit ausschließlich kurzkettige Oligosaccharide erhalten. Im Unterschied dazu veranlassten sehr niedrige Konzentrationen mit $< 0,01 \mu\text{M}$ eine prozessive Katalyse mit hochmolekularen Levan-Produkten. Die charakteristische bimodale Produktverteilung der *Bs*-Levansucrase, die sowohl kurzkettige Fructane als auch Fructan-Polymer einschließt, wird mit der gängigen dazwischenliegenden Enzymkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ beobachtet. Der Dualismus zwischen prozessivem und nicht-prozessivem Mechanismus wurde in diesem Fall auf die Zugänglichkeit der Proteinoberfläche zurückgeführt, da diese essenziell für die Interaktion zwischen Enzym und wachsendem Substrat ist. Folglich wird bei geringer Enzymkonzentration der Elongationsprozess und die Wechselwirkungen zwischen Fructankette und Proteinoberfläche weniger gestört und somit ein prozessiver Mechanismus ermöglicht.^[34, 36-37] Auch die Immobilisierung der Levansucrase mit unterschiedlichen Trägersubstanzen hat einen Einfluss auf Protein-Protein- und Protein-Akzeptor-Wechselwirkungen. Außerdem ermöglicht sie die Nachahmung der *in vivo* Mikroumgebung des zellwandgebundenen Enzyms und könnte Aufschluss darüber geben wie Levan in natürlicher Umgebung produziert wird. Dabei

wurde eine erhöhte Thermostabilität, eine verbesserte Transfructosylierungsaktivität und die Veränderung der Levangröße und -verteilung festgestellt.^[38-39]

Die ersten gentechnischen Manipulationen wurden bereits 1988 an der *Bacillus subtilis* Levansucrase durchgeführt.^[40] Jedoch erst Jahre später, nachdem die erste Kristallstruktur einer Levansucrase im Jahr 2003 gelöst wurde, konnten rational Mutationen eingeführt werden, um gezielt Struktur-Funktions-Beziehungen zu untersuchen.^[23] Seither wurden zahlreiche gentechnologische Studien mit unterschiedlichen Levansucrasen durchgeführt, die in verschiedenen Regionen und Positionen mutiert wurden. Das Enzym kann zur Vereinfachung in drei Zonen eingeteilt werden: zur ersten Zone gehören alle Aminosäuren in der aktiven Tasche, die in direktem Kontakt mit dem Substrat Saccharose stehen; die zweite Zone beinhaltet Aminosäuren, die mit sehr kurzen Oligosacchariden wechselwirken; und die dritte Zone umfasst Positionen die entweder mit längeren Oligosacchariden interagieren oder indirekten Einfluss auf das wachsende Fructan haben (Abbildung 4).^[41]

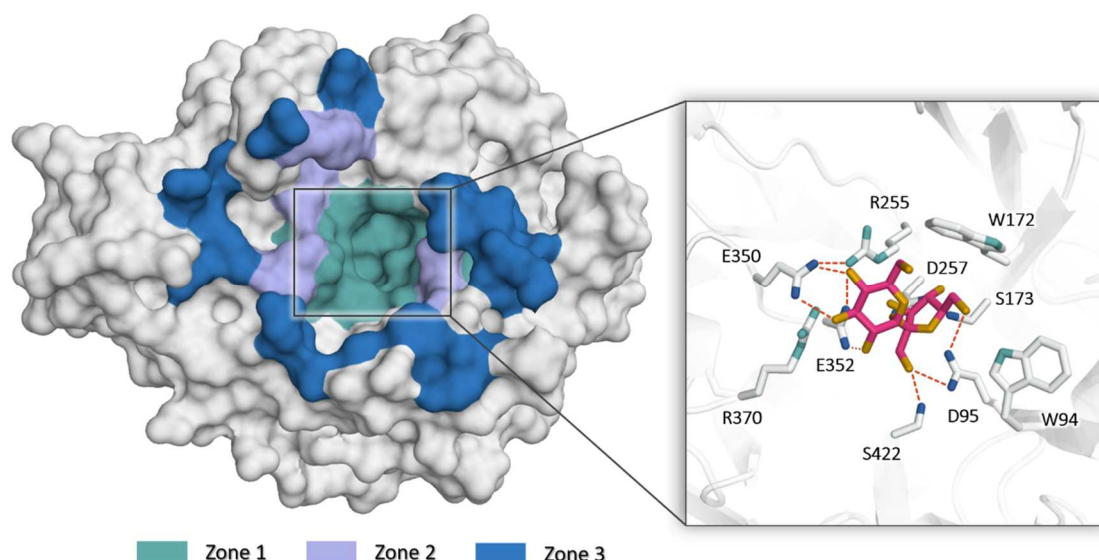


Abbildung 4: Einteilung der Aminosäuren um das aktive Zentrum in drei Zonen; Detailausschnitt: Zoom in die erste Zone und das aktive Zentrum der *Bm*-Levansucrase.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Modifizierung von Aminosäuren in der ersten Zone meist drastische Aktivitätsverluste und eine verringerte Transfructosylierung zur Folge hat. Dies liegt unter anderem daran, dass einige Aminosäuren in der Saccharose-Bindungsstelle der GH68 Enzyme vollständig konserviert sind.^[28, 30, 42-43] So führt zum Beispiel eine Substitution der katalytischen Triade Asp⁹⁵, Glu³⁵² und Asp²⁵⁷ gegen Alanin (Varianten D95A, E352A, D257A) nahezu oder vollständig zur Inaktivierung der *Bm*-Levansucrase. Andere Aminosäuren der ersten Zone, wie Trp⁹⁴, Arg²⁵⁶, Glu³⁵⁰ und Tyr⁴²¹,

weisen nach der Mutation zu Alanin eine ähnliche Auswirkung auf die Enzymaktivität auf, da sie ebenfalls an der Stabilisierung des Substrats Saccharose durch Wasserstoffbrücken beteiligt sind.^[28, 43] Den semi-konservierten Aminosäuren Ser¹⁷³ und Ser⁴²² sowie Tyr⁴²¹ konnte durch Mutagenese-Untersuchungen eine wichtige Rolle für das Transfructosylierungs- versus Hydrolyse-Verhältnis zugesprochen werden. Für die Einzelmutante S173A wurde im Vergleich zum Wildtyp beispielsweise ein dreifach höheres Transfer-Verhältnis nachgewiesen.^[44]

Zur weiteren Aufklärung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen, wurden in einer systematischen Herangehensweise Aminosäuren in der zweiten und dritten Zone der *Bm*-Levansucrase mutiert.^[16] Dadurch gelang es eine definierte Produktverteilung im Bereich der kurzen Oligosaccharide zu erhalten, ohne dabei einen bemerkenswerten Aktivitätsverlust hervorzurufen. Aus den Ergebnissen resultierte außerdem eine Hypothese für den genauen Elongationsweg der wachsenden Fructankette, mit zugehörigen wichtigen Bindungsstellen.

Unter anderem gehört dazu die Aminosäure R370, welche die Rolle des Glycosyl-Stabilisators einnimmt und damit für die Polymeraseaktivität benötigt wird. R370 liegt räumlich sehr nah am aktiven Zentrum und kann sogar Wechselwirkungen mit E352 der katalytischen Triade ausbilden (Abbildungen 4, 5). Mutationen an dieser Position reduzieren die Bildungsrate des kovalenten Glycosyl-Enzym-Intermediats im Übergangszustand und begünstigen dadurch die Hydrolyseaktivität, was schließlich zur vermehrten Synthese von Kestose führt. N252 ist essentiell für die Synthese von Fructanen mit einem Polymerisationsgrad > 4 . Die Substitution des Asparagins gegen Glycin in der Variante N252G führt demnach zur Bildung kurzer Oligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad < 4 . Die Mutation K373A führt zur Einschränkung der Oligosaccharid-Synthese bis zu einem Polymerisationsgrad von 6, während die Substitution K373R einen Polymerisationsgrad bis zu 8 Fructosyl-Einheiten zulässt. Eine weitere wichtige Bindungsstelle stellt die Aminosäure Y247 dar, welche für die Elongation ab einem Polymerisationsgrad > 10 zuständig ist, und für dessen Funktion ein aromatischer Rest unerlässlich ist (Abbildung 5).^[16, 28, 45] Somit wurde gezeigt, dass die Oligosaccharid-Synthese durch Veränderung struktureller Motive auf der Enzymoberfläche gezielt moduliert werden kann.

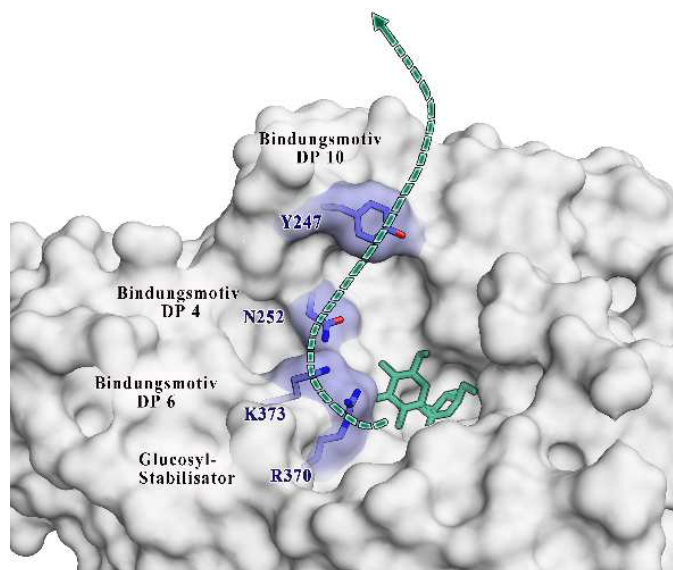


Abbildung 5: Oberflächendarstellung der *Bm*-Levansucrase (PDB 3om2) mit Frontansicht auf das aktive Zentrum. Die violett hervorgehobenen Aminosäuren gehören zur Zone 2 und liegen im vermuteten Wachstumsverlauf der Oligosaccharide. Das Substrat ist grün markiert und der grüne Pfeil zeigt den Elongationsweg. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Anwendungsmöglichkeiten für Levan

Die Levansynthese, -katalyse und -modifizierung gewann in den letzten Jahren aufgrund ihrer pharmazeutischen und biomedizinischen Einsatzmöglichkeiten zunehmend an Bedeutung. Es wurden umfangreiche Arbeiten veröffentlicht, die ein breites Anwendungsspektrum abdecken: dazu gehören der Einsatz von Levan als Präbiotika, Entzündungshemmer, Antioxidationsmittel, Anti-Kanzerogen, Levan für den Wirkstofftransport als Nanopartikel, Levan als Biofilm oder als Lebensmittelzusatz.^[10, 47-49] Die Größe und Verzweigung von Levan steht in einem engen Zusammenhang mit der biologischen Aktivität.

Gezielte Untersuchungen zur Tumor-Inhibition von Magen- und Leberkarzinomen zeigten, je höher der Verzweigungsgrad von Levan, desto höher ist die Antitumor-Aktivität.^[50] Weiterführende Experimente wiesen außerdem verbesserte anti-kanzerogene Eigenschaften nach, wenn das Levan-Polymer durch chemische Modifikation sulfatiert oder phosphoryliert wurde.^[51-52] Die entzündungshemmende Wirkung des Fructan-Polymers wurde in einem direktem Vergleich von Levan mit dem dafür bekannten Medikament Diclofenac belegt. Im Vergleich zum Entzündungshemmer Diclofenac (100 %) weist Levan 71 % der Wirkstoffaktivität auf.^[53] Ein Test mit HepG2-Zellen (menschliche Leberkrebs-Zelllinie) ergab außerdem, dass Levan als Radikalfänger fungiert und somit auch über antioxidative Eigenschaften verfügt.^[51]

Präbiotika sind unverdauliche Substanzen, die das Wachstum verschiedener Bakterienpopulationen im menschlichen Darm-Trakt anregen und sich damit positiv auf die Gesundheit auswirken. Sie gehören derzeit zu den häufigsten Lebensmittelzusätzen. Für verschiedene Oligo- und Polysaccharide wie Inulin, Lactulose, Raffinose, Stachyose und Fructane wurden präbiotische Eigenschaften analysiert und nachgewiesen.^[54] In einem Tierversuch mit Schweinen konnte durch die Zufütterung von Levan die Anhaftung enterotoxischer *E. coli* Stämme an der Darmschleimhaut verhindert werden.^[55] Andere Studien zur Untersuchung der Darmmikrobiota konnten durch *in vitro* Versuche nachweisen, dass Levan die globale Bakterienpopulation modulieren kann und das Wachstum von *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* fördert.^[56]

Ein *Drug-Delivery*-System transportiert pharmazeutische Wirkstoffe auf verschiedenste Weise in die Zellen, wo sie im Körper wirken sollen. Dies kann durch die Haut, über die Schleimhäute oder durch orale Einnahme geschehen. Solche Arzneimitteltransportsysteme bestehen in der Regel aus einem Trägermaterial (z. B. Biopolymere) und dem Wirkstoff selbst, welches kontrolliert im Körper freigesetzt werden soll. Eine wichtige Voraussetzung für das Polymer bzw. den Wirkstoffträger sind selbstverständlich die biologische Abbaubarkeit und Biokompatibilität, um Toxizitätsprobleme sowie unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden.^[47] Vor diesem Hintergrund wurden bereits unterschiedliche Biopolymere, wie etwa Polyglycolsäure, Polymilchsäure und Alginate, getestet und angewendet.^[57-58] Levan hat im Vergleich zu anderen Polymeren die besondere Eigenschaft sich in Wasser selbst zu Nanopartikeln zu organisieren, was den Herstellungsprozess von Nanokapseln stark vereinfacht. Hinzu kommt die Affinität der Fructose-Einheiten gegenüber des Glucose Transporter 5 (GLUT5), welcher in Brustkrebszellen vermehrt exprimiert wird. Dadurch wurde zum Beispiel Brustkrebs mit dem eingekapselten Farbstoff Indocyaningrün durch gezielte Bildgebung sichtbar gemacht.^[59] Dennoch gibt es in der Praxis Herausforderungen, die es zu bewältigen gilt. Dazu gehören die unkontrollierte Aggregation von Levan in Lösung, die Effizienz der Nanopartikel-Verkapselung und das niedrige Zeta-Potential, welches die pharmakokinetische Wirkung beeinflusst. Eine weitere sehr interessante Anwendung findet Levan im Bereich des *Tissue Engineering*, wofür biokompatible Klebstoffe für Gewebe entwickelt werden, um Wunden zu versiegeln oder mit anderen Gewebekomponenten zu befestigen.^[60]

2.2 Chemische Protein-Modifikation

Enzym-Modifikationen sind in der Natur weit verbreitet und finden natürlicherweise in Form von posttranslationalen Protein-Modifikationen statt. Hierbei werden nach der Proteinbiosynthese bestehende funktionelle Gruppen des Proteins modifiziert oder neue Gruppen eingeführt. Bislang wurden etwa 300 verschiedene posttranslationale Protein-Modifikationen beschrieben.^[61] Die Phosphorylierung, Hydroxylierung, Acetylierung und die Glycosylierung gehören dabei zu den häufigsten. Das chemische Repertoire der 20 Standard Aminosäuren wird dadurch um ein Vielfaches erweitert und die Vielfalt und Funktion der Proteinstrukturen um bis zu zwei Größenordnungen erhöht.^[61-62] Diese naturgegebene Diversität mit Hilfe chemischer Reaktionen nachzuahmen ist und bleibt eine faszinierende Herausforderung. Eine große Schwierigkeit besteht insbesondere darin, eine bestimmte Aminosäure sowohl chemo- als auch regioselektiv zu funktionalisieren, während sie von einer Vielzahl an reaktiven Carbonsäuren, Amiden, Aminen, Alkoholen und Thiolen umgeben ist. Zur Differenzierung der Begrifflichkeiten: eine Reaktion gilt als chemoselektiv bzw. ortsspezifisch wenn eine bestimmte Aminosäure gegenüber einer anderen bevorzugt modifiziert wird (z. B. Lysin gegenüber Serin); als regioselektiv wird eine Reaktion dann bezeichnet, wenn aus einem Satz gleicher Aminosäuren nur eine davon vorzugsweise modifiziert wird (z. B. exponiertes Tyrosin gegenüber weniger zugänglichen Tyrosinen).^[9]

In den letzten Jahren haben sich viele Forschergruppen dieser Herausforderung gestellt und zahlreiche Modifikationsmethoden entwickelt und erfolgreich an Proteinen angewendet. Der kombinierte Einsatz genetischer und chemischer Methoden stellt heute eine umfangreiche *Toolbox* für die bioorthogonale Modifikation zur Verfügung und ebnet den Weg für die Erforschung und Beeinflussung von biologischen Systemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.^[63] Dennoch besteht weiterhin Bedarf an breit anwendbaren Methoden für die selektive Biokonjugation, da viele der bestehenden Methoden für ein spezielles System oder Enzym entwickelt wurden und schwer auf andere Proteine übertragbar sind.^[9]

Die idealen Reaktionsbedingungen für Protein-Modifikationen müssen biokompatibel sein, d. h. die Reaktion sollte in Wasser mit einem möglichst neutralen pH-Wert und bei Raumtemperatur oder bei maximal 40 °C durchgeführt werden. Weitere Voraussetzungen sind die Verwendung ungiftiger Reagenzien, welche in niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden, und das Erreichen hoher Reaktionsgeschwindigkeiten. Dadurch soll eine hohe Modifikationseffizienz erreicht werden, um ein möglichst homogenes Reaktionsgemisch zu erhalten und aufwendige Reinigungsschritte zu vermeiden.

Die Anwendungen modifizierter Proteine sind sehr vielfältig und reichen von mechanistischen Studien biologischer Abläufe, über Arzneimittel-Design bis hin zur Entwicklung neuartiger Biomaterialien. Zum Beispiel wurden in lebenden Mäusen Glycane an Zelloberflächen mit einem Fluorophor modifiziert. Dadurch wurde die *in vivo* Überwachung bestimmter Biopolymere in einem physiologischen System ermöglicht.^[64] Weitere Beispiele sind die (PEG)ylierung von therapeutischen Proteinen zur Optimierung pharmakodynamischer Eigenschaften, die Entwicklung von lichtabsorbierenden Systemen durch die Einbringung synthetischer Chromophore in das Tabakmosaikvirus und die mechanistische Untersuchung der pathologischen HIV-1 Protease.^[65-67]

Die Herangehensweise für die Protein-Modifizierung erfolgt oft nach demselben Prinzip „*Tag and Modify*“.^[68] Dabei wird zunächst ein *Tag* optimalerweise chemo- und regioselektiv an eine gezielte Aminosäure angebracht. Dieser *Tag* verfügt endständig meist über eine funktionelle Gruppe, die sich von den Aminosäure-Gruppen im Protein deutlich unterscheidet und im zweiten Modifizierungsschritt mit dem gewünschten Reagenz modifiziert werden kann (Abbildung 6).^[61]

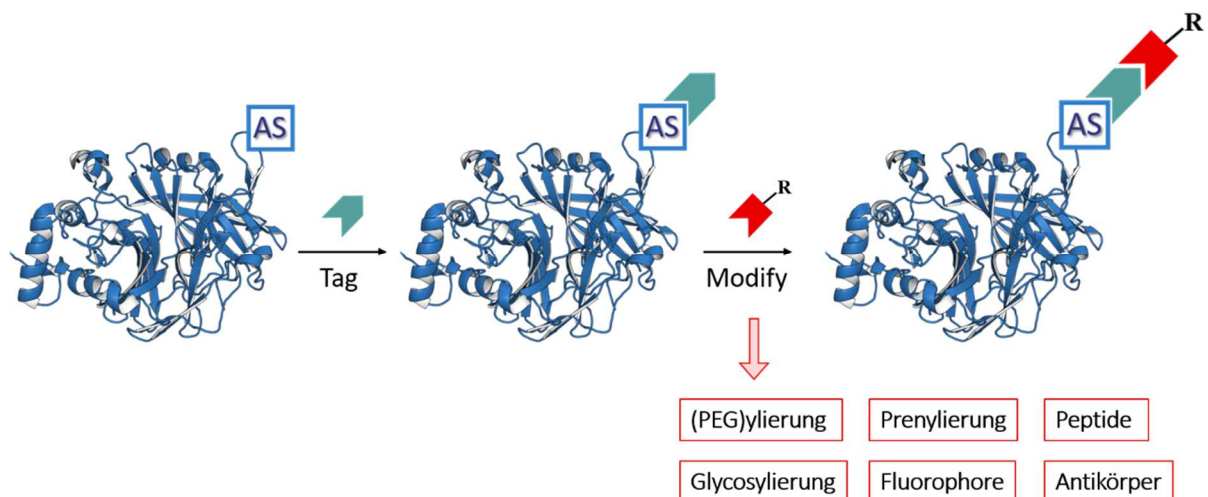


Abbildung 6: Protein-Modifikation nach dem Prinzip „*Tag and Modify*“. Zuerst wird ein *Tag* selektiv an eine spezifische Aminosäure gebunden und im zweiten Schritt mit der erwünschten Funktionalität modifiziert. Darstellung modifiziert nach Spicer *et al.*^[61]

Basierend auf dieser Vorgehensweise haben sich in der Praxis drei unterschiedliche Strategien für die selektive Biokonjugation herauskristallisiert^[69]: (1) Die Modifizierung eines spezifischen Motivs, anstatt häufig vorkommende reaktive Gruppen. Darunter fallen z. B. die Aminosäuren Tyrosin oder Tryptophan, welche vergleichsweise selten in der Aminosäuresequenz vorkommen.^[70] Doch auch für die üblicherweise adressierten Aminosäuren Lysin und Cystein wurden Methoden entwickelt, um ortsspezifische Reaktionen durchzuführen. Dabei spielen oft die polare Umgebung oder andere

geringfügige Reaktivitätsunterschiede eine Rolle. (2) Die Implementierung unnatürlicher Aminosäuren während der Proteintranslation. Dadurch entfällt die Limitierung auf die funktionellen Gruppen der 20 natürlichen Aminosäuren. Jedoch werden für diese Methode spezielle Expressionssysteme benötigt und meist nur geringe Proteinausbeuten erhalten.^[71] (3) Schließlich ist das Einführen einer spezifischen Reaktivität auch durch chemische Synthese möglich. Neue Techniken in der Festphasensynthese erlauben die Synthese von Aminosäuresequenzen, die bis zu 100 Aminosäuren enthalten.^[72]

In dieser Arbeit wird hauptsächlich auf die Modifikation der 20 proteinogenen Aminosäuren eingegangen und die existierenden Methoden zusammengefasst (Abbildung 7).

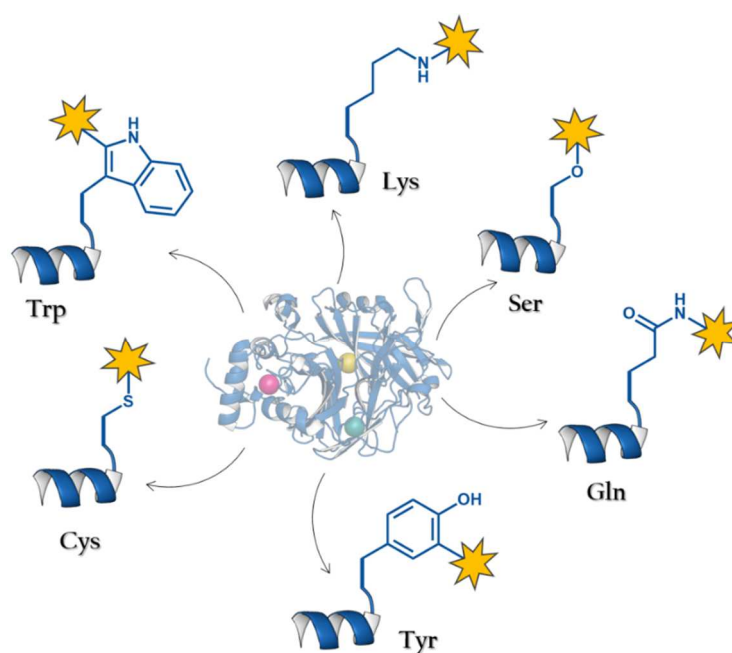


Abbildung 7: Die funktionellen Gruppen der Aminosäuren Lysin, Serin, Glutamin, Tyrosin, Cystein und Tryptophan sind gut geeignet für Protein-Modifikationen und werden deshalb oft dafür verwendet.

Die klassischen Biokonjugations-Methoden haben sich üblicherweise die nukleophilen Eigenschaften der Aminosäuren Cystein oder Lysin zu Nutzen gemacht.^[73] Cystein hat eine hohe Reaktivität für Alkylierungs-Reaktionen mit guten Elektrophilen, wie z. B. α -Halocarbonylen oder Michael-Akzeptoren, und kann außerdem leicht durch einen Disulfid-Austausch konjugiert werden (Abbildung 8a-c). Die Nukleophilie von Lysin konkurriert zwar mit der von Cystein, jedoch kann durch die Einstellung des pH-Wertes und der sterischen Umgebung der Cysteine eine hinreichende Selektivität erreicht werden.^[73-76] Ein großer Fortschritt hinsichtlich der chemo- und ortsspezifischen Cystein-Modifikation gelang der Gruppe von Benjamin Davis durch die Weiterentwicklung des Disulfid-Austauschs. Der Forschungsprozess begann zunächst mit

der Verwendung von Diseleniden um stabilere SeS-Bindungen zu knüpfen.^[77] Im nächsten Schritt wurden spaltbare Disulfidbrücken erzeugt, die durch Desulfurierung in stabilere Thioether transformiert wurden. Zuletzt wurden Cystein-Eliminationsmethoden entwickelt, die einen Zugang zu dem reaktiven Michael-Akzeptor Dehydroalanin (Dha) erlaubten. Dadurch konnten Thioether mit einer hohen Selektivität direkt nach der Addition von Thiol-Nukleophilen erhalten werden (Abbildung 8d-e).^[68, 78]

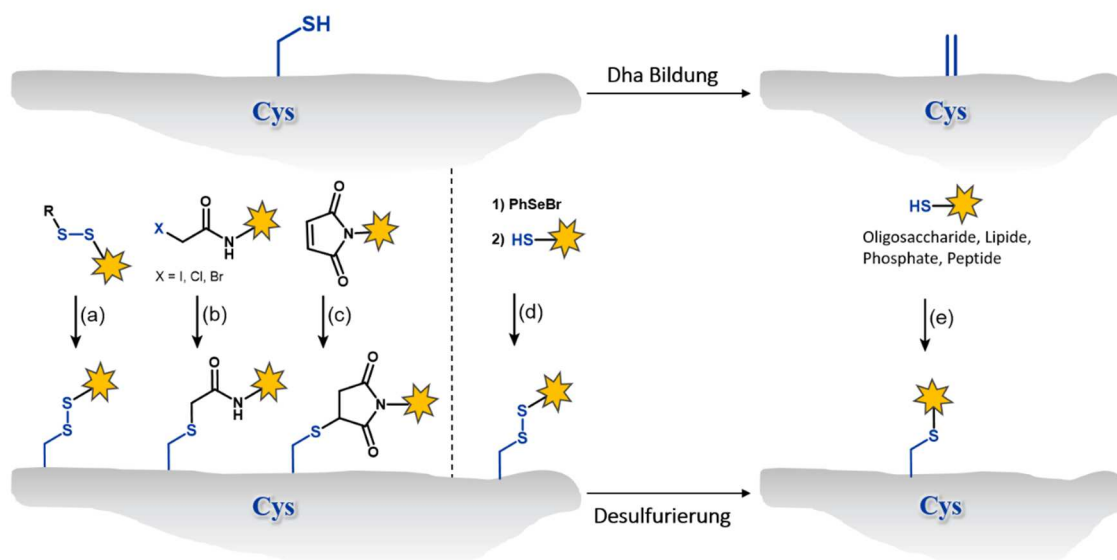


Abbildung 8: Auswahl klassischer (links) und moderner (rechts) Methoden für die Protein-Modifikation an Cystein (Cys) und Dehydroalanin (Dha): (a) Disulfid-Austausch, (b) Alkylierung, (c) Reaktion mit Maleimid Michael-Akzeptor, (d) Elektrophile Disulfid-Bildung, (e) Thioether Bildung. Darstellung modifiziert nach Boutureira *et al.*^[9]

Die Modifikation der Aminosäure Lysin findet aufgrund der primären Amino-Gruppe häufige Anwendung in der Biokonjugation. Die organische Chemie stellt dafür bereits zahlreiche Protokolle zur Verfügung, in denen vorzugsweise primäre Amine mit elektrophilen Reagenzien reagieren. Dazu gehören aktivierte Säuren, Vinylsulfone, Sulfonylchloride und Iso(thio)cyanate. Doch auch reduktive Aminierungs-Reaktionen mit Aldehyden können durchgeführt werden. Eine wichtige Weiterentwicklung in Richtung chemo- und regioselektive Lysin-Modifikation konnte zum Beispiel durch die Reaktion mit 2-Imino-2-methoxyethyl-Reagenzien und Diazonium-Salzen erreicht werden, während der N-Terminus gezielt durch Ketene modifiziert werden konnte (Abbildung 9a-d).^[79-81]

Die klassischen Alkylierungs- und Acylierungsmethoden können analog auch mit anderen nukleophilen Resten, wie Serin, Histidin, oder Arginin durchgeführt werden. Hierbei werden jedoch überwiegend heterologe Reaktionsgemische erhalten. Des Weiteren wurden die Säuregruppen von Aspartat, Glutamat oder der C-Terminus erfolgreich für die

Manipulation der Lipase-Aktivität chemisch modifiziert.^[82] Trotz der geringen Selektivitätsrate, ist die traditionelle Modifikation nukleophiler Aminosäuren von großer Bedeutung für die biotechnologische Anwendung und kommt weltweit am häufigsten zum Einsatz, insbesondere in Protokollen zur Enzym-Immobilisierung und Herstellung von Polymerkügelchen. Dies kann im Wesentlichen auf die Einfachheit und Unempfindlichkeit der Versuchsdurchführungen zurückgeführt werden.^[9]

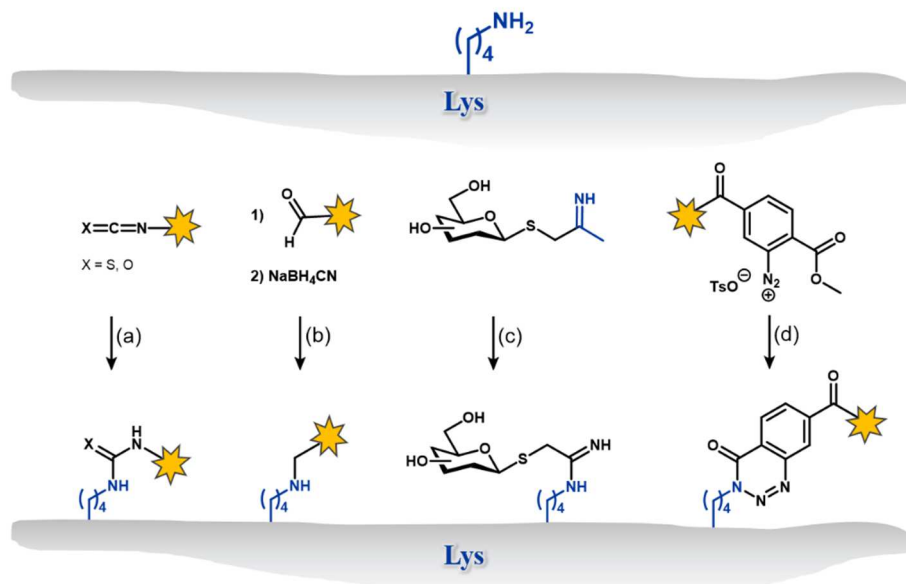


Abbildung 9: Auswahl unterschiedlicher Modifikationsmethoden für Lysin: (a) Urea und Thiourea Bildung, (b) Reduktive Aminierungs-Reaktion, (c) Reaktion mit 2-Imino-2-methoxyethyl, (d) Reaktion mit Diazonium-Salzen. Darstellung modifiziert nach Boutureira *et al.*^[9]

Neben den klassischen Biokonjugations-Methoden ist in den letzten Jahren besonders die Modifizierung aromatischer Aminosäure-Resten, wie Tyrosin und Tryptophan, zunehmend in den Fokus gerückt. Die phenolischen Hydroxylgruppen der Tyrosine weisen aufgrund des aciden Protons eine große Reaktivität auf und sind dazu häufig an der Proteinoberfläche exponiert. Es konnte gezeigt werden, dass Diazonium-Salze mit elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position in der Lage sind chemoselektiv mit der *ortho*-Position der Phenol-Gruppe des Tyrosins zu reagieren (Abbildung 10a).^[70, 83-84] In einem anderen Ansatz wurde eine Dreikomponenten-Mannich-Reaktion mit Aldehyden und Anilin durchgeführt und die hohe Selektivität anhand der Tyrosin-Modifikation von Lysozym, RNase A und Chymotrypsinogen A demonstriert (Abbildung 10b). Eine Schwäche dieser Methode ist jedoch die Kreuzreaktivität mit exponierten Tryptophanen und reduzierten Disulfiden.^[85] In weiteren Protokollen zur selektiven Tyrosin-Konjugation wurden Imine und Azomaleimide über einen En-artigen Mechanismus zur Reaktion gebracht (Abbildung 10c, 10d).^[70, 86] Dabei findet eine konzertierte [1,5]-Protonenumlagerung von dem Phenol-Rest auf die RN=NR Gruppe

statt.^[87] Cyclische Diazodicarboxamide, wie zum Beispiel 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-on (PTAD) und Derivate davon, gehören zu den reaktivsten Dienophilen und stärksten Elektrophilen. Mit Hilfe dieser Modifikationsmethode wurden bereits glykokonjugierte Impfstoffe entwickelt und DNA-Protein-Verbindungen über einen PTAD-Linker verknüpft.^[88-89] Nichtsdestotrotz führt die Reaktivität dieser Verbindungen zu Nachteilen, die sich vor allem in der Selektivität und Stabilität bemerkbar machen. Unter wässrigen Reaktionsbedingungen kommt es etwa zur Bildung von Isocyanaten, die dann im Folgeschritt mit Lysin-Resten zu Nebenprodukten reagieren.

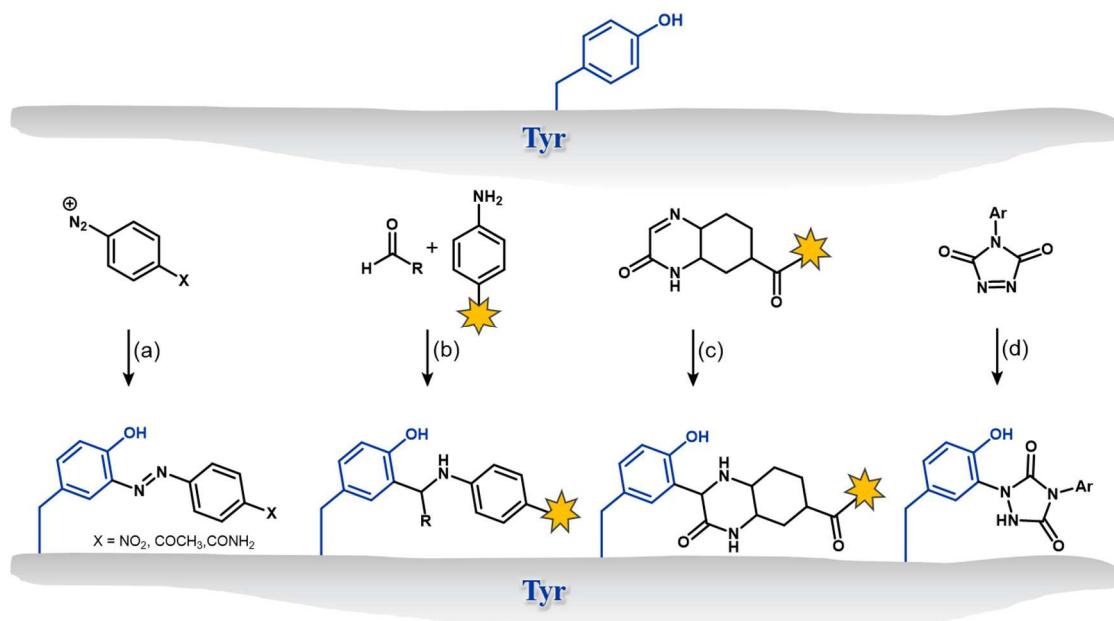


Abbildung 10: Auswahl unterschiedlicher Modifikationsmethoden für Tyrosin: (a) Reaktion mit Diazonium-Salzen, (b) Dreikomponenten Mannich-Reaktion, (c) Reaktion mit Iminen, (d) En-artige Reaktion mit Diazodicarboxylaten. Darstellung modifiziert nach Boutureira *et al.*^[9]

Um diesen Nachteilen entgegenzuwirken haben Sato *et al.* eine Tyrosin-spezifische Konjugations-Methode erarbeitet, die auf der *in situ* Oxidation von Luminol-Derivaten basiert. In dieser Vorgehensweise werden Hemin und Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel für die cyclische Hydrazid-Struktur von Luminol verwendet.^[90] Als Modellprotein diente das Peptid Angiotensin II (NH_2 -DRVYIHPF-COOH), für das mit einigen Luminol-Derivaten Modifikationsraten von $> 95\%$ erreicht wurden (Abbildung 11). Darauf aufbauend wurde in einem Test mit dem größeren Protein Rinderserumalbumin (BSA) die Tyrosin-Selektivität von PTAD und einem Luminol-Derivat verglichen. Es wurde festgestellt, dass die Luminol-Verbindung 8 der 20 vorhandenen Tyrosine modifiziert hat, während Nebenreaktionen mit anderen Aminosäuren nicht beobachtet wurden. Hingegen dazu hat PTAD sowohl Tyrosine als auch Lysin-Reste modifiziert.

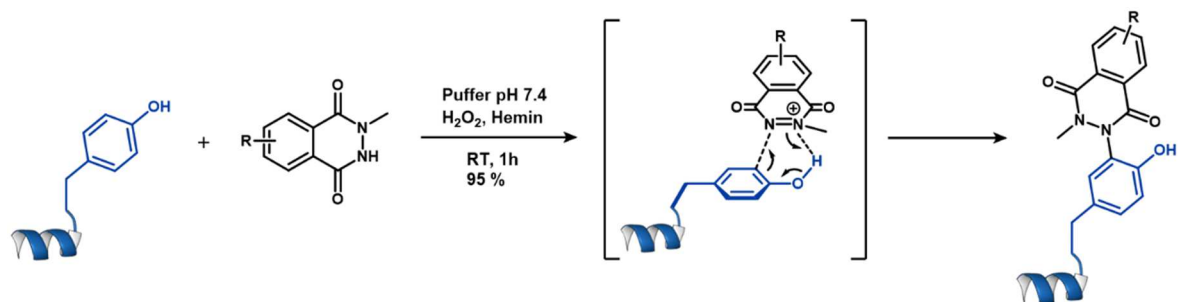


Abbildung 11: Reaktionsbedingungen der Tyrosin-Modifikation nach Sato *et al.*^[90] Mit dem Modellprotein Angiotensin II wurden mit einigen Luminol-Derivaten Modifikationsraten > 95 % erhalten.

Neben den bereits genannten Methoden für die chemo- und regioselektive Modifikation der proteinogenen Aminosäuren, gibt es noch eine Reihe unterschiedlicher Ansätze, die den Einsatz von Übergangsmetallen beinhalten. Dazu gehören die reduktive Alkylierung von exponierten Lysin-Resten durch Iridium-Bipyridyl-Komplexe^[91], die Konjugation von Tryptophan mit Rhodium Carbenoiden^[92] und die Gold-vermittelte selektive Cystein-Modifikation von Peptiden^[93], um nur einige Beispiele aus diesem Bereich zu nennen.

2.3 Click-Chemie

Die klassische, unkatalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition wurde bereits 1961 von Rolf Huisgen als breit anwendbare neuartige Reaktion mit großem Wirkungsspektrum beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt mussten die Cycloadditionen zwischen Alkin und Azid noch bei hohen Temperaturen bis zu 100 °C durchgeführt werden, um die Aktivierungsenergie zu überwinden. Die Reaktion lief zudem oft langsam ab und war wenig regioselektiv.^[94] Nicht ahnend in welchem Ausmaß die beschriebene 1,3-Cycloaddition tatsächlich erforscht wird, aber mit großem Verständnis für ihr Potenzial, schrieb er damals:

„It begins very slowly and seems to proceed at a snail's pace until a phase of exponential growth is reached.“ ^[95]

In der Tat hat es sehr lange gedauert bis die zwei Forschergruppen von Barry Sharpless und Morten Meldal unabhängig voneinander die Kupfer(I)-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition entdeckt haben und sie damit auf das nächste Level der modernen Organokatalyse angehoben haben. Durch die Kupfer(I)-Katalyse war es nun möglich, die Reaktion unter physiologischen Bedingungen und in kurzen Reaktionszeiten durchzuführen. Darüber hinaus wurde anstatt einem Isomeren-Gemisch aus 1,4- und 1,5-Produkten ausschließlich das 1,4-Isomer erhalten.^[96-97] In diesem Kontext wurde der Begriff „Click-Chemie“ erstmals 1998 von B. Sharpless eingeführt und 2001 von B. Sharpless, H. Kolb und M.G. Finn vollständig beschrieben. Nach ihrer Definition müssen

Reaktionen strengen Kriterien gerecht werden um den Status „Click-Reaktion“ zu erlangen. Zu diesen Kriterien gehören folgende Eigenschaften: Die Reaktion muss modular aufgebaut sein und einen breiten Anwendungsbereich haben, sie sollte hohe Ausbeuten liefern und möglichst wenig Nebenprodukte erzeugen, die Reaktion sollte regio- und stereospezifisch ablaufen. Zu den Anforderungen an die Prozesseigenschaften gehören einfache Reaktionsbedingungen, wie z. B. Unempfindlichkeit gegenüber Wasser und Sauerstoff, leicht verfügbare Ausgangsmaterialien und Reagenzien, die Verwendung von unschädlichen Lösungsmittel (z. B. Wasser) oder leicht entfernbaren Lösungsmittel sowie eine einfache Produktisolierung.^[98]

Die heute wohl bekannteste und am häufigsten durchgeführte Click-Reaktion ist die oben genannte Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC), bei der eine Azid- und eine Alkin-Verbindung in einer [3+2] Cycloaddition miteinander reagieren (Abbildung 13A). Der genaue Mechanismus wurde im Jahr 2005 unter Berücksichtigung von DFT-Rechnungen und Kinetik-Experimenten aufgeklärt. Erste Überlegungen sind von einem Mechanismus ausgegangen, der nur ein Kupfer-Atom im Katalyse-Zyklus beinhaltet. Doch die Tatsache, dass die Kupfer-Katalyse durch Reaktionsadditive, wie etwa Liganden oder Lösungsmittel, beeinflusst werden kann, spricht eher für einen Mechanismus der zwei Kupfer-Spezies involviert (Abbildung 12).^[99-100]

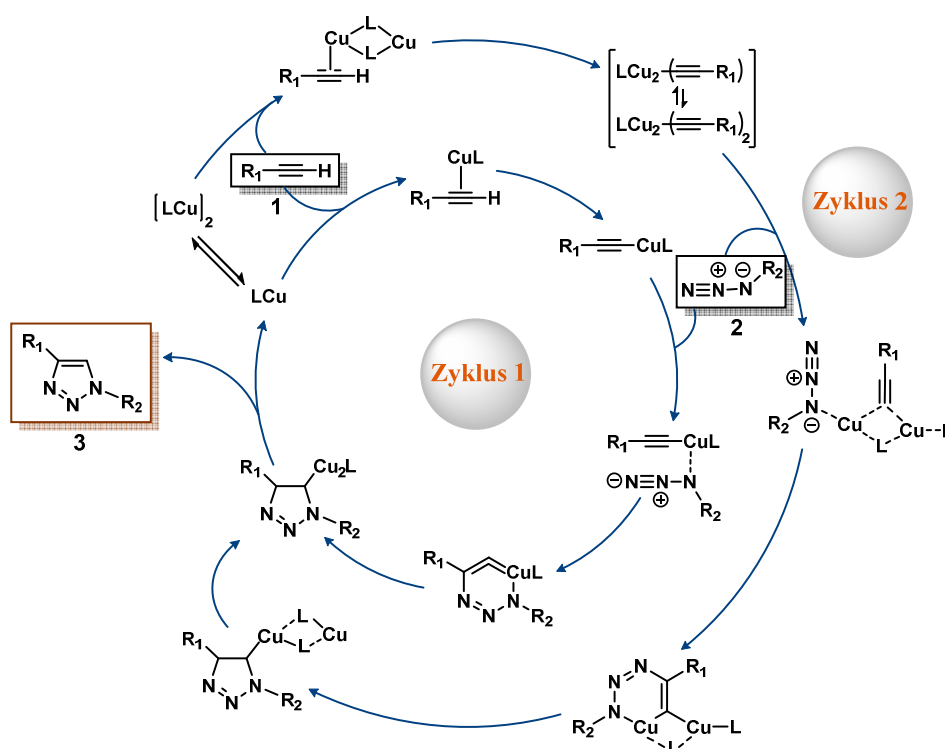


Abbildung 12: Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC). Basierend auf DFT Rechnungen und Kinetik-Studien werden zwei plausible Katalyse-Zyklen vorgeschlagen. Darstellung modifiziert nach Tiwari *et al.*^[101]

Neben der Kupfer-katalysierten 1,3-Cycloaddition haben sich auch die Thiol-En-Reaktion, die Diels-Alder-Reaktion und andere hier nicht erwähnte Reaktionen in der Click-Chemie bewährt.^[102-104] Außerdem wurden bestehende Systeme weiterentwickelt. Obwohl die CuAAC unter physiologischen Bedingungen stattfindet, ist die eingesetzte Menge des Kupfer-Katalysators für biologische Systeme cytotoxisch. Aus diesem Grund wurden wasserlösliche oder komplexierende Liganden entwickelt, um die Effektivität von Kupfer zu erhöhen und dadurch die Konzentration herabsetzen zu können. Schließlich haben Bertozzi *et al.* eine kupferfreie Huisgen Cycloaddition entwickelt, um der Cytotoxizität auszuweichen und *in vivo* Experimente zugänglicher zu machen. Hierbei wird nicht Kupfer als Aktivator verwendet, sondern alternativ ein Alkin eingesetzt, das durch eine hohe Ringspannung sehr reaktiv ist (deshalb auch *Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC, genannt). Dies wird zum Beispiel durch elektronenziehende Gruppen an einem Cyclooctinring erreicht (Abbildung 13B).^[105] Auch Alkene können die Ringspannung als treibende Kraft für eine Click-Reaktion mit Aziden, Tetrazolen oder Tetrazinen nutzen. Als aktivierte Alkene kommen oft trans-Cycloocten oder Oxanorbornadien zum Einsatz. Mit Tetrazin läuft die Reaktion dann über eine inverse elektronenziehende Diels-Alder-Reaktion, an die sich eine Retro [4+2] Cycloaddition anschließt (Abbildung 13C).^[106] Bei der Thiol-En-Reaktion wird aus einem Thiol und einem Alken ein Thioether gebildet. Die Reaktion kann über zwei unterschiedliche Mechanismen ablaufen. Entweder erfolgt durch einen Radikal-Initiator (z. B. Licht) eine radikalische Addition oder es findet eine Michael-Addition durch Zugabe von Base oder Nukleophil statt (Abbildung 13D).^[104]

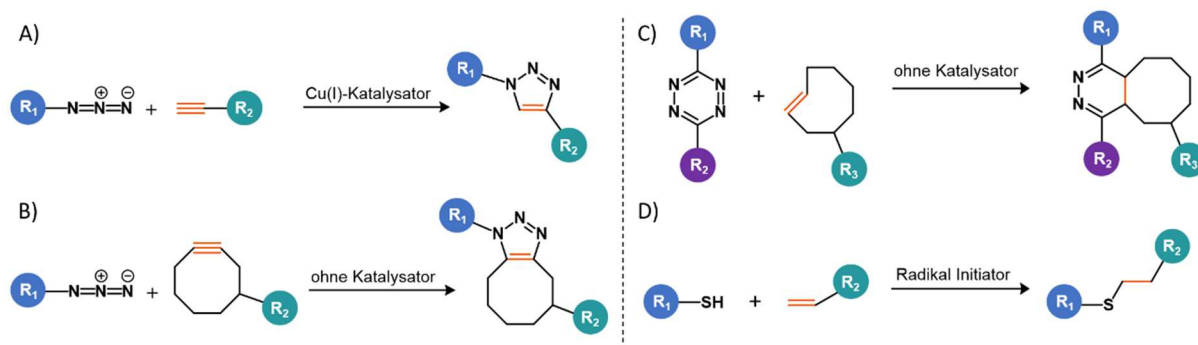


Abbildung 13: Auswahl gängiger Click-Reaktionen. A) Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC), B) durch Ringspannung getriebene Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC), C) Tetrazin-Alken Cycloaddition über Diels-Alder Mechanismus, D) Thiol-En-Reaktion.

Die Anwendungsbereiche der Click-Chemie decken ein enormes Spektrum unterschiedlicher Forschungsgebiete ab, die vor allem die synthetische Chemie, Biochemie, Pharmakologie, medizinische Wissenschaften und die Materialwissenschaften beinhalten. An der Schnittstelle zwischen Chemie und Molekularbiologie hat die Click-

Chemie zum Beispiel im Bereich der bioorthogonalen Protein-Modifikation an großer Bedeutung gewonnen. Die Möglichkeit unnatürliche Aminosäuren in biologische Systeme einzubauen erlaubte die Inkorporation von clickbaren Bausteinen sogar in lebenden Organismen. Die clickbaren unnatürlichen Aminosäuren haben das Repertoire für die Protein-Biokonjugation somit um ein Vielfaches erhöht.^[107] Die Pharmakologie gehört wahrscheinlich zu den Disziplinen, die das Click-Konzept am konsequentesten angewendet hat. Aus einer großen Bibliothek mit clickbaren molekularen Bausteinen konnten durch kombinatorische Synthese neuartige Therapeutika hergestellt werden.^[108]

2.4 Photo-Biokatalyse

Der Einsatz von Licht hat in der modernen organischen Katalyse zunehmend an Beachtung gewonnen und wird erst seit kurzem auch in Kombination mit der Biokatalyse erforscht. Die Photo-Biokatalyse ist somit ein sehr junges Forschungsgebiet, das leichter zu verstehen ist, wenn die Entwicklung der einzelnen Bereiche, Photokatalyse und Biokatalyse, zunächst unabhängig voneinander betrachtet werden.^[109] Die Biokatalyse hat sich in den letzten 20 Jahren zu einer grünen Alternative zur klassischen organischen Synthesechemie entwickelt und ist wegen ihrer milden, stereoselektiven und umweltfreundlichen Reaktionen längst in verschiedenen Anwendungsbereichen etabliert. Insbesondere die Fortschritte des rationalen Enzym-Design ermöglichten, durch genetische oder chemische Modifikation der Enzyme, die Anpassung an unterschiedliche Reaktionsbedingungen und unnatürliche Substrate.^[110-111] Zeitgleich ist auch die Photokatalyse zu einem vielbeachteten Forschungsthema geworden und hat sich als effiziente Alternative für Cycloadditionen, C-H-Aktivierungen und C-C-Bindungsknüpfungen herauskristallisiert.^[112-114] Im Vergleich zur traditionellen Organo- oder Metallkatalyse weist die Photokatalyse eine größere Substratbreite auf und kann bei wesentlich mildereren Bedingungen durchgeführt werden. Aufgrund der stetig wachsenden Reichweite neuer Reaktionen und Photokatalysatoren wird derzeit sogar von der Blütezeit der Photokatalyse gesprochen. In der Photo-Biokatalyse sollen schließlich die Vorteile der beiden intensiven Forschungszweige zusammengeführt und untersucht werden.^[109]

In der Natur gibt es wenig Enzyme, die direkt von Licht abhängig sind. Jedoch gibt es einige redoxaktive Enzyme, die nur mit gewissen Co-Faktoren funktionieren. Diese werden für den Elektronentransport benötigt und müssen meist in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden. An dieser Stelle bietet sich eine Kombination mit der Photokatalyse sehr gut an, da die oft teuren Co-Faktoren photochemisch regeneriert

werden können.^[115-116] Darüber hinaus konnten für einige Enzyme bereits promiskuitive Eigenschaften durch Licht induziert werden.^[117] In anderen Vorgehensweisen der Photo-Biokatalyse wurden Photoreaktionen mit enzymkatalysierten Reaktionen, in einer linearen „one-pot“ Kaskaden-Reaktion vereint (Abbildung 14). Zu den großen Herausforderungen gehören dabei die unterschiedlichen Lösungsmittel Anforderungen der Enzyme und Photokatalysatoren, sowie unvorhersehbare Wechselwirkungen, die z. B. zur Inhibition des Enzyms führen können.^[118]

In einem Ansatz wurde beispielsweise eine photo-biokatalytische Kaskade entwickelt, die den Zugang zu enantioselektiven Aminen erlaubte. Mit Hilfe des Photokatalysators $\text{Na}_3[\text{Ir}(\text{ppy})_3]$ wurden cyclische Imine zunächst in racemische Amine konvertiert, welche im zweiten Schritt durch die Monoamin-Oxidase enantioselektiv in das Imin rückoxidiert wurden. Der wiederholende Zyklus aus nicht-selektiver Reduktion und enantioselektiver Oxidation hat letztlich zu einer Deracemisierung des Produkts geführt.^[119] In einem anderen Beispiel wurde die C-H Funktionalisierung von Alkanen demonstriert. Dafür wurde in einer photokatalytischen Reaktion mit Natrium-Anthrachinonsulfat eine Oxofunktionalisierung von Alkanen zu Ketonen und Aldehyden erreicht. Im zweiten Kaskaden-Schritt wurden die Carbonyl-Verbindungen durch unterschiedliche Enzyme, wie etwa En-Reduktasen, Transaminasen oder Alkohol Dehydrogenasen, biokatalytisch transformiert.^[118]

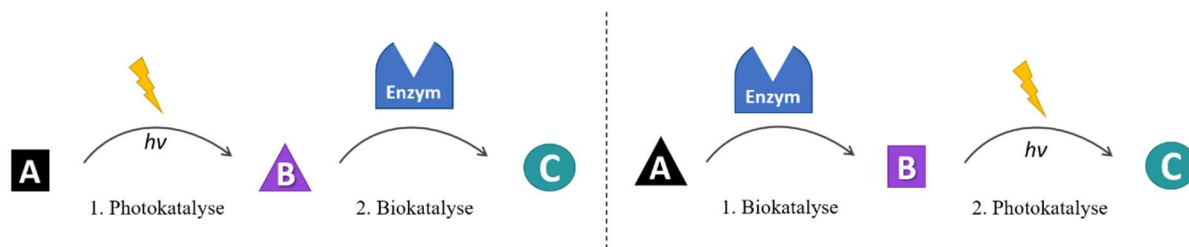


Abbildung 14: Konzept der Photo-Biokatalyse, bei der eine photokatalysierte Reaktion mit einer Bio-transformation in einer Kaskade kombiniert wird.

Zusätzlich zu den oben genannten Ansätzen hält das Forschungsgebiet der Photo-Biokatalyse noch viele Möglichkeiten bereit, die es zu erforschen gilt. Zu diesen zählen unter anderem die Verwendung von Enzymen als chirale Umgebung für eine photokatalytische Reaktion oder die Entwicklung photoschaltbarer Katalysatoren. Des Weiteren würde auch die Inkorporation nicht-natürlicher Aminosäuren oder die gezielte Modifikation bestimmter Aminosäuren zu einer Bereicherung der Photo-Biokatalyse führen. Dadurch könnten photoaktive funktionelle Gruppen oder komplexere Einheiten in ein Enzym eingeführt und damit neue lichtabhängige Reaktionszentren und Biokatalysatoren geschaffen werden.^[109]

3 Zielsetzung

Die bioorthogonale chemische Protein-Modifikation ist eine bedeutende Methode zur Untersuchung enzymatischer Struktur-Funktions-Beziehungen und ermöglicht das Eingreifen in biologische Systeme, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Eine der größten Herausforderungen der Biokonjugation ist zweifellos die chemo- und regioselektive Modifikation einer bestimmten Aminosäure, während gleichzeitig die Proteinintegrität und Funktionalität aufrecht erhalten bleiben. Auch wenn die Literatur bereits ein breites Methodenspektrum für die chemische Enzym-Modifikation bereitstellt, besteht weiterhin der Bedarf nach neuen und breit anwendbaren Methoden, die nicht auf ein spezielles System angepasst wurden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Tyrosin-spezifische chemische Protein-Modifikation am Modell der Levansucrase aus *Bacillus megaterium* (*Bm*) zu entwickeln und mit Hilfe dieser deren Produktspektrum gezielt zu beeinflussen. Über einen multidisziplinären Ansatz, der sowohl chemische, molekularbiologische als auch bioinformatische Methoden beinhaltet, sollte ein tieferes Verständnis für die mechanistischen Abläufe der *Bm*-Levansucrase erlangt werden, um dieses Wissen für das rationale Design des Produktspektrums einzusetzen und damit den Zugang zu maßgeschneiderten Oligosacchariden zu ermöglichen.

Die Modifikation sollte nach dem Prinzip „*Tag and Modify*“ in zwei Schritten erfolgen. Der erste Schritt besteht darin, entweder native oder genetisch eingeführte Tyrosin-Reste über eine En-Reaktion mit einem azidofunktionalisierten Luminol-*Tag* zu modifizieren, welcher im zweiten Schritt eine Click-Reaktion mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zulässt. Da die Aminosäuren in der sogenannten ersten Zone des Enzyms Teil des aktiven Zentrums sind, führen Veränderungen an diesen Positionen zu starken Aktivitäts- und Funktionsverlusten. Deshalb wird der Fokus auf die Modifikation der zweiten und dritten Zone (vgl. Kapitel 2.1, Abbildung 4) der Levansucrase gelegt, um dadurch eine Auswirkung auf das Oligosaccharid-Wachstum zu erreichen. Für einen tieferen Einblick in die intramolekularen Wechselwirkungen und Kontakte zwischen Protein, Substrat und *Tag*, sollten molekulardynamische (MD) Simulationen durchgeführt und zur Interpretation verwendet werden.

Aufgrund der wachsenden Einsatzmöglichkeiten von Levan in pharmazeutischen und biomedizinischen Anwendungen, finden die gezielte Synthese und Modulation der Fructooligosaccharide zunehmend Beachtung. Insbesondere die präbiotischen Eigenschaften, die das Darmmikrobiom positiv beeinflussen, stehen im Fokus der Forschung, da seit geraumer Zeit der Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des Darmmikrobioms und dem Auftreten menschlicher Erkrankungen diskutiert wird. Um

die genaue Funktion von Fructanen in solch einem komplexen System zu erforschen, ist die Verfügbarkeit definierter Fructanlängen eine wichtige Voraussetzung, die in der Praxis vor allem im größeren Maßstab oft mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb beispielhaft die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose mit der *Bm*-Levansucrase Variante K373L synthetisiert und isoliert werden. Der Schwerpunkt galt hierbei der Ausarbeitung eines effektiven und einfachen Protokolls, das auch für die Isolierung weiterer Oligosaccharide herangezogen werden kann.

Um weitere innovative Anwendungsmöglichkeiten der chemischen Modifikation von Enzymen zu erschließen, sollte durch das Forschungsgebiet der Photo-Biokatalyse eine Verbindung zwischen Photokatalyse, Biokatalyse, chemischer Protein-Modifikation und Click-Chemie hergestellt werden. Die Zielsetzung ist die Entwicklung eines neuen Konzeptes für eine lineare photo-biokatalysierte Kaskaden-Reaktion. Dafür sollten zunächst die Grundlagen geschaffen werden: Für den ersten Teil, den enzymatischen Schritt, war die Expression und Reinigung der beiden unterschiedlichen Halogenasen RebH und RadH vorgesehen, die in der Lage sind verschiedene aromatische Substrate zu halogenieren. Zusätzlich sollte aufgrund der Flavin-Abhängigkeit der Halogenasen ein Co-Faktor-Regenerationssystem, bestehend aus der Flavin-Reduktase (Fre) und der Glucose-Dehydrogenase (GDH), hergestellt werden. Der zweite Teil zur Erarbeitung der Kaskaden-Reaktion konzentriert sich auf die Synthese eines clickbaren Photokatalysators. Dieser soll im zweiten Reaktionsschritt das halogenierte aromatische Substrat mit einer Carbonsäure-Verbindung in einer decarboxylierenden C-C-Bindungsknüpfung umsetzen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Selektive Tyrosin-spezifische Modifikation der *Bm*-Levansucrase

4.1.1 Entwicklung einer selektiven Modifikationsmethode an nativen Tyrosinen

Die meisten literaturbekanntesten Untersuchungen zu Levansucrasen aus unterschiedlichen Organismen widmen sich insbesondere den Aminosäuren, die in direktem Kontakt mit dem Substrat Saccharose stehen oder zumindest in der nächsten Umgebung positioniert sind. Diese Aminosäuren gehören zu der sogenannten ersten oder zweiten Zone der GH68-Enzyme, in denen auch bestimmte Bindungsmotive für die wachsende Oligosaccharid-Kette ausfindig gemacht wurden. Mutationen an diesen Positionen führen meist zu kürzeren Fructanlängen und gehen oft mit einem drastischen Aktivitätsverlust einher. Am Beispiel der Levansucrase aus *Bacillus megaterium* konnte gezeigt werden, dass die anfänglichen Wechselwirkungen zwischen dem wachsenden Oligosaccharid und der Proteinoberfläche eine entscheidende Rolle für den Elongationsprozess spielen.^[16, 28]

Bislang ist es jedoch nicht gelungen das Produktspektrum einer Levansucrase derart zu beeinflussen, dass durch strukturelle Manipulationen entweder eine prozessive oder nicht-prozessive Katalyse induziert werden konnte oder gewisse Oligosaccharide in einem großen Überschuss produziert wurden, während das Transfer/Hydrolyse-Verhältnis unverändert blieb.^[18]

Nun stellte sich die Frage, welchen Einfluss die selektive chemische Modifikation der nativen Bindungsmotive auf die Fructansynthese hat und welche mechanistischen Effekte sich aus der artifiziellen Generierung neuer Bindungsstellen ergeben. Um ausgewählte Positionen oder genetisch eingeführte Aminosäuren selektiv durch einen chemischen Ansatz zu modifizieren, musste zunächst eine geeignete Methode für die Protein-Modifikation ausgearbeitet werden. Basierend auf der Arbeit von Sato *et al.*, wurde an dieser Stelle eine Tyrosin-spezifische Modifikations-Reaktion gewählt. Nach dieser Methode reagiert ein Luminol-Derivat über einen En-artigen Mechanismus mit exponierten Tyrosin-Resten des Proteins, wobei Hemin und Wasserstoffperoxid als *in situ* Oxidationsmittel vorgesehen sind.^[90] Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit das Luminol-Derivat **1** verwendet, das eine endständige Alkin-Gruppe aufweist und somit eine 1,3-dipolare Cycloaddition im zweiten Modifikationsschritt ermöglicht (Abbildung 15).

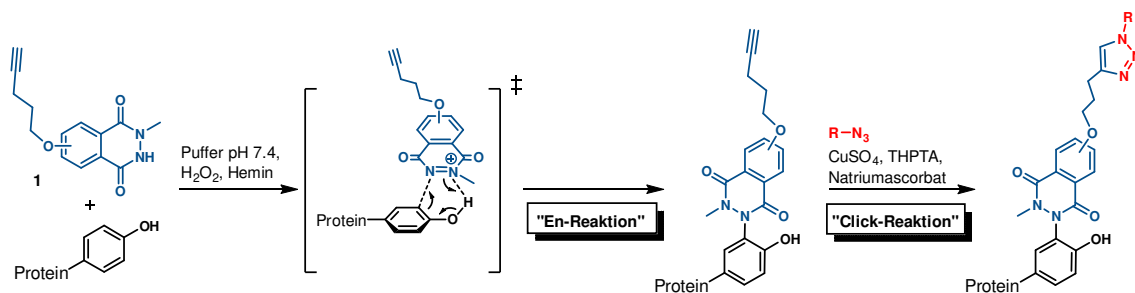


Abbildung 15: Tyrosin-spezifische Biokonjugationsstrategie in zwei Modifikationschritten. Der erste Schritt verläuft über eine En-Reaktion, während der zweite Schritt durch eine Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) erfolgt.

Als Modellprotein diente die Levansucrase aus *Bacillus megaterium*, die nach heterologer Expression in *E. coli* ausschließlich kurze Oligosaccharide mit einem Oligomerisationsgrad von 2-20 Fructose-Einheiten synthetisiert. Die *Bm*-Levansucrase besitzt insgesamt 25 Tyrosin-Reste, von denen die Tyrosine Y41, Y196, Y247, Y281 und Y446 durch ihre exponierte Position am leichtesten für eine chemische Modifizierung zugänglich sind (Abbildung 16).

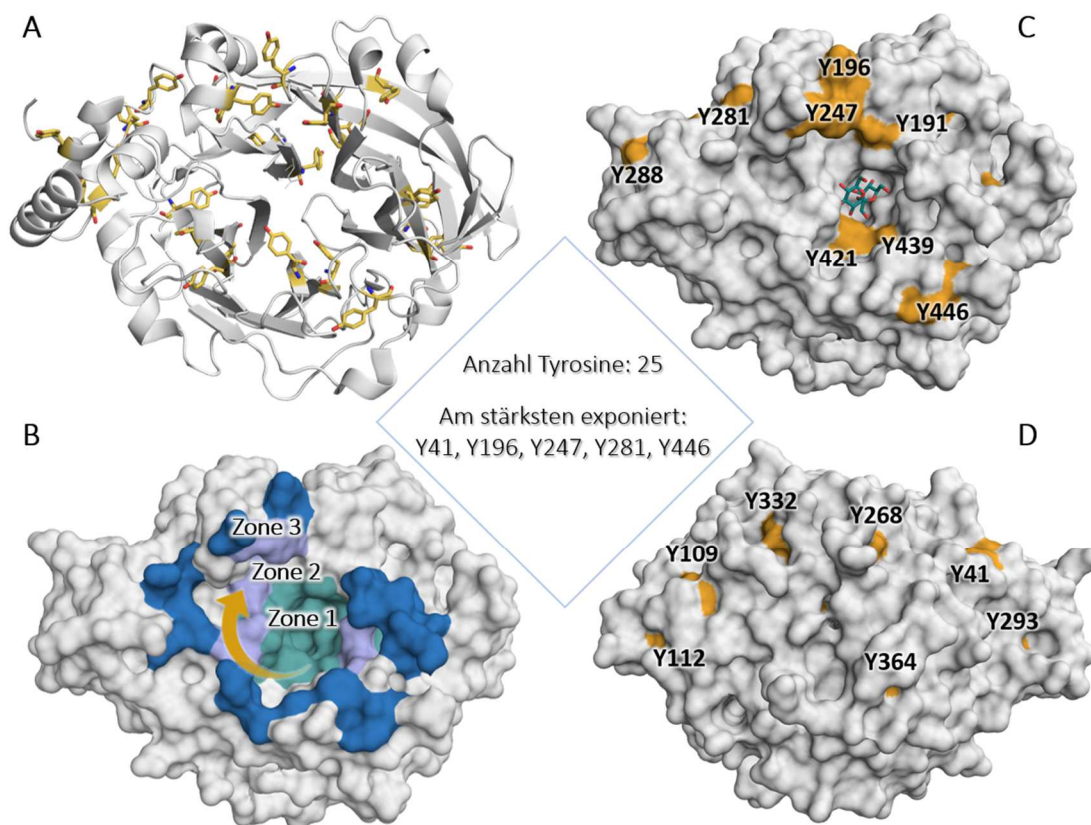


Abbildung 16: Darstellungen der *Bm*-Levansucrase (PDB 3om2). A) In der Cartoon-Darstellung wurden alle Tyrosine als gelbe Sticks markiert. B) Die Oberflächendarstellung zeigt die Einteilung der Levansucrase in 3 Zonen und den Wachstumsverlauf der Oligosaccharide als gelben Pfeil. C, D) Veranschaulichung der Exponiertheit aller Tyrosine (gelb) in der Front- und Rückansicht.

Zu Beginn wurden die ersten Tyrosin-Modifikations-Reaktionen mit dem Wildtyp der *Bm*-Levansucrase, Hemin, H₂O₂ und der Luminol-Verbindung **1** in Phosphatpuffer durchgeführt. Um die Aktivität und den Modifikationsgrad der Enzyme im Verlauf der Reaktionszeit zu überprüfen, wurden nach 0, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden Proben entnommen und massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 17, Anhang Abbildung 72). Zur Aktivitätsbestimmung wurde parallel eine Blindprobe analysiert, die alle Komponenten außer dem Luminol-Derivat **1** enthielt. Dadurch sollte die oxidative Schädigung des WT-Enzyms durch den Einsatz von Hemin und H₂O₂ untersucht werden.

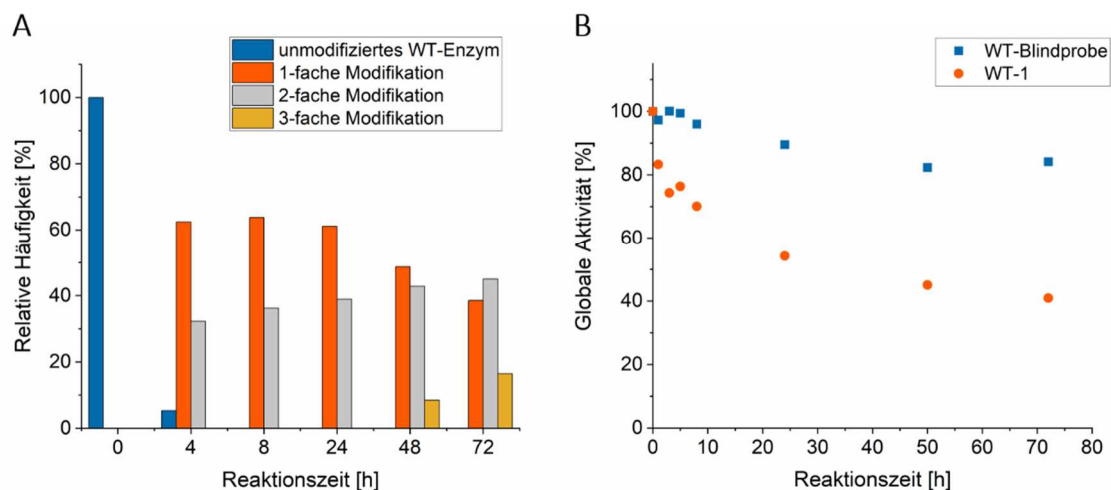


Abbildung 17: Analyse der Tyrosin-Modifikations-Reaktion mit der Wildtyp-Variante (WT) der *Bm*-Levansucrase im Verlauf der Reaktionszeit von 0-72 h. A) Entwicklung der Modifikationsrate des WT-Enzyms mit der Luminol-Verbindung **1** nach unterschiedlichen Zeitpunkten. B) Auswirkung der Tyrosin-Modifikation auf die Aktivität des Enzyms. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Aus den Massenspektren geht hervor, dass die Tyrosin-Modifikation bereits nach 4 Stunden fast vollständig abgeschlossen war. Rund 5 % des WT-Enzyms waren zu diesem Zeitpunkt noch unmodifiziert, während 62 % einfach und 32 % zweifach mit dem Luminol-Tag **1** modifiziert waren. Längere Reaktionszeiten erhöhten zum Einen die prozentuale Modifikationsrate, derweil traten nach 48 Stunden auch dreifach Modifikationen auf, und zum Anderen nahm die globale Aktivität des WT-Enzyms stetig ab. Hierbei fiel auf, dass auch die Blindprobe einen Aktivitätsverlust von 15 % aufwies. Um herauszufinden, welche Tyrosin-Reste während der Reaktion tatsächlich modifiziert wurden oder um festzustellen, welche Nebenreaktionen stattfanden, die möglicherweise die Enzymaktivität beeinflussen könnten, wurde ein Enzymverdau mit Elastase durchgeführt und die resultierenden Peptidfragmente mittels NanoLC-MS/MS analysiert (Abbildung 18, Anhang Abbildung 73).

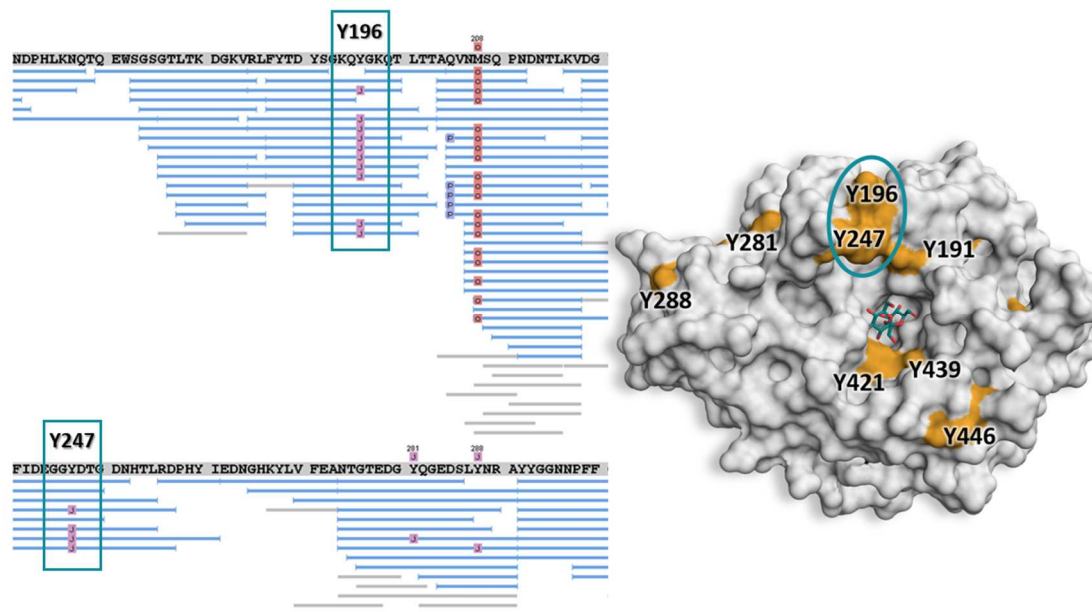


Abbildung 18: Ausschnitt aus NanoLC-MS/MS Analyse der chemischen Tyrosin-Modifikation der WT-Levansucrase mit Luminol-Verbindung **1** nach dem Elastaseverdau. Eine erfolgreiche Modifikation mit **1** ist in der Abbildung als pink markiertes „J“ dargestellt. Oxidationsreaktionen wurden als rot markiertes „O“ hervorgehoben. In der Oberflächendarstellung der *Bm*-Levansucrase wurden die Positionen der Aminosäure Y247 und Y196 mit einem türkisen Kreis gekennzeichnet.

Der Elastaseverdau und die anschließende massenspektrometrische Untersuchung der erhaltenen Peptidfragmente ließ zwei Rückschlüsse zu: Die Tyrosin-spezifische Biokonjugation mit Luminol-*Tag 1* erfolgte hauptsächlich an den Tyrosin-Resten Y196 und Y247, während andere Tyrosin-Reste wie z. B. Y41, Y109 und Y446 in einem geringeren Ausmaß modifiziert wurden. Eine kaum signifikante Konjugation wurde für Tyrosin Y224, Y281, Y439 und Y288 beobachtet (Anhang Abbildung 73). Die zweite Schlussfolgerung ermöglichte es, einen Zusammenhang zwischen der oxidativen Schädigung des Enzyms und dem Aktivitätsverlust in der Blindprobe herzustellen. Dementsprechend war die Oxidation von Methionin und die damit verbundene Strukturveränderung der Enzymoberfläche höchstwahrscheinlich der Grund für eine geringere katalytische Aktivität. Im Vergleich zur Blindprobe nahm die Aktivität des modifizierten Enzyms *Bm*-LS-WT-**1** um weitere 40 % ab, was ebenfalls auf Struktur-Funktions-Störungen durch ungewollte Biokonjugationen nahe des aktiven Zentrums zurückgeführt werden kann.

Das Produktspektrum aller Levansucrase-Varianten wurde für den Bereich kurzkettiger Fructooligosaccharide ionenchromatographisch mit einer Dionex ICS 5000+ analysiert und für eine weitläufigere Separierung und zur Detektion größerer Levanprodukte mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) getrennt.

Für die modifizierte WT-Variante wurden marginale Mengen eines hochmolekularen Levanprodukts mit einer Molekularmasse von $2,3 \cdot 10^6$ Da beobachtet sowie eine Beschränkung der Oligosaccharid-Kettenlänge auf maximal 12 Fructosyl-Einheiten. Hingegen dazu synthetisierte das Enzym der Kontrollreaktion ausschließlich Oligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 2-20 Fructose-Einheiten (Abbildung 19).

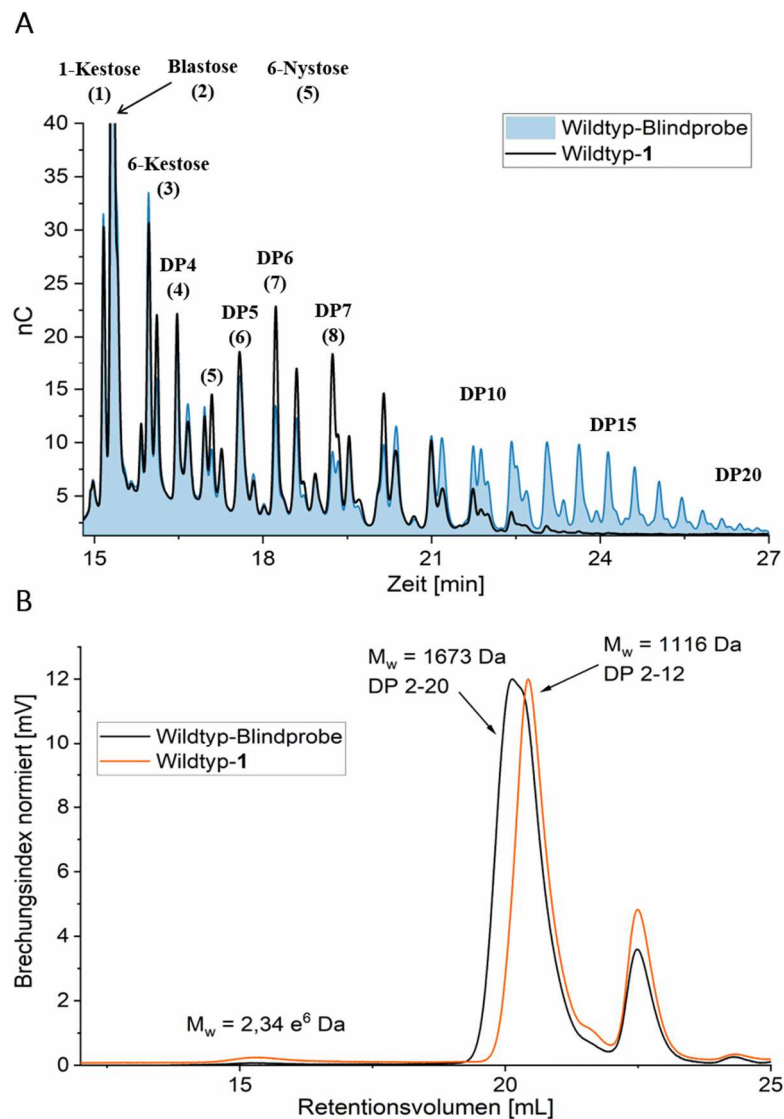


Abbildung 19: Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung **1** auf das Produktprofil des *Bm*-LS-WT. A) HPAEC-PAD-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch das unmodifizierte oder modifizierte Enzym synthetisiert wurden. B) Oligosaccharid/Levan-Trennung durch GPC-Messungen. Die Reaktionen wurden mit der gleichen enzymatischen Aktivität ($3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) durchgeführt und bei äquivalenter Saccharose-Konzentration gestoppt. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Da die chemische Modifikation vorzugsweise an den Tyrosinen Y196 und Y247 erfolgte, sollte im nächsten Schritt festgestellt werden welchen Beitrag jede einzelne Aminosäure

zur Veränderung des Produktprofils leistet und inwieweit die beobachtete Änderung auch auf die Konjugation anderer Tyrosin-Reste zurückgeführt werden kann. Hierfür wurden die Enzym-Varianten Y196F und Y247F konstruiert, indem das jeweils andere Tyrosin durch eine Phenylalanin-Gruppe gentechnisch substituiert wurde. Die Aminosäure Phenylalanin wurde gewählt, weil sie dem Tyrosin mit dem Phenylrest am ähnlichsten ist und somit die Funktionalität des Enzyms auch nach der Mutagenese beibehalten werden kann. Zusätzlich wurde die Doppelmutante Y196F/Y247F hergestellt, so dass der Einfluss anderer Aminosäuren, die in einem geringeren Ausmaß modifiziert wurden, überprüft werden konnte. Anschließend wurde das Produktspektrum aller unmodifizierten und modifizierten Enzym-Varianten verglichen.

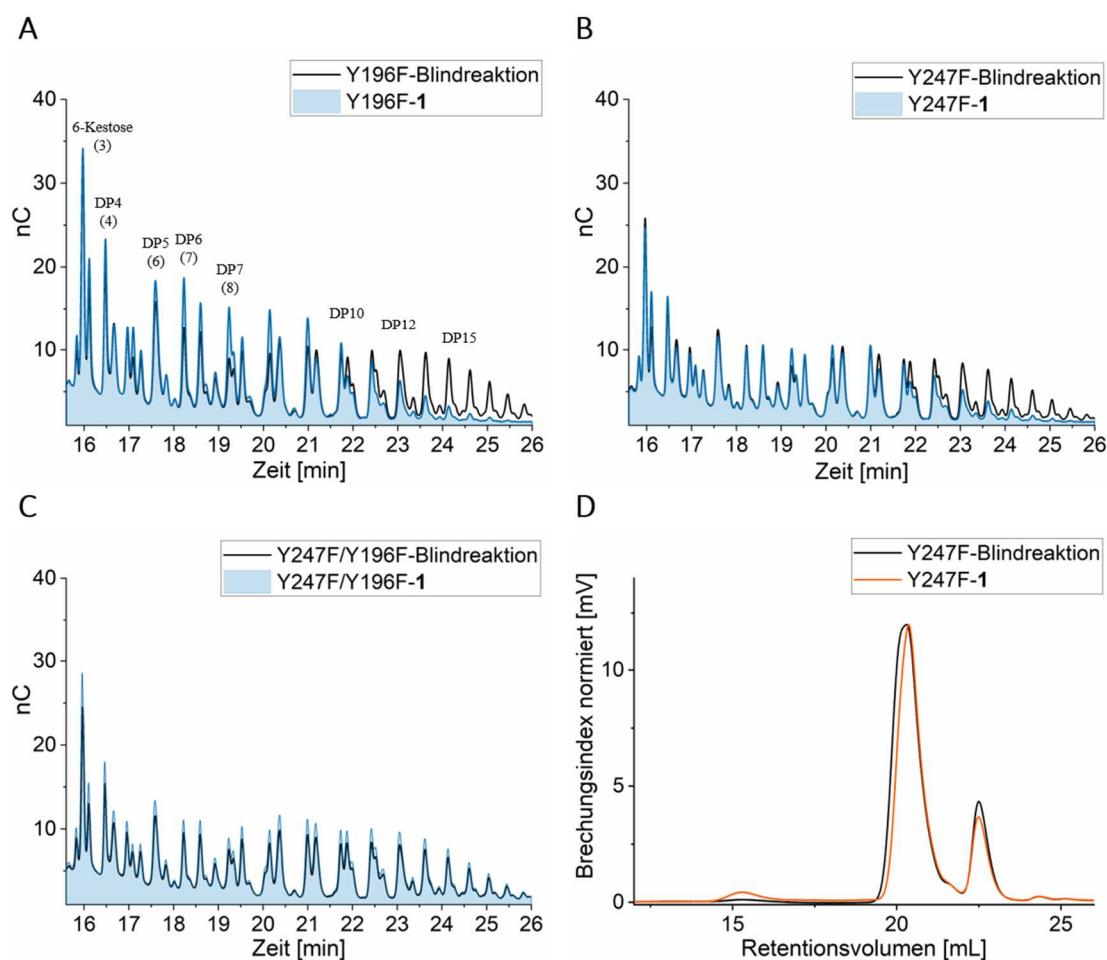


Abbildung 20: HPAEC-PAC-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch modifizierte (*Tag 1*) und unmodifizierte Varianten A) Y196F, B) Y247F und C) Y196F/Y247F synthetisiert wurden und D) GPC-Analyse der Produktverteilung von Variante Y247F und Y247F-1. Die Reaktionen wurden mit der gleichen enzymatischen Aktivität ($3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) durchgeführt und bei äquivalenter Saccharose-Konzentration gestoppt. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Die ionenchromatographische Analyse der Produktprofile bestätigte, dass die Änderungen der Oligosaccharid-/Levan-Synthese hauptsächlich durch die Modifikation

der Tyrosine Y247 und Y196 verursacht wurden. Den Ergebnissen zufolge können die Auswirkungen der Tyrosin-Modifikation auf die Produktspezifität der Wildtyp-Variante *Bm-LS-WT-1* zwei unterschiedlichen Effekten zugeschrieben werden. Die Modifikation von Tyrosin Y196 mit dem Luminol-*Tag 1* (entspricht Variante Y247F-1) stimuliert zu einem geringen Grad die Synthese von großen Polymeren (Abbildung 20D) und verringert andererseits die Anhäufung von Fructanprodukten mit einem Polymerisationsgrad zwischen 12-20 Fructose-Einheiten (Abbildung 20B). Im Vergleich dazu führt die Modifikation von Y247 (Variante Y196F-1) ebenfalls zur Verminderung der Oligosaccharid-Synthese zwischen DP 10-20, jedoch werden anstatt hochmolekularem Levan, kurzkettige Fructane zwischen DP 4-10 stärker akkumuliert als in der unmodifizierten Variante Y196F (Abbildung 20A).

Das Produktprofil der Doppelmutante Y247F/Y196F-1 bleibt erwartungsgemäß unverändert und beweist, dass die geringfügige Biokonjugation zusätzlicher Tyrosin-Reste keinen Einfluss auf die Produktverteilung nimmt (Abbildung 20C). Da sich die Modifikationen der beiden Tyrosine Y247 und Y196 in der WT-Variante zu stark oder unkontrollierbar gegenseitig beeinflussen könnten, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst mit der Enzym-Variante Y247F gearbeitet. Die geringen Mengen hochmolekularen Levans nach der ersten Modifikationsrunde mit Y247F und Luminol-*Tag 1* ließen die Vermutung zu, dass dieser Effekt durch eine zusätzliche chemische Derivatisierung verstärkt werden könnte. Aus diesem Grund wurde die endständige Alkin-Gruppe der Luminol-Verbindung im zweiten Biokonjugations-Schritt durch eine Kupfer(I)-katalysierte 1,3-Cycloaddition mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid (AzGlc) erweitert. Durch den hinzukommenden Glucopyranosid-Rest wurden stärkere Wechselwirkungen der Seitenkette 1-AzGlc sowohl mit der Proteinoberfläche als auch mit dem wachsenden Polymer erwartet.

Diese Annahme ließ sich schließlich durch die GPC-Analyse des Produktprofils von Y247F-1-AzGlc bestätigen. Nach der erfolgten Click-Reaktion wurde eine signifikante Produktverschiebung von kurzkettigen Oligosacchariden hin zu hochmolekularem Levan beobachtet (Abbildung 21). Das Levan-Polymer und die erwartete $\beta(2\rightarrow6)$ Verknüpfung der Fructosyl-Einheiten wurde ergänzend mittels NMR-Spektroskopie überprüft und nachgewiesen (Anhang Abbildungen 54, 55).^[41]

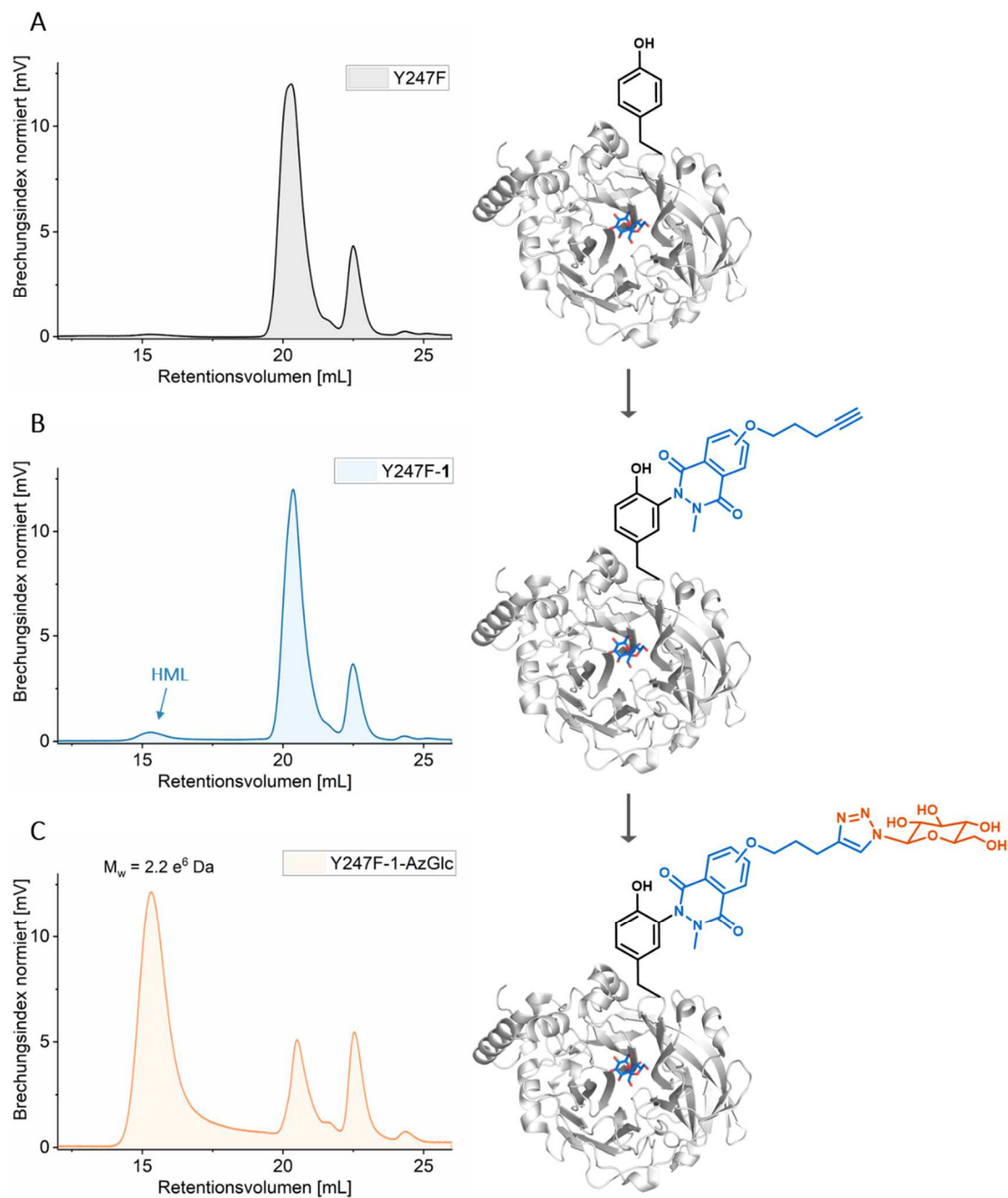


Abbildung 21: Auswirkung der zweistufigen Tyrosin-spezifischen Modifikation auf das Produktspektrum der Variante Y247F. A) unmodifizierte Variante Y247F; B) nach der Modifikation mit **1** produziert Y247F-**1** geringe Mengen hochmolekularen Levans (HML); C) die Click-Reaktion mit Azidoglucose (AzGlc) induziert bei Variante Y247F-**1**-AzGlc eine drastische Produktverschiebung von Oligosacchariden hin zu Levan-Polymer. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.* [41]

Um den Modifikationsgrad des Enzyms Y247F-**1**-AzGlc zu ermitteln, wurde analog zur modifizierten WT-Variante ein Elastaseverdau durchgeführt und die entstandenen Peptidfragmente mit Hilfe der NanoLC-MS/MS Methode vermessen (Abbildung 22, Anhang Abbildung 74). Die verwendete Messmethode dient zwar nicht der exakten

quantitativen Bestimmung der Modifikationsrate, ermöglicht aber eine Aussage über Tendenzen. So wurde in diesem Fall zum Beispiel eine große Übereinstimmung mit der zuvor modifizierten und untersuchten WT-Levansucrase festgestellt. Die erste Modifikation mit Luminol-*Tag 1* führte ähnlich wie beim WT zu denselben Nebenreaktionen mit Tyrosin Y41, Y109, 281 und Y288, die in sehr geringem Umfang konjugiert wurden. Die erwünschte chemische Modifikation an Tyrosin Y196 erfolgte mit einem Umsatz von etwa 70 %. In der zweiten Modifikationsrunde wurden durch die Click-Reaktion mit AzGlc ca. 78 % des eingeführten *Tags 1* erfolgreich derivatisiert.

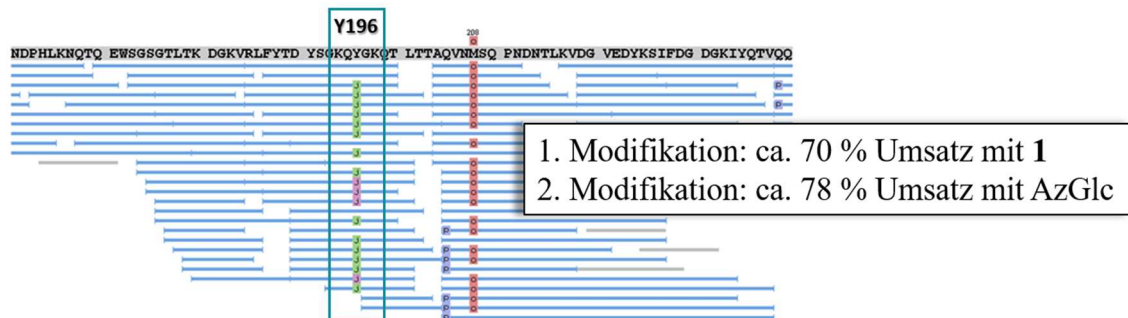


Abbildung 22: Ausschnitt aus NanoLC-MS/MS Analyse der chemischen Tyrosin-Modifikation der Variante Y247F mit Luminol-*Tag 1* und AzGlc nach dem Elastaseverdau. Die Modifikation mit **1** ist in der Abbildung als pink markiertes „J“ dargestellt und die erfolgreiche Derivatisierung nach der Click-Reaktion mit AzGlc ist mit einem grün markierten „J“ hervorgehoben.

Der zweite Modifikationsschritt mit der Azidoglucose führte neben der bemerkenswerten Produktverschiebung auch zu einer 1,5-fachen Steigerung des Transfer/Hydrolyse-Verhältnisses. Demnach lag die Transfer-Rate von Enzym-Variante Y247F-**1**-AzGlc bei 46 %, wohingegen das einfach modifizierte Enzym Y247F-**1** lediglich 29 % Transfer während der Oligosaccharid-Synthese aufwies (Tabelle 1). Die Transferaktivität von Fructosyltransferasen steht in direktem Zusammenhang mit der Fähigkeit eines Enzyms, eine prozessive Katalyse durchzuführen und ist damit auch die Voraussetzung zur Polymersynthese. Da ein prozessiver Transfermechanismus zudem eine konstante Interaktion zwischen Enzym und heranwachsendem Polymer erfordert, ist es sehr wahrscheinlich, dass der eingeführte *Tag 1*-AzGlc im Vergleich zur kürzeren Seitenkette, nur Luminol-Derivat **1**, stärkere Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym begünstigt.^[30] Dies könnte entweder durch sterische Einflüsse oder durch dipolare Wechselwirkungen hervorgerufen werden.

Tabelle 1: Hydrolyse/Transfer-Verhältnis der Enzym-Varianten Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc. Die Reaktionen wurden in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 3 U mL⁻¹ enzymatischer Aktivität und 0,5 M Saccharose durchgeführt. Der Monosaccharid-Gehalt der Fructose und Glucose wurde mittels HPAEC-PAD-Analyse nach 24 und 48 Stunden Reaktionszeit gemessen.^[41]

	Glucose [mM]	Fructose [mM]	Glc-Fru [mM]	Hydrolyse [%]	Transfer [%]	Hauptprodukt
Y247F-1-24 h	414,78	300,03	114,74	72,33	27,66	Oligosaccharide
Y247F-1-48 h	457,44	324,99	132,44	71,04	28,95	Oligosaccharide
Y247F-1-AzGlc-24 h	405,17	230,92	174,24	57,00	43,00	HML Polymer
Y247F-1-AzGlc-48 h	454,51	246,41	208,10	54,21	45,78	HML Polymer

Die Biokonjugation mit Luminol-Verbindung **1** führte bei allen Enzym-Varianten WT, Y247F, Y196F, und Y247F/Y196F zu ähnlichen Auswirkungen auf die katalytischen Parameter. So verringerte sich die katalytische Geschwindigkeit k_{cat} bei allen Varianten um ca. 40 %, während die Substrataffinität K_M nur kleine Schwankungen aufzeigte. Nichtsdestotrotz lag die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M und die globale Aktivität der modifizierten Enzyme im Vergleich zu Levansucrasen anderer Organismen immer noch in einem hohen Bereich.^[120] Die Verlängerung des Luminol-*Tags* durch die Click-Reaktion mit Azidoglucose verursachte bei Variante Y247F-1-AzGlc zwar eine geringere Substrataffinität, doch gegenläufig wurde eine verbesserte Geschwindigkeitskonstante k_{cat} erhalten, die vermutlich auf die Umstellung zu einer prozessiven Katalyse zurückgeführt werden kann.^[41]

Tabelle 2: Katalytische Parameter von Tyrosin-modifizierten und unmodifizierten Levansucrase-Varianten mit Saccharose als Substrat. Die katalytischen Konstanten spiegeln die globale Aktivität (Hydrolyse und Transfer) wider.^[41]

Enzym	k_{cat} [S ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ s ⁻¹]
WT-Blindreaktion	247,8 ± 6,9	21,2 ± 2,7	11,7
WT-1	131,0 ± 5,0	19,2 ± 3,6	6,8
Y247F- Blindreaktion	254,2 ± 3,5	21,9 ± 1,3	11,6
Y247F-1	153,6 ± 3,7	24,5 ± 2,6	6,3
Y247F-1-AzGlc	172,1 ± 2,8	43,1 ± 2,8	3,9
Y196F- Blindreaktion	285,9 ± 2,8	29,8 ± 1,2	9,6
Y196F-1	173,3 ± 3,4	48,1 ± 3,6	3,6
Y247F/Y196F- Blindreaktion	308,7 ± 6,7	16,7 ± 1,7	18,4
Y247F/Y196F-1	204,9 ± 4,8	17,6 ± 1,9	11,6

Um sicherzustellen, dass die erhebliche Produktverschiebung von Y247F-1-AzGlc tatsächlich das Resultat der gezielten chemischen Tyrosin-Modifikation ist und nicht das Ergebnis unbeachteter Effekte, wurden vertiefte Untersuchungen durchgeführt.

Durch die zweifach modifizierte Doppelmutante Y247F/Y196F-1-AzGlc sollte überprüft werden, ob die Änderung des Produktprofils allein durch die Konjugation der Aminosäure Y196 (Variante Y247F) induziert wurde, oder ob eventuell unspezifische Tyrosin-Modifikationen einen Einfluss haben könnten. Nach Größenausschluss-Trennung (GPC) der erhaltenen Produkte mit Y247F/Y196F-1-AzGlc, wies das Chromatogramm nur marginale Mengen des Levan-Polymers auf, weshalb die Produktverschiebung durch andere ungewollt modifizierten Tyrosin-Reste eindeutig ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 23A).

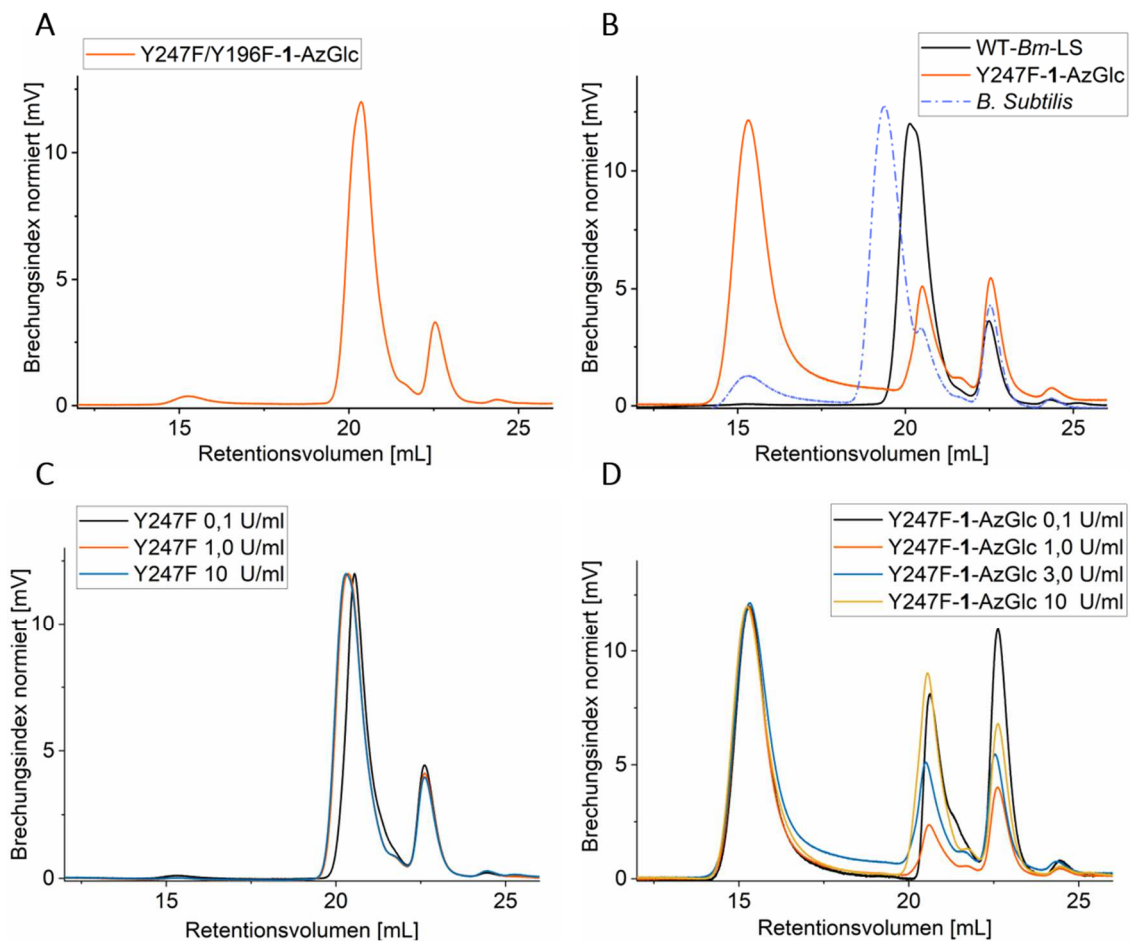


Abbildung 23: Weiterführende GPC-Analysen unterschiedlicher Levansucrase Produktspektren. A) Produktverteilung der Doppelmutante Y247F/Y196F-1-AzGlc nach zweifacher Modifikation. B) Vergleich der Produktspektren von *B. megaterium* WT, *B. subtilis* WT und Y247F-1-AzGlc. C) Produktspektren der Variante Y247F bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM . D) Produktspektren der Variante Y247F-1-AzGlc bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM . Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

In der Literatur sind außerdem einige Beispiele beschrieben, in denen das Produktprofil einer Levansucrase durch einfache Variationen der Reaktionsparameter beeinflusst oder sogar drastisch verändert wurde. Darunter gehören die Einstellung unterschiedlicher pH-Werte, die Erhöhung der Salzkonzentration, die Anpassung der Reaktionstemperatur sowie die Veränderung der Enzymkonzentrationen.^[18, 33, 36]

Ein Vergleich der WT Levansucrasen aus *B. megaterium*, *B. subtilis* und der Variante Y247F-1-AzGlc zeigt die typische bimodale Produktverteilung der *B. subtilis* Levansucrase, die eine 74 % ige Identität der Aminosäuresequenz aufweist (Abbildung 23B). Durch Variation der Enzymkonzentration konnte im Fall der Levansucrase aus *B. subtilis* festgestellt werden, dass Konzentrationsänderungen entscheidend für Protein-Protein oder Protein-Substrat Wechselwirkungen sein können. Eine geringere Konzentration von 0,1 μM führte hier zu stabileren Wechselwirkungen zwischen der wachsenden Fructankette und der Proteinoberfläche und erlaubte somit eine prozessive Polymersynthese. Während bei der typischen Enzymkonzentration von 1 μM sowohl Oligosaccharide als auch Levan-Polymer erhalten wurde, führte eine Konzentration > 10 μM zur Beeinträchtigung der Substratbindung und damit zur ausschließlichen Produktion kleiner Oligosaccharide.^[36-37]

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für die *Bm*-Levansucrase-Varianten Y247F und Y247F-1-AzGlc der Einfluss unterschiedlicher Enzymkonzentrationen auf das Produktprofil ermittelt. Die GPC-Analysen beider Enzymvarianten zeigten im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 - 10 μM keine signifikante Veränderung des Syntheseverhaltens. Für das unmodifizierte Enzym Y247F wurden bei jeder Konzentration identische Produktverteilungen erhalten und für Y247F-1-AzGlc kam es nur im Oligosaccharid-Bereich zu kleinen Schwankungen, die allerdings auch durch die Reinigungsschritte vor der Größenausschluss-Chromatographie entstehen könnten (Abbildung 23C, D).

Ein weiterer wichtiger Faktor stellt ferner die Einstellung des pH-Wertes während der Levansynthese dar, wie im Falle der Levansucrase aus *Zymomonas mobilis* gezeigt wurde. Den Ergebnissen zufolge führten pH-Werte über 7 zur Ausbildung von Enzym-Dimeren, die hauptsächlich die Hydrolyse und Synthese kurzkettiger Fructane katalysierten, wohingegen pH-Werte unter 6 die Bildung aktiver Protein-Aggregate und -Mikrofibrillen auslösten. Diese großen Protein-Aggregate aus 6-8 Proteineinheiten schafften eine Art neues Gerüst und Bindungsstellen für die wachsende Fructankette und ermöglichte dadurch die Synthese von Levan-Polymer.^[121]

Die chemische Modifikations-Reaktion hat in der Tat zur Protein-Aggregation bei Y247F-1-AzGlc geführt, jedoch wurden monomere Varianten von Protein-Aggregaten

mittels Größenausschluss-Chromatographie separiert und die jeweilige Produkt-Verteilung miteinander verglichen. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen der heterogenen Enzymprobe und der monomeren Variante. Darüber hinaus wurde das pH-Optimum des WT, des unmodifizierten Enzyms Y247F und der Variante Y247F-1-AzGlc bestimmt, um andere pH-abhängigen Einflüsse zu untersuchen. Da auch hier keine bedeutsame Abweichung gefunden wurde, konnte eine Korrelation zwischen pH-Wert und Verschiebung des Produktprofils ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 24).

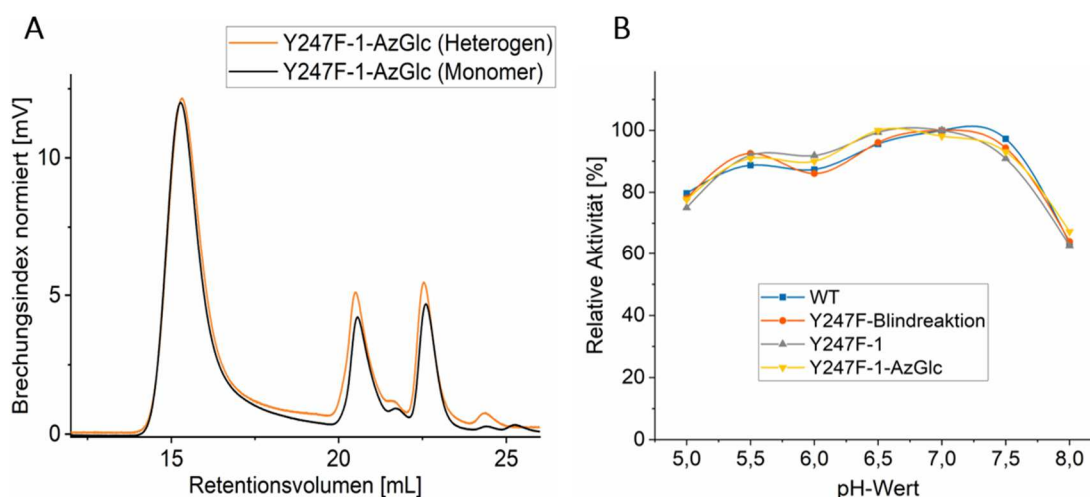


Abbildung 24: A) Vergleich der Produktspektren von heterogener Proteinprobe mit Protein-Aggregaten und monomere Protein Probe. B) pH-Optimum der Varianten WT, Y247-Blindprobe, Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Zusammenfassend spielten unter den möglichen Reaktions-Parametern weder die Konzentration noch der pH-Wert oder Protein-Aggregationen eine wichtige Rolle für die außergewöhnliche Veränderung der Produkt-Verteilung von Variante Y247F-1-AzGlc.^[41] Folglich lag es nahe, die unmittelbare Auswirkung des eingeführten *Tags* 1-AzGlc auf die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Protein und Substrat näher zu betrachten. Die Dissoziationskonstante K_d ist für diesen Zweck eine aussagekräftige Variable, die durch unterschiedliche Methoden ermittelt werden kann. Zu diesen gehören z. B. die *Isotherme Titrationskalorimetrie* (ITC), die eine direkte Bestimmung der Bindungsaffinität des Substrats zulässt und die *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF), welche die Protein-Substrat-Interaktionen indirekt über die Thermostabilität des Proteins in Gegenwart des Bindungspartners ermittelt. Da sich die Bindungsaffinität des Levansucrase-Systems in einer sehr niedrigen Größenordnung ($K_a < 10^4 \text{ M}^{-1}$) befindet, blieben Bemühungen zur Messung der Dissoziationskonstante mittels ITC erfolglos.^[36] Aus diesem Grund wurde die DSF-Methode herangezogen. Sie basiert darauf, dass die Faltung eines Proteins oft durch die Bindung eines Substrats stabilisiert wird, was sich schließlich in einer erhöhten Thermostabilität des Proteins äußert. Zur Durchführung des

Experiments werden in Anwesenheit eines fluoreszierenden Proteinfarbstoffs (z. B. SYPRO Orange) unterschiedliche Verdünnungsstufen des Substrats in verschiedenen Versuchsansätzen zum Protein zugegeben. Anschließend wird die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen, wobei eine Temperaturerhöhung zur Inkorporierung des Farbstoffs in die Proteinstruktur führt und damit auch zu Änderungen der Fluoreszenz. Nach der Methode von Vivoli *et al.* kann aus der Fluoreszenzkurve letztlich die Schmelztemperatur in Abhängigkeit vom Substrat und die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden (Abbildung 25).^[122]

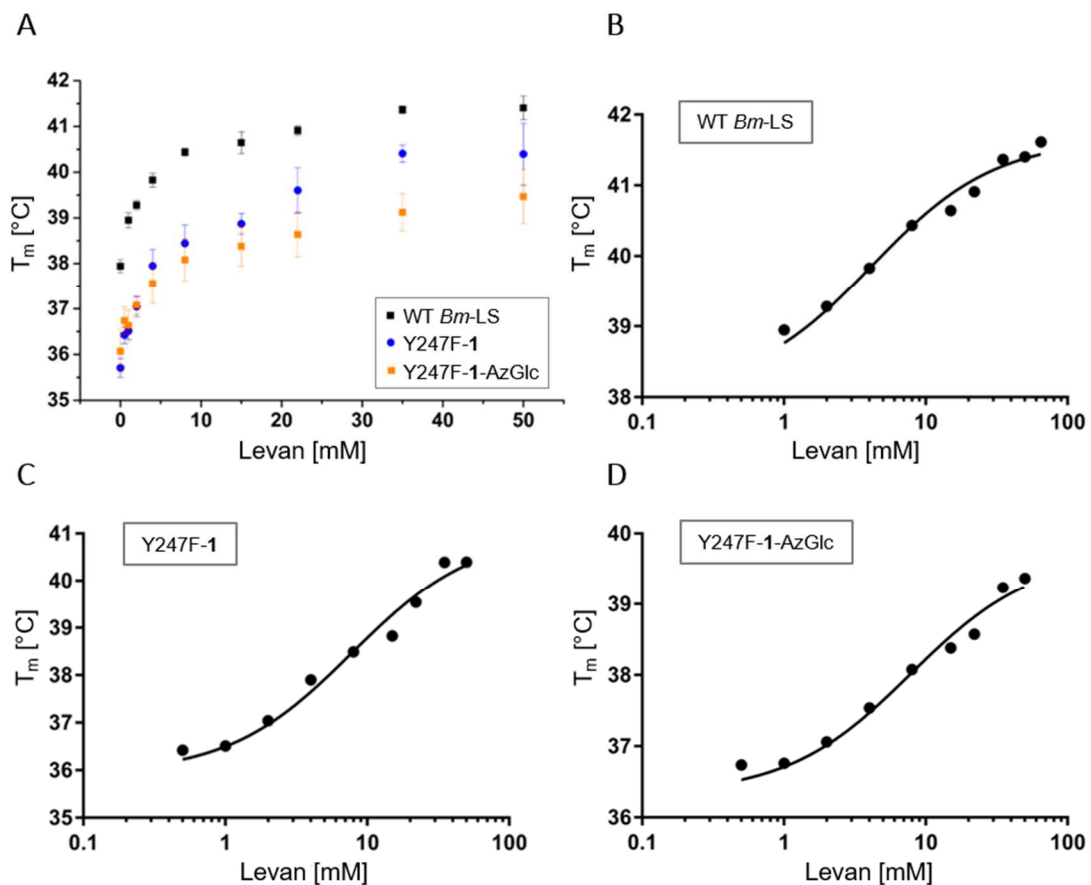


Abbildung 25: A) Schmelztemperaturen T_m von WT-*Bm*-LS, Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc, erhalten durch Differential Scanning Fluorimetry (DSF) bei verschiedenen Levankonzentrationen. Modellierung der Schmelztemperaturen für die *single site* Ligandenbindung mit Hilfe der Software GraphPad Prism.^[122]; B) WT-*Bm*-LS, C) Y247F-1 und D) Y247F-1-AzGlc. Die berechneten K_d -Werte für Levan betragen 4,1 mM für WT-*Bm*-LS und 7,8 mM für Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

In den DSF-Messungen wurden die Dissoziationskonstanten des WT, der Variante Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc ermittelt. Als Substrat wurde ein kurzkettiges Levangemisch mit einer durchschnittlichen Größe von 1,4 kDa (DP 9) verwendet. Die errechneten K_d -Werte lagen für den WT bei 4,1 mM und für beide modifizierten Varianten bei 7,8 mM. Im Fall der *B. subtilis* Levansucrase wurde ein ähnlicher K_d -Wert von 1,8 mM

bei einer durchschnittlichen Levangröße von DP 16 ermittelt.^[36] Dies spricht dafür, dass die erhaltenen Werte plausibel sind. Die Dissoziationskonstanten der chemisch modifizierten Enzyme liegen zwar in derselben Größenordnung wie die der WT-Variante, jedoch deutet ein höherer Wert auf eine schwächere Bindung hin. Zwischen den Varianten Y247F-**1** und Y247F-**1**-AzGlc konnte kein Unterschied in der Bindungsaffinität festgestellt werden. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die zweite Modifikation kleine, aber signifikante Änderungen in der Substratbindung stattgefunden haben, die zur Synthese des Fructan-Polymers beitragen. In diesem Kontext sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Art der Wechselwirkungen, die sich aus der Inkubation von bereits gebildetem Levan mit der Levansucrase ergeben, nicht zwangsläufig den Protein-Substrat Wechselwirkungen ähneln, die während der *in situ* Synthese stattfinden. Sobald die Oligosaccharide die Bindungstasche verlassen, können ihre Strukturen Konformationsänderungen erfahren, die eine erneute Bindungsbildung verhindern könnten. Da durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten keine eindeutigen bzw. signifikanten Unterschiede zwischen den Enzym-Varianten festgestellt wurden, waren die Ergebnisse hinsichtlich der Bindungsaffinitäten wenig aussagekräftig.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Protein-Substrat Interaktionen stellen molekulardynamische (MD) Simulationen dar. Durch Computersimulationen können Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Molekülen und die daraus resultierenden räumlichen Bewegungen iterativ berechnet und modelliert werden. Die Modellierung komplexer Systeme, wie es bei Proteinen der Fall ist, erfolgt meist unter Zuhilfenahme semiempirischer Methoden oder Kraftfelder, die als Grundlage für die Berechnungen dienen. Die Bioinformatischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (Würzburg) mit *Thien Anh Le* unter der Leitung von *Prof. Bernd Engels*.

Die MD-Simulationen wurden mit der zweifach modifizierten Enzym-Variante Y247F-**1**-AzGlc durchgeführt, um Wechselwirkungen und Trajektorien zwischen der kovalent gebundenen Seitenkette -**1**-AzGlc und der Proteinoberfläche zu analysieren. Der Einfluss der Substratbindung auf die Berechnungen wurden durch Simulationen mit und ohne dem Substrat 6-Kestose in der aktiven Tasche berücksichtigt. Die Bewegungsabläufe und Wechselwirkungen des *Tags* -**1**-AzGlc waren jedoch unabhängig von der Abwesenheit oder Präsenz des Substrats 6-Kestose sehr ähnlich, was darauf hinweist, dass die chemische Modifikation die Bindung von kurzen Oligosacchariden nicht wesentlich stört oder beeinflusst.

Grundsätzlich können bei der Tyrosin-Modifikation vier unterschiedliche Isomere entstehen, weil die Luminol-Verbindung **1** entweder an C3 oder C5 des aromatischen

Tyrosin-Rings reagieren kann. Gleichzeitig kann auch der Rest (R) eine unterschiedliche Konformation einnehmen (Abbildung 26).

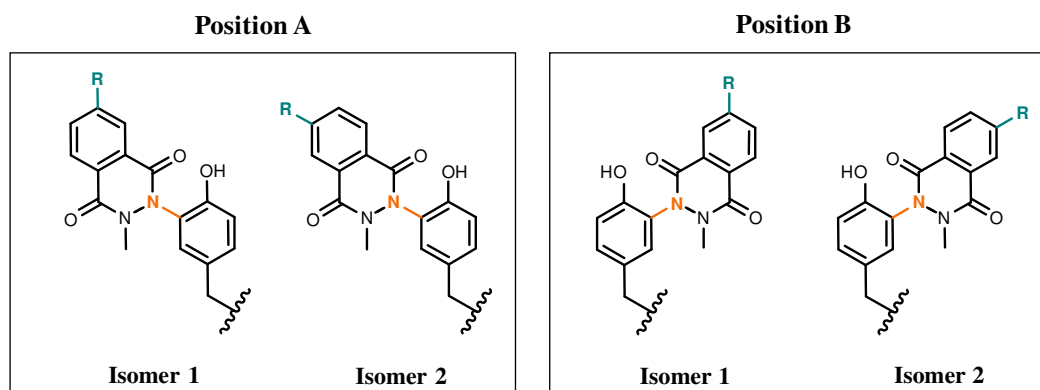


Abbildung 26: Mögliche Isomere nach der Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Tag **1** an C3 oder C5 des aromatischen Rings. Es ergeben sich Isomere 1A, 2A und Isomere 1B, 2B.

Gemäß den MD-Simulationen verhielten sich die vier potentiellen Isomere, mit kleinen Ausnahmen, insgesamt sehr ähnlich. Überwiegend wurde eine flexible Seitenkette **-1-AzGlc** beobachtet, die über das aktive Zentrum des Proteins fluktuierte und immer wieder kurzlebige Wechselwirkungen mit exponierten Aminosäuren ausbildete (z. B. Isomer 1A). Hingegen dazu war zum Beispiel die Flexibilität des Isomers 2A aufgrund beständigerer intramolekularer Wechselwirkungen mit Aminosäuren I242, D243 und E244 eingeschränkter (Abbildung 27).

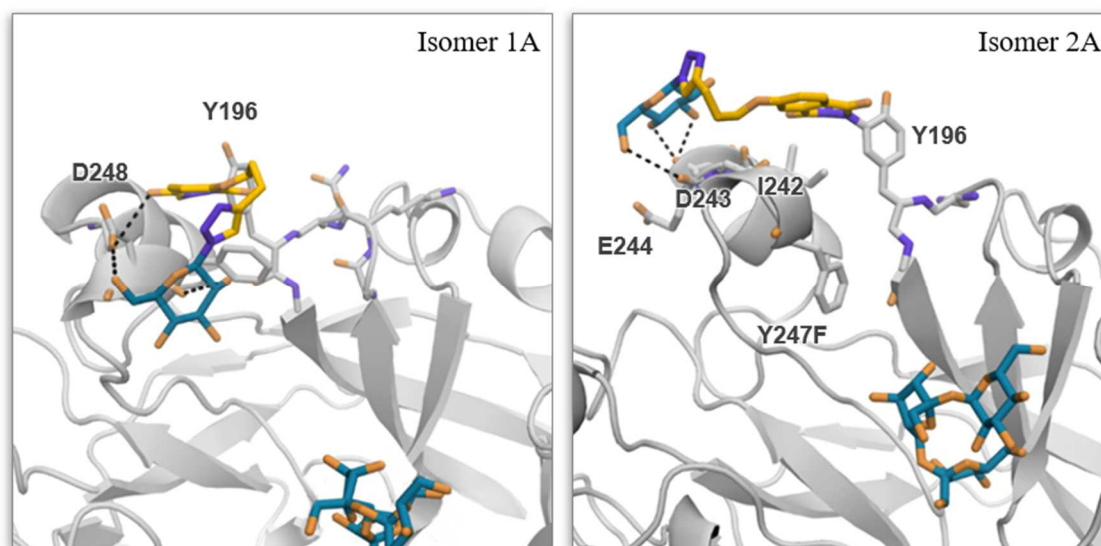


Abbildung 27: Molekulardynamische Simulationen der Variante Y247F-**1-AzGlc**. Die Abbildung zeigt zwei Frames der Isomere 1A (links) und 2A (rechts), in denen die polaren Wechselwirkungen des Tags **-1-AzGlc** mit den Aminosäuren D248 (Isomer 1A) und E244, I242 und D243 (Isomer 2A) veranschaulicht werden. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass vorwiegend der flexible *Tag* -1-AzGlc vorliegt und für die Polymersynthese nach der zweifachen Modifikation verantwortlich ist. Durch die Trajektorien der fluktuierenden Seitenkette über der Bindungstasche wurde möglicherweise eine sterische Hinderung für die wachsende Oligosaccharid-Kette erzeugt. Der *Tag* könnte somit als eine Art chemischer Deckel fungieren und eine vorzeitige Substrat-Freisetzung aus der aktiven Tasche verhindern (Abbildung 28).

Somit konnte die drastische Verschiebung der Produktverteilung zu Levan-Polymer auf zwei Hauptfaktoren zurückgeführt werden. Ein Schlüsselfaktor ist demnach der sterische Einfluss der Seitenkette -1-AzGlc, welche eine konstante Bindung zwischen Protein und Substrat gewährleistet. Der zweite Faktor ist die kontinuierliche dipolare Wechselwirkung des *Tags* mit der Proteinoberfläche und dem gebundenen Substrat, sodass die eingeführte Seitenkette -1-AzGlc die Funktion einer unnatürlichen Bindungsstelle einnimmt.

Die Tatsache, dass die modifizierte Variante Y247F-1-AzGlc nachwievorr geringe Mengen kurzer Oligosaccharide synthetisiert, kann durch zwei Gegebenheiten erklärt werden. Zum Einen liegt nach den chemischen Modifikationen ein heterogenes Enzymgemisch vor, weil in beiden Reaktionsschritten kein vollständiger Umsatz erreicht wurde. Da die molekularen Massen nach den Modifikationen trotzdem sehr nah beieinander liegen (ca. 51 kDa) und eine Größenausschluss-Chromatographie deshalb nicht möglich war, wurde bisher noch keine Methode zur Reinigung des Enzymgemischs gefunden. Folglich sind noch die unvollständig konjugierten Varianten Y247F und Y247F-1 in der Reaktionslösung enthalten und katalysieren die Hydrolyse und Synthese kurzer Fructane. Des Weiteren könnte auch Y247F-1-AzGlc aufgrund der Flexibilität der Seitenkette in der Lage sein kurze Oligosaccharide herzustellen. Während der Rückbewegung des *Tags* könnte das Substrat durch die „Öffnung“ der Bindungstasche und durch die fehlende sterische Hinderung wieder frühzeitig freigesetzt werden.

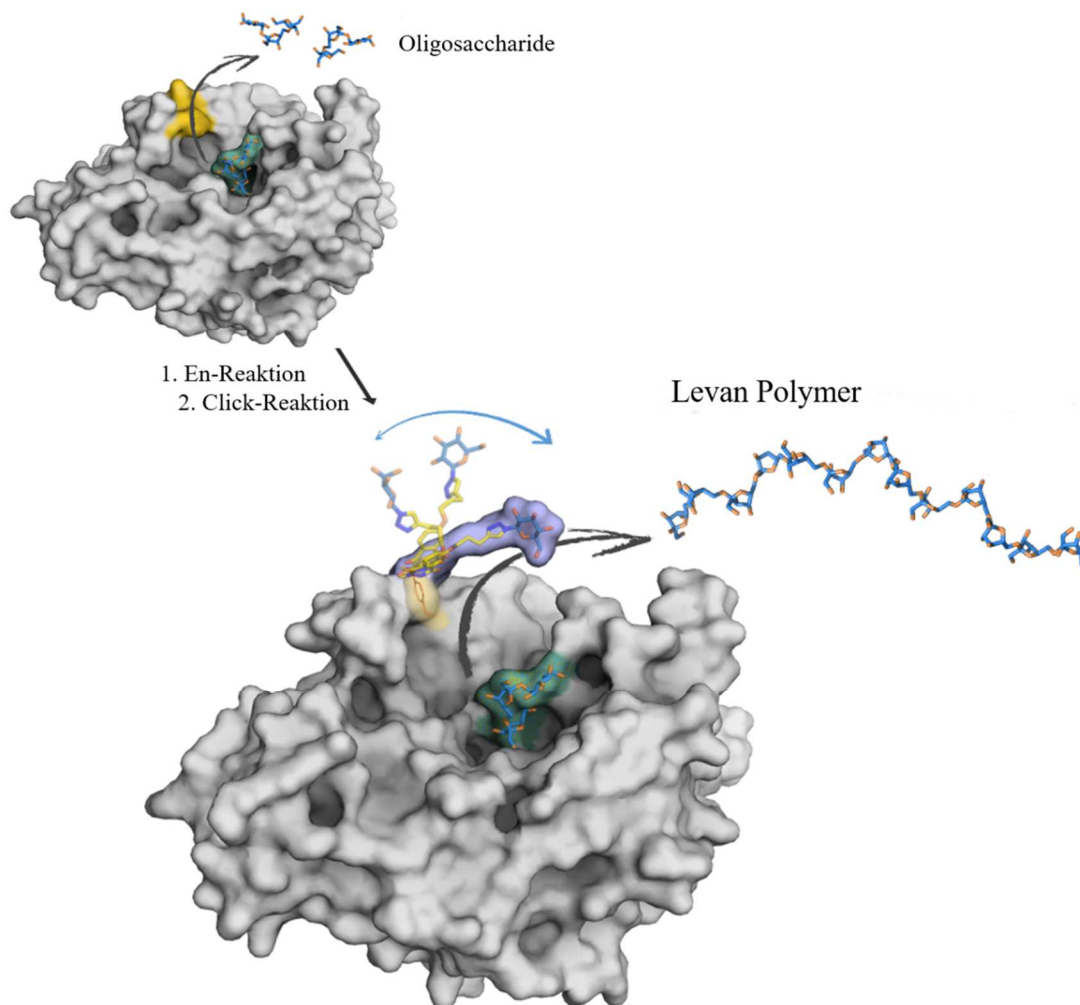


Abbildung 28: Oberflächendarstellung der Variante Y247F vor und nach der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Tag **1** und AzGlc. *oben*: Das unmodifizierte Enzym Y247F synthetisiert kurze Oligosaccharide. Die Oberfläche des Tyrosins Y196, an dem die Biokonjugation durchgeführt wird, ist gelb markiert. *unten*: Das modifizierte Enzym Y247F-1-AzGlc katalysiert die Synthese von Levan-Polymer. Der sterische Einfluss und die räumliche Bewegung der eingeführten Seitenkette wird durch die Oberflächendarstellung von -1-AzGlc und durch die Projektion zwei weiterer Frames der MD-Simulationen veranschaulicht. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Die MD-Simulationen gaben einen wichtigen Einblick in die Bewegungsabläufe sowie intramolekulare Wechselwirkungen des modifizierten Enzyms und erlaubten es, eine erste Hypothese zur Erklärung der drastischen Produktverschiebung aufzustellen. Im nächsten Schritt sollte der Beitrag des resultierenden Triazol-Rings durch die Click-Reaktion wie auch die Größe oder Art des eingeführten Azids untersucht werden. Dafür wurden für die Click-Reaktion drei weitere Azid-Verbindungen mit unterschiedlichen Größen bzw. Eigenschaften getestet und zur Erzeugung des Triazol-Rings selbst, ohne zusätzliche Erweiterung, wurde Natriumazid eingesetzt. Grundsätzlich sind 1,2,3-Triazolringsysteme Wasserstoffbindungs-Donatoren mit peptidomimetischen Eigenschaften,

die eine ähnliche Größe, Planarität und dipolaren Charakter wie eine Amidbindung aufweisen.^[123]

Neben der bereits untersuchten Azidoglucose wurde für die Click-Reaktion zusätzlich ein aromatischer Ring mit Keton- und Alkoholgruppe (Aromat), ein sterisch anspruchsvoller Farbstoff (FAM) und Polyethylenglycol (PEG) getestet. Die Produktspektren, nach der Reaktion mit Saccharose, zeigten im Falle der Varianten Y247F-1-Aromat und Y247F-1-FAM ebenso einen starken Produktshift zu Levan-Polymer, wie mit der zuvor analysierten Variante Y247F-1-AzGlc. Für das (PEG)ylierte Enzym Y247F-1-PEG wurde zwar eindeutig Polymersynthese beobachtet, jedoch fiel der Shift im Vergleich zu den anderen zweifach modifizierten Enzymen geringer aus. Dasselbe wurde auch für Variante Y247F-1-NaN₃ festgestellt, in welcher ausschließlich eine Triazolgruppe ausgebildet wurde (Abbildung 29).

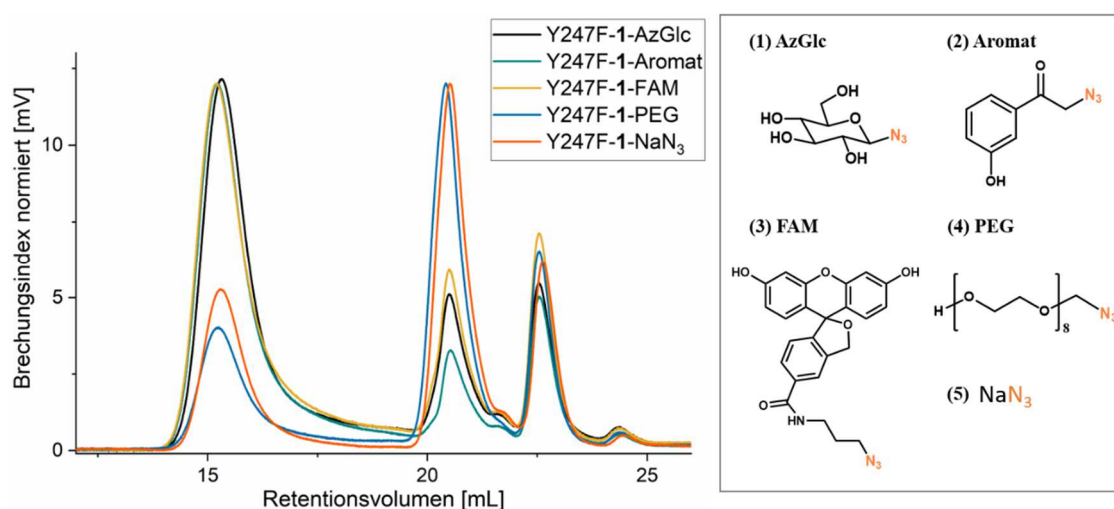


Abbildung 29: GPC-Analysen der Produktprofile von Varianten Y247F-1-AzGlc, Y247F-1-Aromat, Y247F-1-FAM, Y247F-1-PEG und Y247F-1-NaN₃ mit den dazugehörigen Strukturen der eingesetzten Azide für die Untersuchungen. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Die Resultate weisen darauf hin, dass nicht nur polare Wechselwirkungen und die Größe des Azids eine entscheidende Rolle spielen, um die Produktverteilung zu beeinflussen, sondern vor allem die räumliche Orientierung der eingeführten Seitenkette. Dadurch könnte z. B. die geringere Polymersynthese der (PEG)ylierten Variante Y247F-1-PEG erklärt werden. Vermutlich ist der *Tag*-1-PEG in eine andere Richtung ausgerichtet und kann dadurch nicht dieselbe sterische Hinderung auf das wachsende Oligosaccharid ausüben. Hingegen dazu besitzt die Triazolgruppe des Enzyms Y247F-1-NaN₃ wahrscheinlich die erforderliche Orientierung und kann dipolare Wechselwirkungen an den richtigen Positionen ausbilden, ist andererseits aber nicht groß genug, um die sterischen Voraussetzungen zu erfüllen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass eine gezielte Manipulation der Produktspezifität, durch Berücksichtigung verschiedener Aspekte, erreicht werden kann. Zu diesen gehören die Größe der eingeführten Seitenkette, die Fähigkeit des *Tags* polare Wechselwirkungen einzugehen und insbesondere die räumliche Orientierung und Bewegung des *Tags*.

4.1.2 Gezielte Inkorporierung und Modifikation nicht-nativer Tyrosine

Die Annahmen zu den intramolekularen Bewegungsabläufen und Wechselwirkungen, die durch die chemischen Modifikationen induziert wurden, sollten durch eine Ausweitung der Experimente auf andere Positionen des Enzyms verifiziert werden. Dazu wurden drei möglichst exponierte Aminosäuren, die in der dritten Zone der Levansucrase und im Elongationsweg der Oligosaccharide liegen, ausgewählt und durch ein Tyrosin substituiert. Gleichzeitig musste der Einfluss der Tyrosine Y196 und Y247 durch ein Aminosäure-Austausch gegen Phenylalanin ausgeschlossen werden. Infolgedessen wurden die Tripelmutanten E314Y/Y247F/Y196F, D248Y/Y247F/Y196F und F445Y/Y247F/Y196F erzeugt und mit der Luminol-Verbindung **1** und Azidoglucose chemisch modifiziert.

Die erhaltenen Produktprofile der modifizierten Tripelmutanten schienen die bisherigen Hypothesen zu bestätigen. Die Konjugation der gentechnisch eingeführten Tyrosine Y248 und Y314 mit der Seitenkette **1**-AzGlc führte in beiden Fällen zu einer starken Verschiebung der Produkte hin zu Fructan-Polymer. Die Variante D248Y/Y247F/Y196F-**1**-AzGlc erzeugte fast ausschließlich das hochmolekulare Polymer, während Oligosaccharide nur noch in Spuren synthetisiert wurden (Abbildung 30). Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass die Aminosäure Y248 am stärksten exponiert ist und damit auch am besten für eine vollständige chemische Modifizierung zugänglich ist. Außerdem liegt Y248 näher am aktiven Zentrum und könnte dadurch leichter und konstanter eine sterische Hinderung induzieren.

Im Gegensatz dazu weist die modifizierte Variante F445Y/Y247F/Y196F-**1**-AzGlc ein geringeres Verhältnis von Polymer zu Oligosacchariden auf (Abbildung 30). An dieser Stelle könnten zwei Faktoren für das Verhalten verantwortlich sein: entweder ist der *Tag* -**1**-AzGlc falsch ausgerichtet und ist deshalb nicht in der Lage die Substrat-Dissoziation effizient zu verhindern, oder die Position ist für eine chemische Reaktion schwerer zugänglich, was schließlich zu einer unvollständigen Modifikation führen könnte.

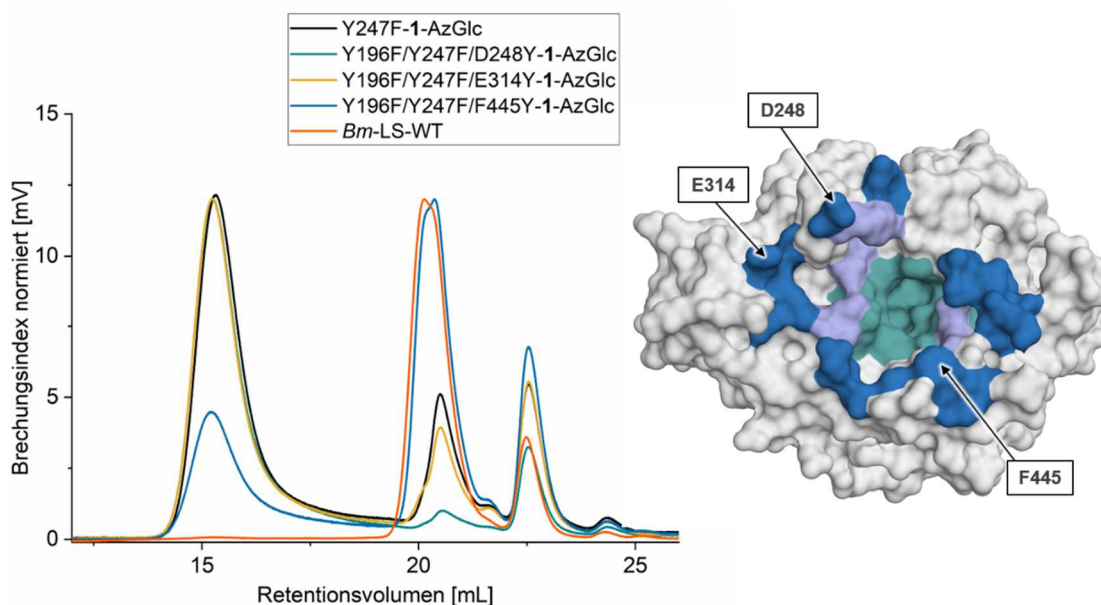


Abbildung 30: GPC-Analysen der Produktprofile von Varianten E314Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc, D248Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc und F445Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc mit entsprechender Oberflächendarstellung der ausgewählten Aminosäuren für die gentechnische Substitution durch Tyrosin und anschließender chemischer Modifizierung. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41]

Unter Berücksichtigung aller bisherigen Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass die chemische Modifikation von gentechnisch eingeführten Tyrosinen, die sich in dem Wachstumsverlauf der Oligosaccharide befinden, zu einem ähnlichen Verhalten führen würden. Je nach Orientierung oder Länge der inkorporierten Seitenkette würde es dementsprechend zu einer stärkeren oder schwächeren Verschiebung der Produktverteilung in Richtung des Levan-Polymers kommen.

Für die folgenden Experimente wurden aus diesem Grund zwei Aminosäuren ausgewählt, die nicht in dem Polymer-Wachstumspfad positioniert sind und außerdem einen geringeren Abstand zum aktiven Zentrum des Enzyms haben. Dafür wurden die Positionen S125 und N126 durch ein Tyrosin ausgetauscht und die Tripelmutanten S125Y/Y247F/Y196F (kurz: S125Y) und N126Y/Y247F/Y196F (kurz: N126Y) gentechnisch hergestellt. Durch die Nähe zur Bindungstasche und die gegensätzliche Positionierung im Vergleich zu den bisherig untersuchten Tyrosin-Resten, sollte die Elongation der Oligosaccharide in einer anderen Art und Weise beeinflusst werden, sodass möglicherweise neue Produktverteilungen zustande kommen. Zu diesem Zeitpunkt stellte sich die Frage, ob es möglich wäre ein Levan-Produkt mittlerer Größe, zwischen Oligosaccharide und Polymer, zu erhalten oder etwa die Oligosaccharid-Synthese auf gewisse Größen zu beschränken.

Die Tripelmutanten N126Y und S125Y wurden im ersten Modifikationsschritt zunächst mit dem Luminol-*Tag* **1** konjugiert. Die Modifikationsrate wurde für Variante N126Y-**1** mittels LC-MS und nach einem Elastaseverdau zusätzlich durch NanoLC-MS/MS ermittelt (Anhang, Abbildungen 75, 76). Im Falle der modifizierten Variante S125Y-**1** wurde auf einen Enzymverdau verzichtet und der Konjugationsstatus mittels LC-MS untersucht. Das Massenspektrum von S125Y-**1** zeigte, dass grundsätzlich zwei Modifikationen stattgefunden haben, wobei die einfache Modifikation als Hauptprodukt vorlag (Anhang, Abbildung 77). Mit der modifizierten Doppelmutante Y247F/Y196F-**1**-AzGlc wurde bereits sichergestellt, dass die unspezifische Konjugation nativer Tyrosine keine Auswirkung auf das Produktprofil hat. Deshalb wurde auch hier die externe Einflussnahme anderer Aminosäuren ausgeschlossen.

Der Elastaseverdau des Enzyms N126Y-**1** mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie lieferte wie erwartet ähnliche Ergebnisse, wie die zuvor modifizierten und verdauten Enzyme WT-**1**-AzGlc und Y247F-**1**-AzGlc. Während die Tyrosine Y41, Y109 und Y191 deutlich geringer konjugiert wurden, lag die Modifikationsrate von Position Y126 mit 80 % Umsatz bislang am höchsten (Abbildung 31).

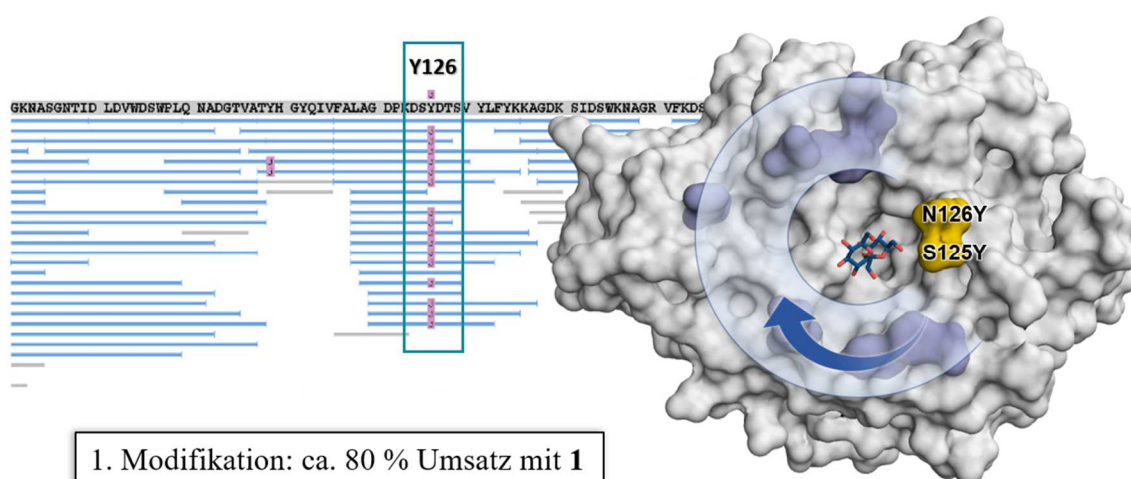


Abbildung 31: *links*: Ausschnitt aus NanoLC-MS/MS Analyse der chemischen Tyrosin-Modifikation der Variante N126Y mit Luminol-*Tag* **1** nach dem Elastaseverdau. Die Modifikation mit **1** ist in der Abbildung als pinkes „J“ markiert. *rechts*: Darstellung der bereits modifizierten und analysierten Aminosäuren in blauem Halbkreis. Die zwei zu untersuchenden Varianten N126Y und S125Y wurden gelb hervorgehoben. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Zur Vermeidung von Einflüssen, die durch Protein-Aggregationen entstehen könnten, wurden die Varianten nach jedem Modifikationsschritt durch Größenausschluss-Chromatographie gereinigt (Anhang, Abbildungen 96, 97). Alle Reaktionsansätze mit dem Substrat wie auch die Bestimmung der katalytischen Parameter erfolgten somit ausschließlich mit den Protein-Monomeren.

Die kinetischen Daten ergaben für beide Varianten verhältnismäßig hohe Aktivitäten nach den Konjugationsschritten. Nach der ersten Modifikation von N126Y wurde für die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} noch 74 % der Ausgangsaktivität beobachtet, und stieg nach der zweiten Modifikation sogar nochmals an. Bei Variante S125Y betrug der k_{cat} Wert nach beiden Modifikations-Reaktionen noch rund 64 % der ursprünglichen Umsatz-Geschwindigkeit. Die Substrataffinität K_M hat sich bei allen modifizierten Varianten unerheblich verringert, nur S125Y-1 wies eine etwas schwächere Affinität zu Saccharose auf. Somit zeigten die modifizierten Enzyme auch bei der katalytische Effizienz k_{cat}/K_M nur geringe Abweichungen im Vergleich zur unmodifizierten Variante (Tabelle 3).

Tabelle 3: Katalytische Parameter der Tyrosin-modifizierten und unmodifizierten Levansucrase-Varianten N126Y und S125Y mit Saccharose als Substrat. Die katalytischen Konstanten spiegeln die globale Aktivität (Hydrolyse und Transfer) wider.^[46]

Enzym	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [$\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$]
N126Y/Y247F/Y196F	190,4 ± 2,7	21,7 ± 1,6	8,7
N126Y/Y247F/Y196F -1	142,1 ± 1,8	23,3 ± 3,1	6,1
N126Y/Y247F/Y196F -1-AzGlc	158,7 ± 2,5	20,8 ± 1,6	7,6
S125Y/Y247F/Y196F	275,3 ± 3,4	22,8 ± 1,4	12,0
S125Y/Y247F/Y196F-1	175,7 ± 3,3	34,8 ± 2,9	5,0
S125Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc	177,5 ± 1,3	23,9 ± 0,8	7,3

Bereits der erste Modifikationsschritt mit dem Luminol-Tag **1** führte bei den Varianten S125Y und N126Y zu bemerkenswerten Unterschieden, sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen. Obwohl die Positionen räumlich und strukturell direkt nebeneinanderliegen, wurden völlig gegensätzliche Auswirkungen auf das Produktspektrum beobachtet. Während bei S125Y-1 schon die erste Modifikation den Produktshift zu Levan-Polymer veranlasste, wurde bei der modifizierten Variante N126Y-1 eine signifikante Akkumulation wichtiger funktioneller Oligosaccharide, wie 1-Kestose, 6-Kestose und Nystose, beobachtet.

Die Produktverschiebung in Richtung hochmolekularem Levan ging bei Variante S125Y-1 außerdem mit einer 42 % igen Steigerung der Transfructosylierungs-Effizienz einher (Tabelle 4). Die strukturelle Manipulation ermöglichte neben der noch vorhandenen Oligosaccharid-Synthese auch einen prozessiven Polymerisations-Mechanismus und führte damit zu einer bimodalen Produktverteilung. Dieses Resultat ist im Einklang mit den zuvor erhaltenen Werten für die zweifach modifizierten Enzyme, die nach der Produktverschiebung zu Polymer ebenfalls ein größeres Transfer/Hydrolyse-Verhältnis aufwiesen.

Tabelle 4: Hydrolyse/Transfer-Verhältnis der Enzym-Varianten S125Y und N126Y vor und nach der Modifikation mit Luminol-Tag **1**. Die Reaktionen wurden in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 3 U mL⁻¹ enzymatischer Aktivität und 0,5 M Saccharose durchgeführt. Der Monosaccharid-Gehalt der Fructose und Glucose wurde mittels HPAEC-PAD-Analyse nach 48 h Reaktionszeit gemessen.^[46]

	Glucose [mM]	Fructose [mM]	Glc-Fru [mM]	Hydrolyse [%]	Transfer [%]	Hauptprodukt
S125Y	502,49	419,33	83,16	83,45	16,55	Oligosaccharide
S125Y-1	457,27	349,55	107,72	76,44	23,56	HML Polymer
N126Y	374,81	256,87	117,94	68,53	31,47	Oligosaccharide
N126Y-1	415,53	272,33	143,19	65,54	34,46	Oligosaccharide

Die zusätzliche Funktionalisierung der Luminol-Verbindung **1** durch eine zweite Modifikations-Reaktion mit der Azidoglucose hatte kaum Auswirkungen auf die Produktverteilung. Die GPC-Analysen der erhaltenen Produkte von S125Y-1 und S125Y-1-AzGlc zeigten ein sehr ähnliches Verhältnis von Fructan-Polymer zu kurzen Oligosacchariden. Der Oligosaccharidbereich wurde durch HPAEC-PAC Messungen genauer untersucht und zeigte für die unmodifizierte und modifizierten Varianten von S125Y dieselben Produktverteilungen auf (Abbildung 32).

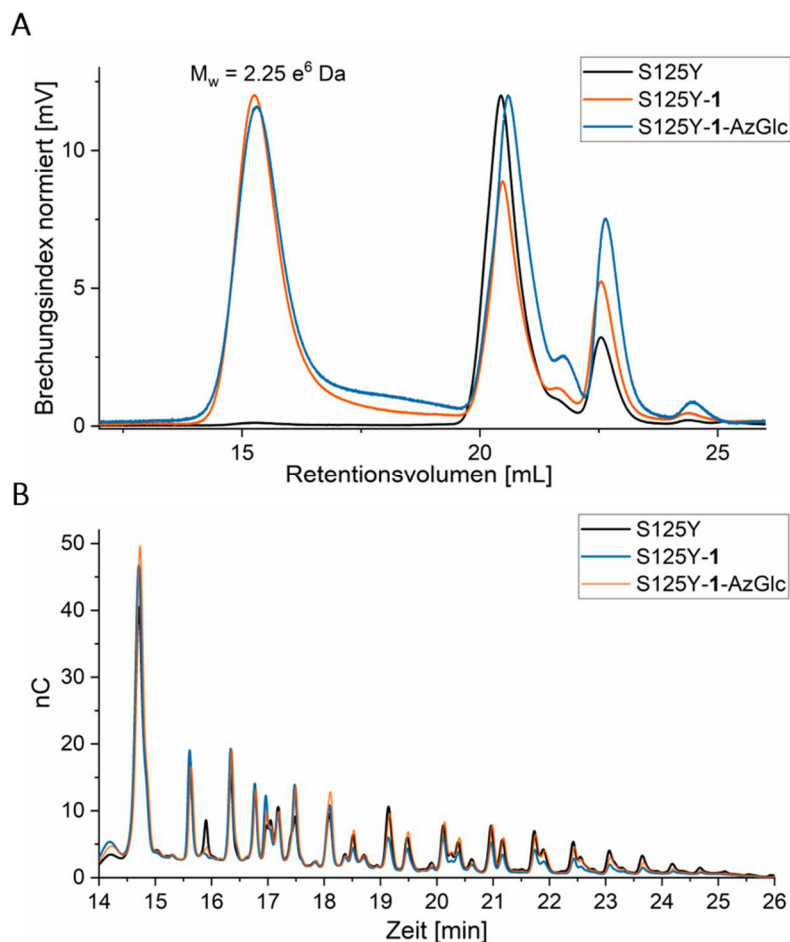


Abbildung 32: Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung **1** und AzGlc auf das Produktprofil der Variante S125Y. A) Gel-Permeations-Chromatographie der Produkte von S125Y, S125Y-**1**, S125Y-**1**-AzGlc. B) HPAEC-PAD-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch das unmodifizierte oder die modifizierten Varianten S125Y synthetisiert wurden. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Im Falle der konjugierten Variante N126Y-**1** wurde eine erhebliche Anhäufung (bis zu 800 % Zunahme) kurzer Fructooligosaccharide beobachtet. Zur mechanistischen Untersuchung der Produktsynthese wurden sowohl zeitabhängige Proben (0-48 h) von N126Y und N126Y-**1** analysiert wie auch temperaturabhängige Reaktionsbedingungen bei 20 °C und 37 °C (Abbildung 33).

Die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose, Neokestose und 6-Nystose stellten die Hauptprodukte dar und wurden in den frühen Phasen der Reaktion synthetisiert (Anhang, Abbildung 98). Im Verlauf der Reaktion wurden sie akkumuliert und dienten gleichzeitig als Substrat für die Elongation, was typisch für eine nicht-prozessive Katalyse ist. Interessanterweise wurde das Transfer/Hydrolyse-Verhältnis durch die chemische Modifikation nicht verringert. Dies ist insofern erwähnenswert, weil Veränderungen der Oligosaccharid-Größen im kurzkettigen Bereich, die durch Mutagenese herbeigeführt

wurden, in der Regel zu einer erhöhten hydrolytischen Aktivität führen, meist bedingt durch Verformungen der Saccharose-Bindungstasche.^[16, 28, 124] Bei einer geringeren Reaktionstemperatur von 20 °C führten thermodynamische Stabilisierungseffekte zu einer stärkeren Substratbindung und damit zu einer noch effizienteren Akkumulation kurzer Oligosaccharide von DP 2-12. So wurde zum Beispiel für 6-Nystose eine Zunahme von 800 % beobachtet. Die Substratelongation kam ab einem Polymerisationsgrad von etwa 13 Fructosyl-Einheiten komplett zum Erliegen, wohingegen die unmodifizierte Variante N126Y bei derselben Temperatur Fructane bis zu DP 30 synthetisierte.

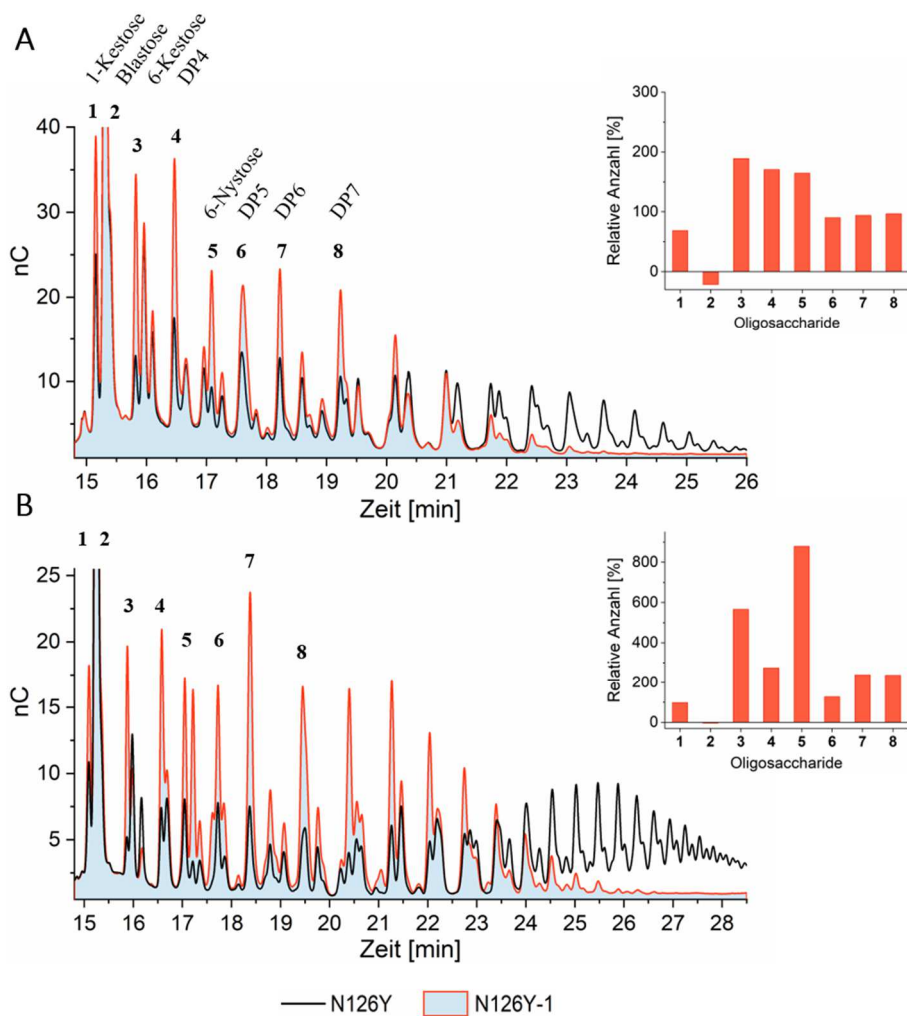


Abbildung 33: Analyse des Oligosaccharidprofils von N126Y und N126Y-1 bei (A) 37 °C und (B) 20 °C. Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale Zunahme/Abnahme der Oligosaccharide nach der Modifikation. Die integrierte Fläche jedes Oligosaccharid-Peaks der unmodifizierten Variante wurde auf 100 % gesetzt. Die Rohdaten der Integrale wurden im Anhang in Tabelle 6 beigefügt. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Die Durchführung des zweiten Modifizierungsschrittes durch eine Click-Reaktion mit AzGlc bewirkte eine geringe Abnahme der Oligosaccharid-Bildung. Außerdem ergaben

GPC-Untersuchungen, dass die zweifach modifizierte Variante N126Y-1-AzGlc im Gegensatz zu N126Y-1 in der Lage ist, geringe Mengen des hochmolekularen Fructan-Polymers zu produzieren (Abbildung 34).

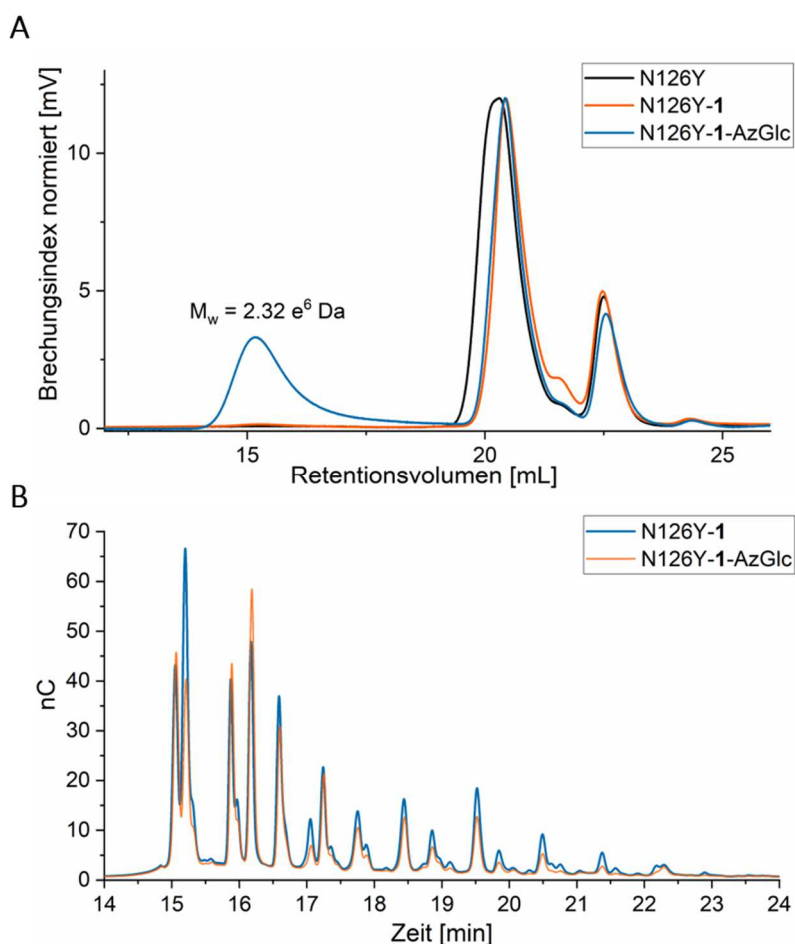


Abbildung 34: Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung **1** und AzGlc auf das Produktprofil der Variante N126Y. (A) Gel-Permeations-Chromatographie der Produkte von N126Y, N126Y-1, N126Y-1-AzGlc. (B) HPAEC-PAD-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch die modifizierten Varianten N126Y synthetisiert wurden. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Um einen tieferen Einblick in die dynamische Orientierung und Bewegung der eingeführten Seitenkette der Varianten S125Y-1 und N126Y-1 zu gewinnen, wurden erneut molekulardynamische Simulationen durchgeführt. Sie sollten Aufschluss darüber geben, welche intramolekularen Wechselwirkungen für diese bemerkenswerten Unterschiede zwischen den so nahe beieinanderliegenden Positionen verantwortlich sind.

Wie in Abbildung 26 bereits erläutert wurde, können bei der Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Tag **1** vier verschiedene Isomere entstehen: Isomer 1A, 2A und Isomer 1B, 2B. Die MD-Simulationen von N126Y-1 zeigten eine sehr flexible Seitenkette, die je nach betrachteter Isomeren-Konformation unterschiedlich große Bereiche der Proteinoberfläche und Substrat-Bindungstasche abdeckte. Das Isomer 2A wurde für diese Variante

nicht berücksichtigt, da laut den Berechnungen der *Tag 1* in dieser Konformation direkt in das aktive Zentrum gerichtet wäre und das Enzym vermutlich inaktivieren würde. In Vorarbeiten von Strube *et al.* wurden auf der Oberfläche der *Bm*-Levansucrase native Bindungsstellen entdeckt, die essenziell für das Wachstumsverhalten der Oligosaccharide sind und einen großen Einfluss auf die Fructan-Größe haben. Zu den genannten Bindungsmotiven gehören die Aminosäuren R370, K373, N252 und Y247.^[16] Im Falle der Isomere 1B und 2B schwingt die eingeführte Seitenkette dynamisch über das katalytische Zentrum und gleitet gemäß dem berechneten Bewegungsradius genau an diesen nativen Bindungsstellen entlang (Abbildung 35, 37). Die dynamischen Bewegungen von Luminol-*Tag 1* und die Interaktionen mit den Bindungsstellen könnte daher die Wechselwirkungen zwischen dem wachsenden Oligosaccharid und den nativen Bindungsstellen stören oder sogar komplett verhindern. Das Isomer 1A ist laut den Simulationen etwas eingeschränkter in den Trajektorien und ist entweder auf das Bindungsmotiv Y247 für Fructane > DP 10 gerichtet oder wechselwirkt mit N252 und D251. Die erhaltenen Ergebnisse der Variante N126Y-1 deuten darauf hin, dass die Destabilisierung der initialen Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und der Proteinoberfläche, zu einer frühen Freisetzung und Anreicherung von kleinen Fructooligosacchariden führen könnte.

Für die zweifach modifizierte Enzym-Variante N126Y-1-AzGlc wurde die Synthese von geringen Mengen des Levan-Polymers beobachtet, wohingegen die Akkumulation der kurzkettigen Fructane abnahm. Diese Gegebenheit könnte dadurch erklärt werden, dass die verlängerte Seitenkette 1-AzGlc in der Lage ist, mehr polare Bindungsstellen bereitzustellen und aufgrund der gewonnenen Länge zusätzlich als sterisches Hindernis wirken kann, anstatt das wachsende Substrat zu verdrängen.

Für die einfach modifizierte Variante S125Y-1 ergaben die MD-Simulationen eine weitgehend starre Seitenkette, die primär in die Richtung derjenigen Bindungsstelle ausgerichtet ist, die vermutlich eine Schlüsselrolle für die Oligosaccharid-Synthese mit einem Polymerisationsgrad > 10 spielt (Y247). Von den vier möglichen Isomeren hatten die drei Isomere 1A, 2A sowie 1B die gleiche räumliche Orientierung und sie zeigten alle die beschriebene Ausrichtung zu dem Bindungsmotiv DP 10 auf. Hingegen dazu wurde für die Seitenkette des Isomers 2B ein flexiblerer Bewegungsradius beobachtet, der auch eine Orientierung in Richtung der Bindungsstellen für kurze Fructane zuließ (DP 4-6). Im Vergleich zu N126Y-1 fluktuierte der etwas flexiblere *Tag* von S125-1 jedoch viel weniger und hatte zudem einen größeren Abstand zu den Aminosäuren der Bindungsmotive (R370, K373, N252). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass der *Tag 1* des Isomers 2B zwar die Bindungstasche zu bedecken vermag, dies jedoch ohne das Substrat zu verdrängen oder stabilisierende Wechselwirkungen zu unterbrechen.

Hinsichtlich der drei übereinstimmenden Isomere von S125Y-1, könnte die seichte Vor- und Rückbewegung der Seitenkette im Bereich des Bindungsmotivs Y247 die Freisetzung der Oligosaccharide verhindern und den prozessiven Wachstumsmechanismus unterstützen. Außerdem ist die Distanz von etwa 3,5 Å zwischen dem unteren Teil des Luminol-*Tags* und dem Substrat so gering, dass eine konstante Ausbildung polarer Wechselwirkungen möglich ist. Sowohl die polaren Interaktionen zu Beginn der Fructanelongation als auch der sterische Einfluss im späteren Wachstumsverlauf bei Oligosacchariden > DP 10 könnten zur Stabilisierung der Polymersynthese beitragen.

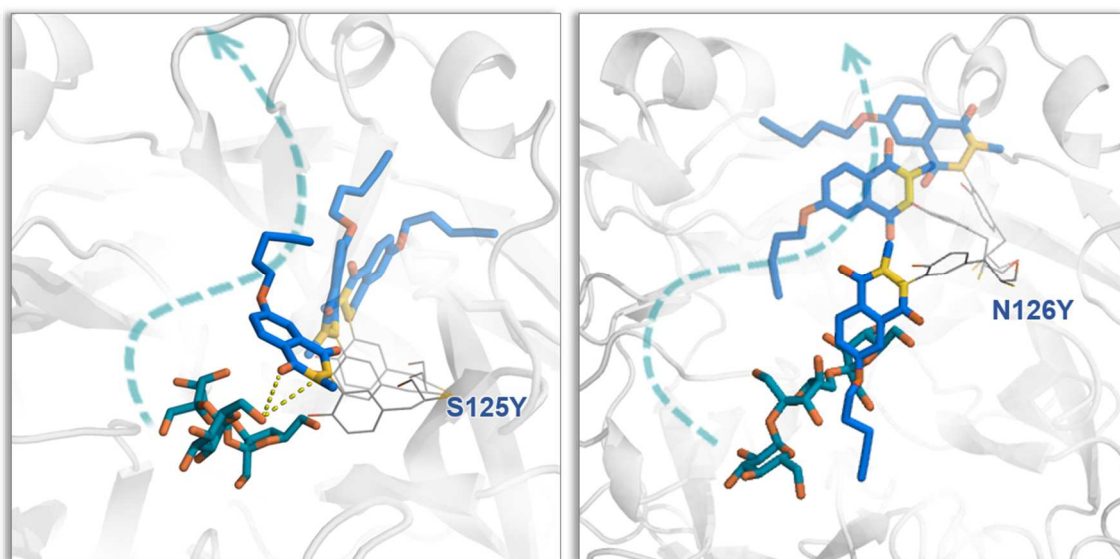


Abbildung 35: MD-Simulationen des Luminol-*Tag* 1 gebunden an S125Y und N126Y. Das Substrat 6-Kestose ist in den Farben cyan/orange und der *Tag* 1 in blau/gelb dargestellt. Für jede Variante werden drei beispielhafte *Frames* der Simulationen gezeigt, um die Bewegung der Seitenkette 1 zu veranschaulichen. Die *Frames* von N126Y-1 stellen die Konformationen von Position B Isomer 1/2 und Position A Isomer 1 dar, während die *Frames* von S125-1 die Konformationen von Position A Isomer 1/2, Position B Isomer 1 simulieren. Der grüne Pfeil zeigt den Elongationspfad der Oligosaccharide. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Der Unterschied zu den Tyrosin-Positionen, bei denen erst nach der zweiten Modifikationsreaktion Polymersynthese beobachtet wurde, besteht hauptsächlich darin, dass S125Y einen viel geringeren Abstand zum aktiven Zentrum und damit zum Substrat hat. So liegt die Distanz von Y196 (Variante Y247F) bei etwa 15 Å im Vergleich zu 3,5 Å bei Y125 (Variante S125Y). Der größere Abstand zur Bindungstasche schließt einerseits die Möglichkeit aus, bereits im frühen Wachstumsstadium polare Kontakte zum Substrat auszubilden und führt andererseits dazu, dass die eingeführte Seitenkette lang genug sein muss, um dieselben intramolekularen Wechselwirkungen und sterischen Effekte zu erzielen.

Nach der Click-Reaktion mit S125Y-**1** wurden für die verlängerte Variante S125Y-**1**-AzGlc nur marginale Veränderungen in der Produktverteilung festgestellt. Dieses Resultat ist im Einklang mit den zugrundeliegenden MD Simulationen, die für beide Seitenketten -**1** und -**1**-AzGlc einen sehr ähnlichen Bewegungsraum und gleichartige Wechselwirkungen vorschlugen (Abbildung 36).

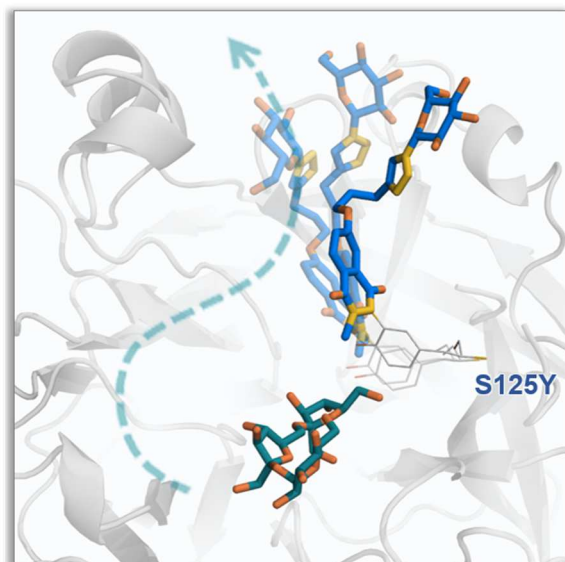


Abbildung 36: MD-Simulationen der Variante S125Y-**1**-AzGlc. Das Substrat ist in den Farben cyan/orange und der *Tag 1*-AzGlc in blau/gelb dargestellt. Es werden drei exemplarische *Frames* der Simulationen gezeigt, um die Bewegung der Seitenkette **1**-AzGlc zu veranschaulichen. Der grüne Pfeil zeigt den Elongationspfad der Oligosaccharide. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Beide Varianten S125Y-**1** und S125Y-**1**-AzGlc sind immer noch in der Lage, kleine Oligosaccharide zu synthetisieren und weisen eine bimodale Produktverteilung auf, bei welcher die quantitativen Mengen der Oligosaccharide im Vergleich zum produzierten Polymer in etwa ausgeglichen sind. Für diese Produktverteilung sind verschiedene Erklärungen denkbar, die bereits für andere modifizierte Varianten diskutiert wurden. Dabei spielen sowohl die Zugänglichkeit der Position und damit auch die Modifikationsrate eine entscheidende Rolle wie auch ein konstanter sterischer Einfluss auf das wachsende Substrat.

Um die MD-Simulationen durch weitere Untersuchungen zu unterstützen, wurde im nächsten Schritt eine indirekte Methode verwendet, die bestimmte intramolekulare Wechselwirkungen nachweisen und die Annahmen über die Auswirkungen der eingeführten chemischen Seitenkette auf das Produktspektrum verifizieren sollte. Dafür wurden Enzym-Varianten mit defekten Oligosaccharid-Bindungsmotiven hergestellt. Das Bindungsmotiv der Aminosäure N252 wird z. B. für die Synthese von Fructanen oberhalb DP 4 benötigt. Die Aminosäure K373 hingegen, limitiert die Oligosaccharid-Synthese auf

DP 6 wenn Lysin durch Alanin substituiert wird (K373A) und begrenzt die Produktsynthese auf DP 8 nach einem Aminosäureaustausch gegen Arginin (K373R). Die Abwesenheit eines aromatischen Restes an der Bindungsstelle Y247 verhindert die Synthese von Produkten größer als DP 10.^[16]

Schließlich wurden die drei neuen Enzym-Varianten S125Y/Y196F/Y247F/K373A (K373A*), S125Y/Y196F/Y247F/K373R (K373R*) und S125Y/Y196F/Y247A (Y247A*) konstruiert, indem die Tripelmutante S125Y jeweils mit einem fehlenden bzw. gentechnisch veränderten Bindungsmotiv kombiniert wurde. Die Idee war, dass eine chemisch eingeführte Seitenkette an Y125 mit ausreichender Länge ein Ersatz für die fehlenden nativen Bindungsstellen darstellen könnte und dadurch die Aufrechterhaltung der Polymersynthese ermöglichen würde. Dies könnte indirekt die Orientierung und Funktionsweise des chemischen *Tags* beweisen.

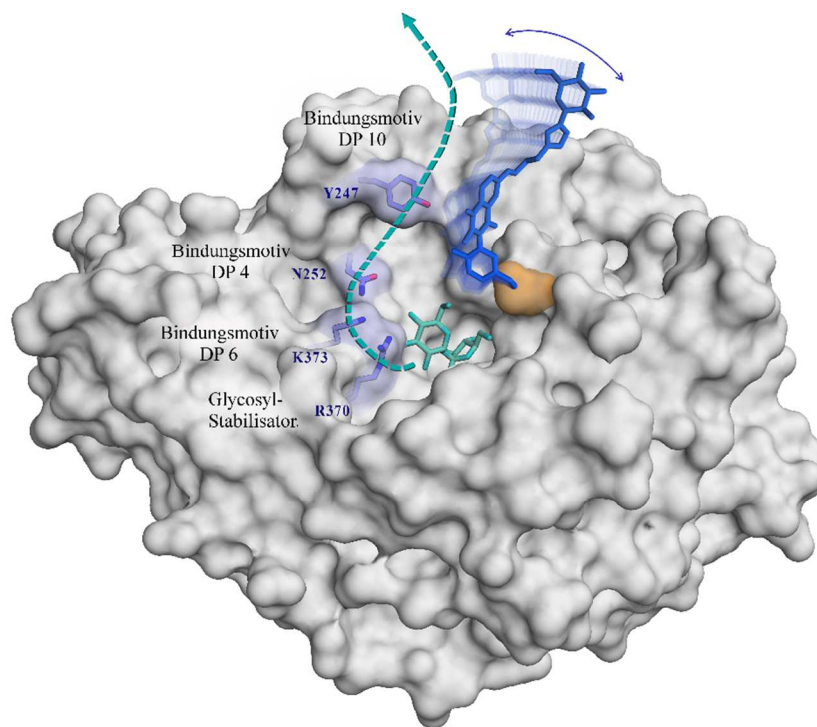


Abbildung 37: Oberflächendarstellung der Enzym-Variante S125Y-1-AzGlc mit dem aktiven Zentrum und den umgebenden Bindungsmotiven im Wachstumsverlauf der Oligosaccharide. Der grüne Pfeil zeigt die Richtung der entstehenden Fructankette. Die blau dargestellte Seitenkette zeigt die Bewegung des chemischen *Tags* 1-AzGlc. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

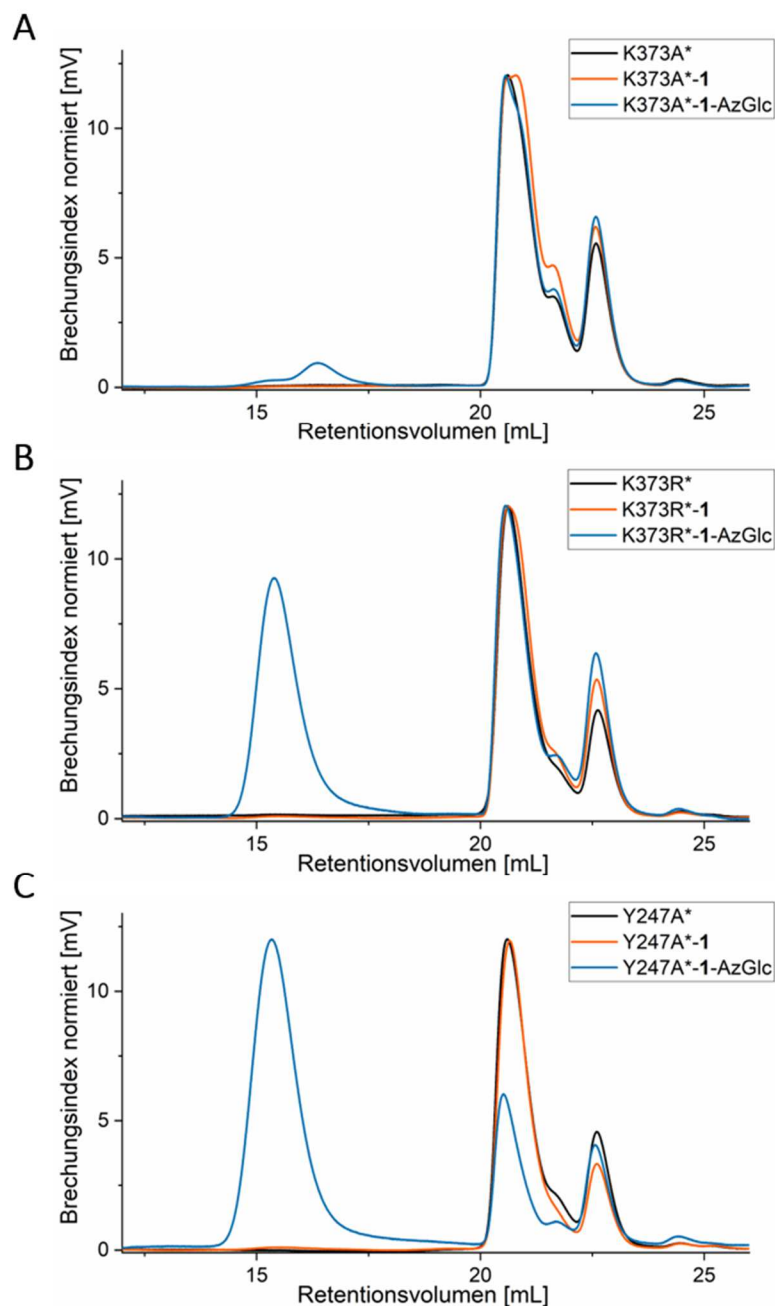


Abbildung 38: GPC-Untersuchungen zur Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung **1** und AzGlc auf das Produktprofil der Varianten (A) K373A*, (B) K373R* und (C) Y247A*. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46]

Die GPC-Analysen zu den erhaltenen Produktprofilen der unmodifizierten und modifizierten neuen Varianten zeigten, dass die Fähigkeit zur Polymerproduktion durch das Hinzufügen nicht-nativer Wechselwirkungen über eine chemische Modifikation wiederhergestellt werden konnte. Nach dem ersten Modifikationsschritt an den Varianten K373A*, K373R* und Y247A* mit dem Luminol-Derivat **1** gab es zunächst keine Veränderung in den Produktspektren. Der zweite Modifikationsschritt mit AzGlc führte

jedoch zu beachtlichen Unterschieden. Die Menge des synthetisierten Levan-Polymers stieg von Variante K373A*-1-AzGlc über K373R*-1-AzGlc hin zu Y247A*-1-AzGlc konstant an, wobei das Polymerprofil von Y247A*-1-AzGlc dem von S125Y-1 und S125Y-1-AzGlc gänzlich entsprach (Abbildung 38).

Die Notwendigkeit größerer chemischer *Tags* zur Wiederherstellung der Polymerisationsfähigkeit bei Varianten mit fehlenden Bindungsmotiven deutet darauf hin, dass zusätzliche polare Kontakte entscheidend sind, um die fehlenden nativen Bindungsstellen zu kompensieren. Des Weiteren ist die Polymerisations-Effizienz der zweifach modifizierten Varianten K373A*, K373R* und Y247A* von einer kritischen Oligosaccharid-Größe abhängig, die erreicht werden muss, um ausreichende Wechselwirkungen mit der Seitenkette 1-AzGlc auszubilden. Aufgrund der Ausrichtung des chemischen *Tags* auf Tyrosin S125Y ist ein Polymerisationsgrad (DP) von mindestens 8 Fructosyl-Einheiten erforderlich. Ohne diese Voraussetzung können die von 1-AzGlc bereitgestellten Interaktionsmöglichkeiten keine wirksame Stabilisierung für das Polymerwachstum gewährleisten.

Wie zuvor schon für Variante Y247F weitere Azido-Verbindungen untersucht wurden (Abbildung 29), stellte sich auch für die Positionen N126Y und S125Y die Frage, inwieweit sich eine andere Seitenkette, anstelle der Azidoglucose, anders verhalten würde und ob sich daraus weitere unbekannte Effekte auf das Produktspektrum der Levansucrase ergeben könnten. Dafür wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie vier unterschiedliche Peptide synthetisiert, die jeweils mit einer Azidoalanin-Aminosäure funktionalisiert wurden (Abbildung 39). Die Click-Reaktionen für den zweiten Modifikationsschritt wurden mit den vier Peptiden und den Varianten N126Y-1 und S125Y-1 durchgeführt. Die Produktverteilungen wurden durch Größenausschluss-Chromatographie und ionenchromatographisch mittels HPAEC-PAC-Messungen analysiert. Jedoch wurden nach der Click-Reaktion weder im hochmolekularen noch im Oligosaccharid-Bereich wesentliche Unterschiede zu den geklickten Varianten N126Y-1-AzGlc und S125Y-1-AzGlc festgestellt (Anhang, Abbildung 99).

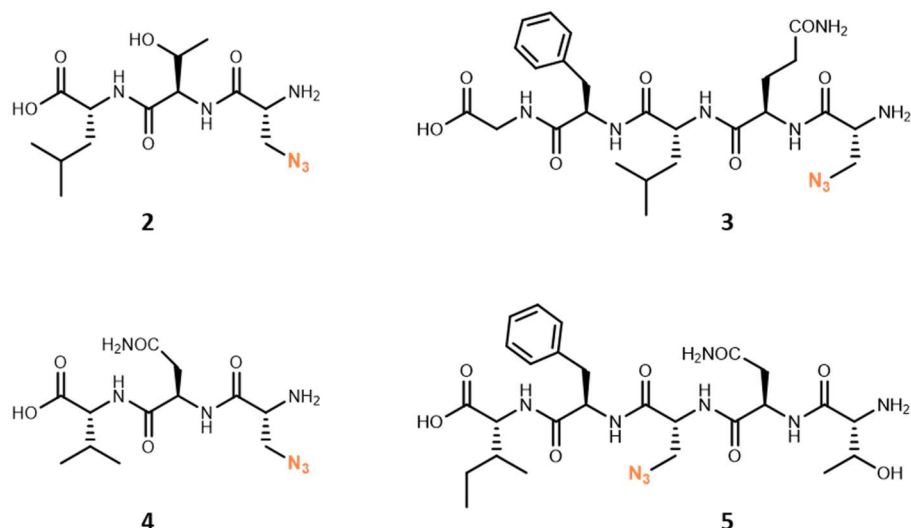


Abbildung 39: Azidofunktionalisierte Peptide, die mittels Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie synthetisiert wurden.

4.2 Synthese und Isolation von 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose

Die Erforschung des Zusammenhangs zwischen der Zusammensetzung des Darmmikrobioms und dem Auftreten verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Aufklärung der bidirektionalen Kommunikation zwischen dem zentralen und dem enterischen Nervensystem, der so genannten "Darm-Hirn-Achse", gelegt.^[125-126] Da gewisse Oligosaccharide mit präbiotischer Aktivität das Wachstum verschiedener Bakterienpopulationen im menschlichen Darm-Trakt anregen und sich damit positiv auf die Gesundheit auswirken können, nimmt der Einsatz von Präbiotika als Nahrungsergänzungsmittel stetig zu. Obwohl die Wirkung Inulin-artiger Fructo-oligosaccharide in zahlreichen Untersuchungen intensiv erforscht wurde, gibt es vergleichsweise wenig Studien zur Funktion Levan-artiger Fructane als Präbiotika. Dies liegt unter anderem auch an der Herausforderung Levan-Oligosaccharide bestimmter Größen in ausreichender Ausbeute und Reinheit zu isolieren.

Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Bibliothek unterschiedlicher *Bm*-Levansucrase-Mutanten erstellt, die hauptsächlich auf die Synthese kurzkettiger Oligosaccharide ausgerichtet war. Zu diesem Zweck wurden Aminosäuren ausgewählt, die Teil wichtiger Bindungsmotive für das wachsende Substrat sind und deren Einfluss auf die Modulation der Produktgröße bereits bekannt war. Die Aminosäuren R370, K373 und F419 wurden hierfür durch verschiedene Reste substituiert und in unterschiedlichen

Doppel- und Tripelmutanten kombiniert. Die Ergebnisse zeigten, dass Varianten mit der Mutation R370Q bevorzugt 1-Kestose und Neokestose produzierten, wohingegen Varianten mit den Mutationen K373H oder K373L vorzugsweise 6-Kestose und 6-Nystose als Hauptprodukte erzeugten.^[127]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich die Variante K373L mit der höchsten katalytischen Effizienz gewählt, um die Synthese und Isolation der Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose durchzuführen, wobei der Schwerpunkt auf den beiden letztgenannten Produkten lag. Neben dem Ziel, die Oligosaccharide in bestmöglicher Ausbeute zu erhalten, lag der Fokus insbesondere auf der Entwicklung eines effizienten und einfachen Protokolls, das sich auch auf die Isolierung anderer Fructane anwenden lassen sollte.

Bei der enzymatischen Oligosaccharid-Synthese fallen die Hauptprodukte Glucose, Fructose und Saccharose meist in großen Mengen an, während die erwünschten Oligosaccharide insgesamt nur rund 10 % der Produkte ausmachen. Eine der Schwierigkeiten ist daher die Abtrennung der Hauptprodukte, ohne dabei erhebliche Verluste der Oligosaccharide zu verursachen. Gängige Methoden zur Fraktionierung und Reinigung von Mono- und Oligosaccharid-Gemischen sind zum Beispiel die Ultra- und Nanofiltration. Eine weitere Methode ist auch die mikrobielle Vorbehandlung des Gemisches mit bestimmten Organismen (z. B. Hefen), die in der Lage sind Glucose, Fructose und Saccharose abzubauen, nicht aber die in der Mischung enthaltenen Oligosaccharide.^[128-129]

In dieser Arbeit wurden zwei Strategien für die Produktion und Reinigung der genannten Oligosaccharide verfolgt: 1) In der ersten Herangehensweise wurden die Mono- und Disaccharide klassisch mittels Normalphasen-Säulenchromatographie abgetrennt, 2) während die zweite Methode eine fermentative Behandlung des Rohgemisches mit der Hefe *Hansenula polymorpha* vorsah. Anschließend sollte in beiden Fällen das vorgereinigte Oligosaccharid-Gemisch durch weitere säulenchromatographische Schritte aufgetrennt werden.

Für die Oligosaccharid-Synthese wurden 3 U mL^{-1} der Levansucrase-Variante K373L in 125 mL Sørensen-Puffer mit 0,5 M Saccharose versetzt und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Nach dieser Reaktionszeit waren nur noch Spuren der Saccharose vorhanden und ein großer Überschuss der Monosaccharide Glucose und Fructose (Abbildung 40). Die Konzentrationen der produzierten Glucose und Fructose im Rohprodukt betragen jeweils 248 mM und 194 mM.

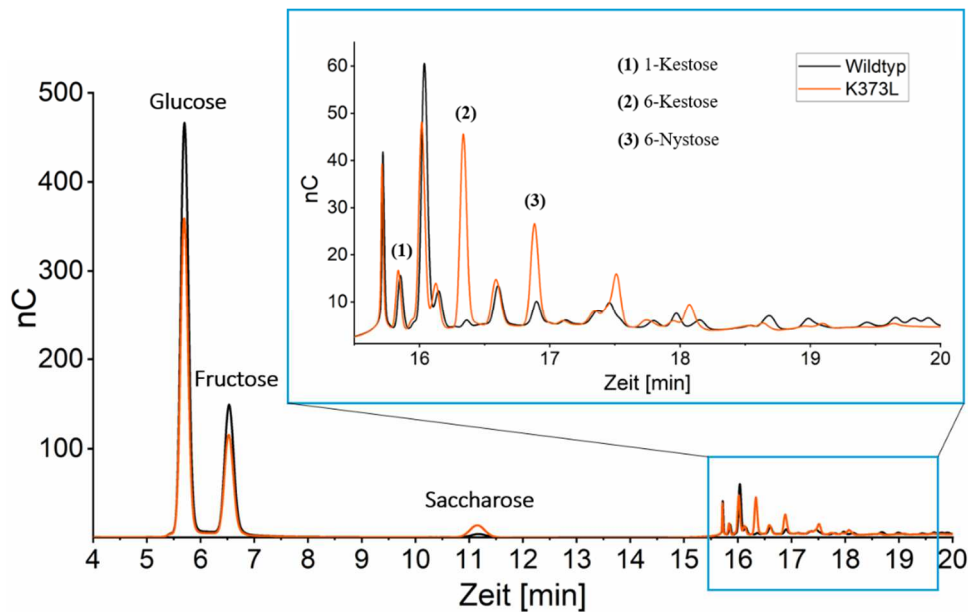


Abbildung 40: HPAEC-PAC Analyse des Produktspektrums der *Bm*-Levansucrase Variante K373L. Das Chromatogramm zeigt die Verhältnisse zwischen Mono- und Disacchariden zu den Oligosacchariden in dem blauen Kasten. Ein Zoom in das Oligosaccharid-Gemisch verdeutlicht außerdem den Unterschied zwischen dem Wildtyp-Enzym und der Variante K373L, die 6-Kestose und 6-Nystose vergleichsweise im großen Überschuss produziert.^[127]

Sowohl die fermentative als auch die chromatographische Abtrennung von Glucose und Fructose wurden in quantitativer Ausbeute und ohne nennenswerten Verlust an Fructooligosacchariden durchgeführt. Jedoch ist die säulenchromatographische Separierung durch Kieselgel mit einem wesentlich höheren Aufwand verbunden, der sowohl den Zeitfaktor als auch wirtschaftliche und ökologische Aspekte miteinschließt. Vor allem bei großtechnischen Anwendungen wäre eine große Menge organischer Lösungsmittel und nicht recycelbarem Kieselgel erforderlich.

Der Hefestamm *Hansenula polymorpha* wurde für die fermentative Reinigung des Rohgemisches gewählt, da sie eine Saccharose-hydrolysierende Maltase, aber keine Fructooligosaccharid-abbauenden Invertasen enthält.^[130] Der einzige Nachteil bestand darin, dass die Fermentation der Monosaccharide Glucose und Fructose mit der Synthese anderer Nebenprodukte, wie Ethanol und Glycerin, einherging. In den weiteren Reinigungsschritten erwies sich dies allerdings als unproblematisch. Der Fermentationsprozess dauerte 24 h bis die Glucose und Fructose nahezu vollständig verbraucht wurden (Abbildung 41). Da während der Fermentation keine Beaufsichtigung der Reaktion notwendig war, ist der Arbeitsaufwand im Vergleich zur Säulenchromatographie sehr gering.

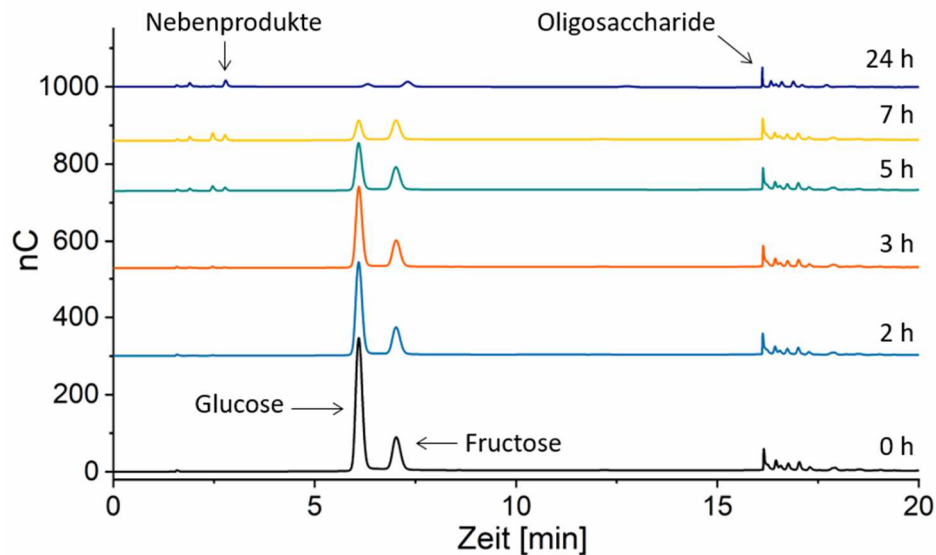


Abbildung 41: HPAEC-PAC Diagramme der Glucose und Fructose Fermentation mit dem Hefeorganismus *Hansenula polymorpha* in einem Zeitraum zwischen 0-24 h. Darstellung modifiziert nach Possiel *et al.*^[127]

In dem darauffolgenden Reinigungsschritt wurde das vorgereinigte Oligosaccharid-Gemisch zunächst durch Größenausschluss-Chromatographie mit einer Bio-Gel®P2-Säule weiter aufgereinigt. Dies ermöglichte eine grobe Trennung von Oligosacchariden unterschiedlicher Länge, was zu einer Fraktion führte, die hauptsächlich Tri- und Tetrasaccharide enthielt. Die Isolierung der reinen Fraktionen der 6-Kestose, 1-Kestose und 6-Nystose wurde anschließend mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie (RP18-HPLC) vorgenommen. Ausgehend von 19,5 g des Rohprodukts, wurden 43 mg 1-Kestose (28 %), 111 mg 6-Kestose (56 %) und 62 mg der 6-Nystose (20 %) in hoher Reinheit (> 95 %) isoliert (Abbildung 42). Die prozentualen Ausbeuten sind auf die maximal enthaltene Menge des jeweiligen Oligosaccharids in dem Rohprodukt bezogen, wobei für die Berechnung die Integrale des HPAEC-PAC-Diagramms der Variante K373L herangezogen wurde.

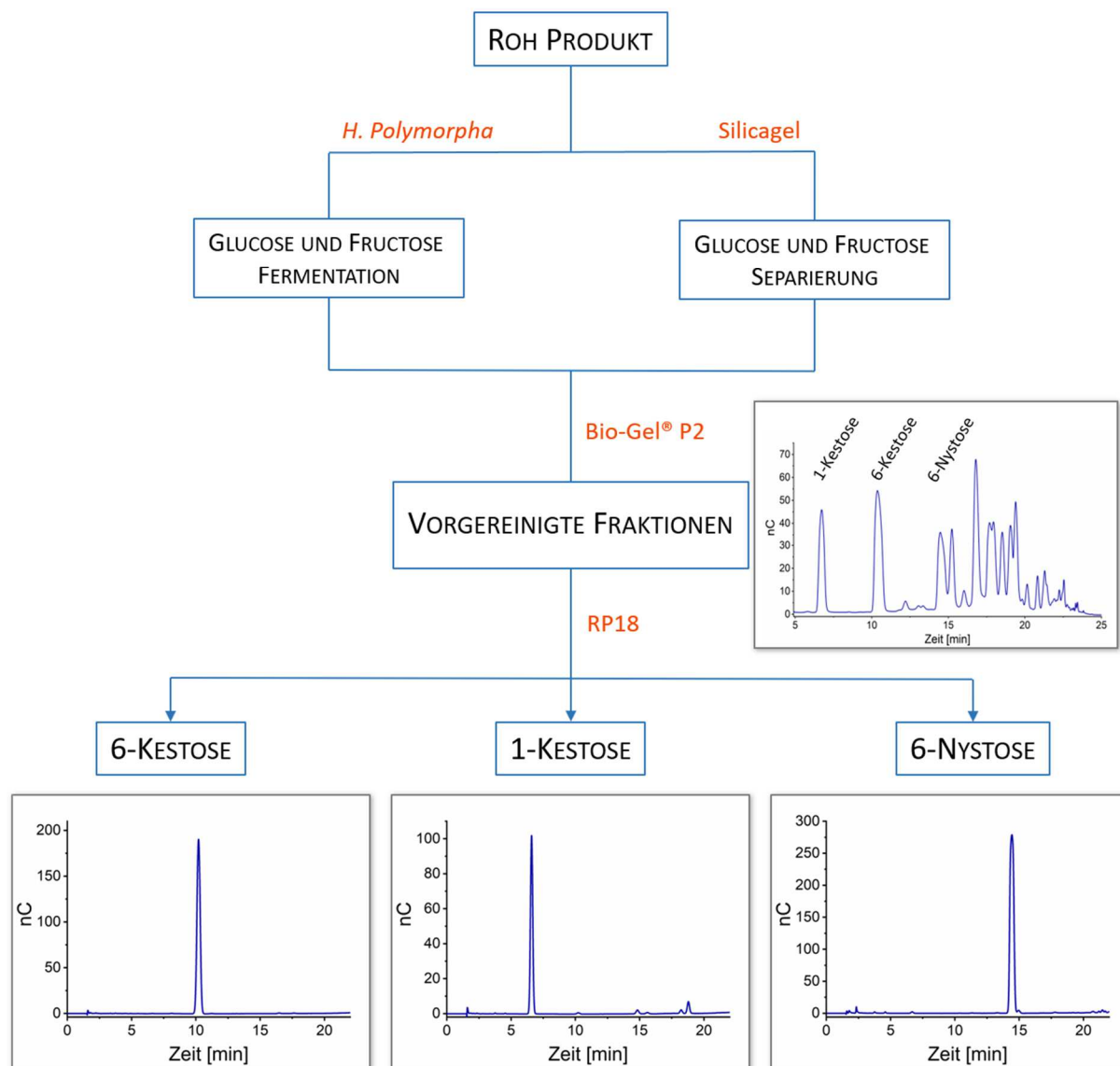


Abbildung 42: Reinigungsprozess des enzymatisch synthetisierten Rohprodukts, das sowohl Mono- und Disaccharide als auch Oligosaccharide enthält. Die Monosaccharide Glucose und Fructose wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden abgetrennt: 1) Normalphasen-Säulenchromatographie, 2) Fermentation mit dem Hefestamm *Hansenula polymorpha*. Nach der Größenausschluss-Chromatographie (Bio-Gel®P2) und der Umkehrphasen-Chromatographie (RP18-HPLC) wurden schließlich die erwünschten Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose in hoher Reinheit (> 95 %) und moderaten Ausbeuten erhalten. Darstellung modifiziert nach Possiel *et al.*^[127]

Die analytische Charakterisierung der isolierten Produkte erfolgte neben der ionenchromatographischen Zuordnung mit Hilfe vorhandener Standards, auch durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Der verwendete Standard für die exakte Identifikation der Produkte mittels HPAEC-PAC-Messungen, enthielt die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose, 1-Nystose, 6-Nystose und ein weiteres Tetrasaccharid in der genannten Reihenfolge, wobei die zu reinigenden Produkte eindeutig zugeordnet werden konnten (Abbildung 43).

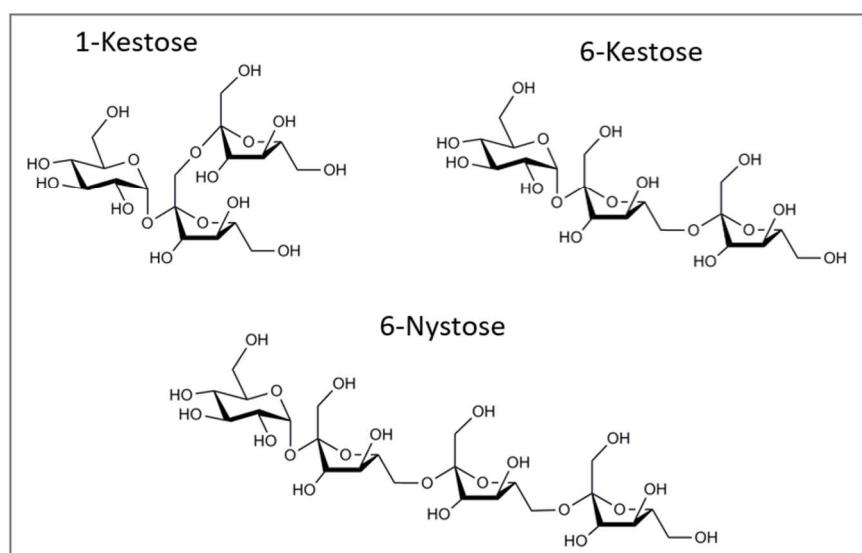
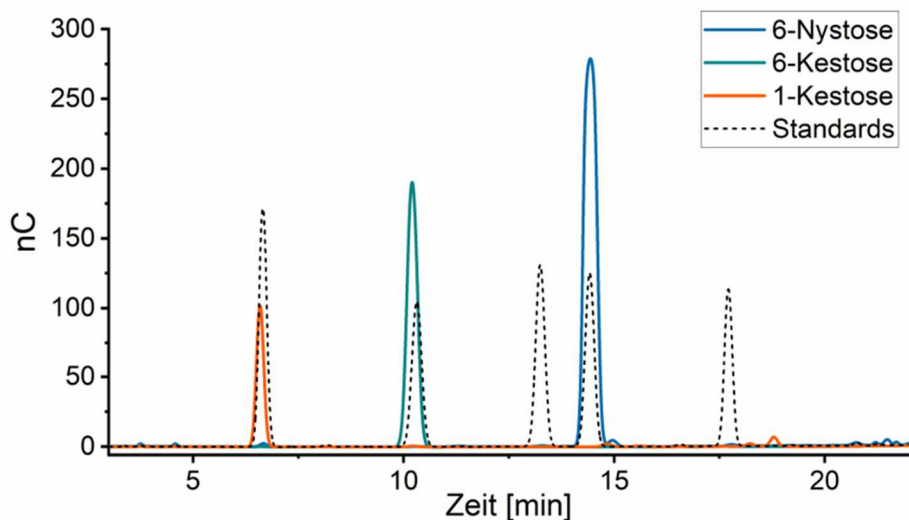


Abbildung 43: HPAEC-PAC-Diagramm der isolierten Verbindungen mit Standards (oben) und den dazugehörigen chemischen Strukturen (unten). Der verwendete Standard enthielt die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose, 1-Nystose, 6-Nystose und ein weiteres Tetrasaccharid in der genannten Reihenfolge. Darstellung modifiziert nach Possiel *et al.*^[127]

Durch die Vollcharakterisierung mittels NMR-Messungen konnten darüber hinaus die Verknüpfungsmuster der Oligosaccharide genau bestimmt werden. Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme der 2D-NMR-Spektren COSY, HSQC und HMBC, wobei das anomere H-Atom der Glucose meist als Ausgangspunkt für die Zuteilung diente. Zur Aufklärung der $\beta(2\rightarrow6)$ glycosidischen Bindung der 6-Kestose wurde das HMBC-Spektrum (Anhang, Abbildung 59) herangezogen, welches Kreuzsignale zwischen den beiden H-Atomen am C6 der ersten Fructose-Einheit ($H_{\text{Fru1-6'a/6'b}}$) und den quartären C-Atomen der Fructose aufwies (Abbildung 44, Markierung in orange). Trotz der fehlenden Aufspaltung der beiden quartären Fructose-Kohlenstoffe $C_{\text{Fru1-2'}}$ und $C_{\text{Fru2-2''}}$ konnte die $\beta(2\rightarrow6)$ Verknüpfung damit nachgewiesen werden.

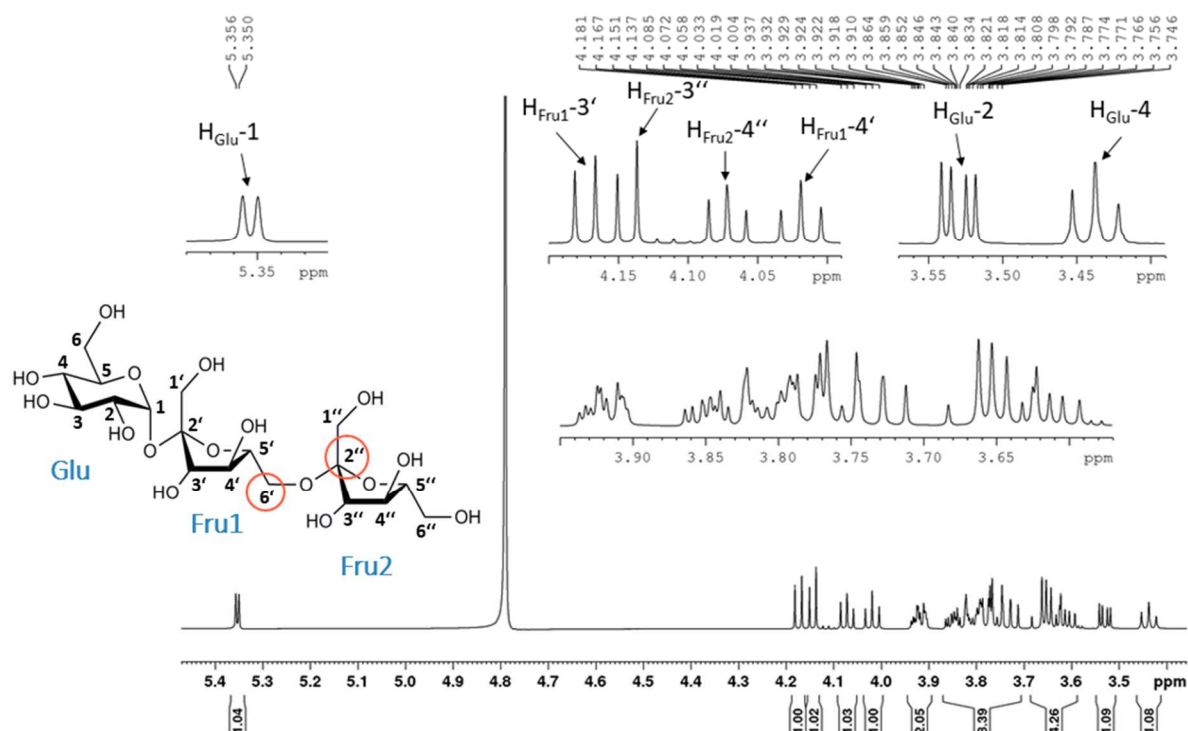


Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, D_2O) der 6-Kestose. Die wichtigen Positionen für den Nachweis des Verknüpfungsmusters wurden orange markiert. Darstellung modifiziert nach Possiel *et al.*^[127]

Analog zur 6-Kestose wurde auch für die Bestimmung des Verknüpfungsmusters der 1-Kestose vorgegangen. Die Signale der quartären Kohlenstoffe der beiden Fructose-Einheiten ($\text{C}_{\text{Fru1-2}'}$ und $\text{C}_{\text{Fru2-2}''}$) waren in diesem ^{13}C -Spektrum aufgespalten und konnten damit genau zugeordnet werden. Das Kreuzsignal im HMBC-Spektrum (Anhang, Abbildung 57) bestätigte auch hier die erwartete $\beta(1\rightarrow2)$ Bindungsknüpfung, da eine Kopplung zwischen dem quartären C-Atom der zweiten Fructose und den beiden H-Atomen an C1 ($\text{H}_{\text{Fru1-1}'\text{a}/1'\text{b}}$) festgestellt wurde (Abbildung 45, Markierung in orange).

Im Falle der 6-Nystose konnte ebenfalls eine Aufspaltung der drei quartären C-Atome der Fructose beobachtet werden (Anhang, Abbildung 61), was schließlich die eindeutige Strukturaufklärung erlaubte. Durch die Kopplung der H-Atome an C6 der ersten Fructose mit dem C2 der zweiten Fructose konnte zunächst die erste $\beta(2\rightarrow6)$ Verknüpfung nachgewiesen werden. Die Existenz der zweiten $\beta(2\rightarrow6)$ Bindung wurde durch das Kreuzsignal zwischen $\text{H}_{\text{Fru2-6}''\text{b}}$ und dem C2 der dritten Fructose-Einheit bewiesen (Abbildung 46, Markierung in orange).

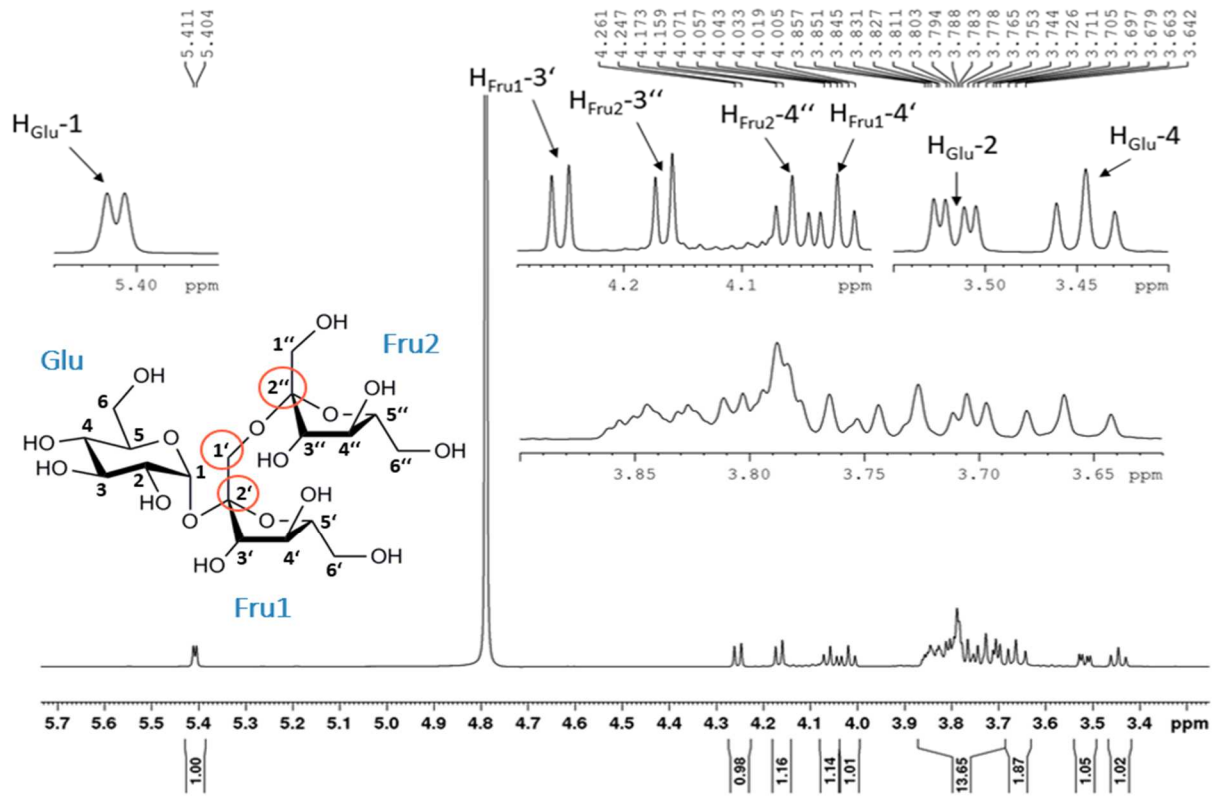


Abbildung 45: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, D₂O) der 1-Kestose. Die wichtigen Positionen für den Nachweis des Verknüpfungsmusters wurden orange markiert. Darstellung modifiziert nach Possiel *et al.*^[127]

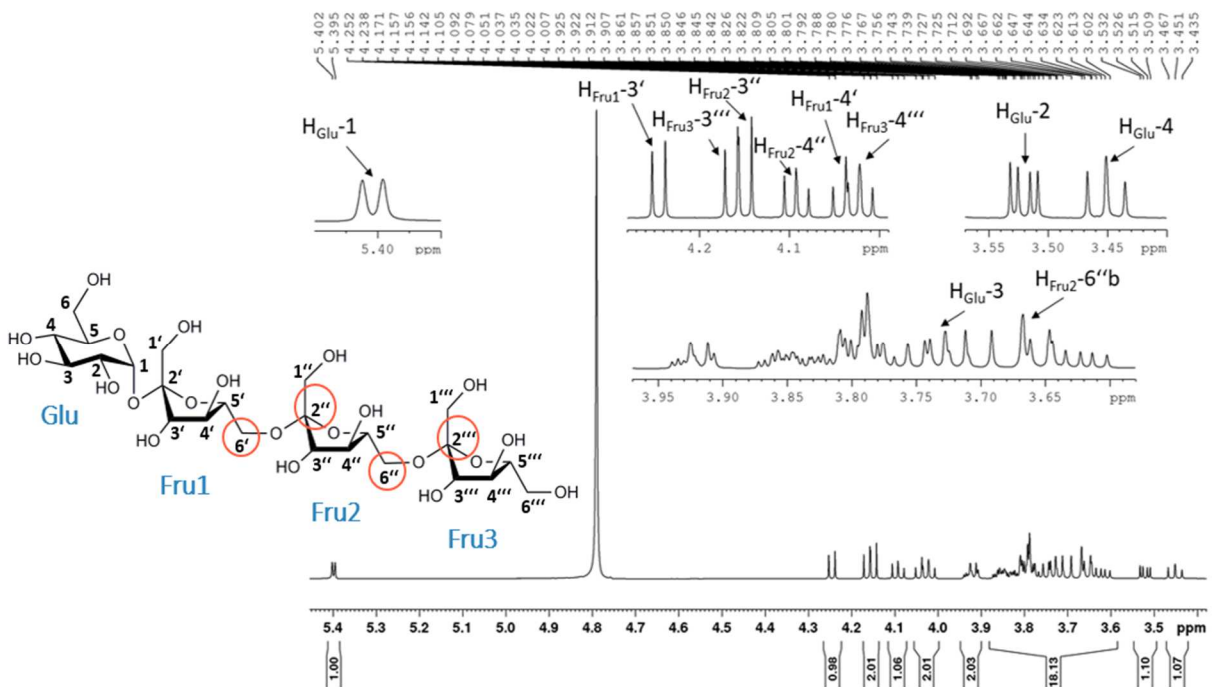


Abbildung 46: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, D₂O) der 6-Nystose. Die wichtigen Positionen für den Nachweis des Verknüpfungsmusters wurden orange markiert. Darstellung modifiziert nach Possiel *et al.*^[127]

4.3 Entwicklung einer photo-biokatalysierten Kaskaden-Reaktion

Der Oberbegriff Katalyse wird im Allgemeinen in drei Kategorien eingeteilt: Die homogene, heterogene und enzymatische Katalyse, welche sich jeweils als eigenständige Forschungsgebiete entwickelt haben. Eine Kombination der unterschiedlichen Katalyse-Bereiche kann die Vorteile der einzelnen Disziplinen vereinen und neue Synthesewege eröffnen. Ein sogenannter Hybridkatalysator, z. B. bestehend aus homogener-enzymatischer Katalyse, könnte nicht nur die Aktivität, Selektivität, Lebensdauer und Recyclingfähigkeit erhöhen sondern auch zusätzliche Funktionalitäten aufweisen, indem Mikroumgebungen für neuartige Reaktionen geschaffen und Kaskaden-Reaktionen ermöglicht werden.^[131] Solche Reaktionen sind jedoch schwierig zu entwickeln, da chemische und enzymatische Katalysatoren in der Regel verschiedene Reaktionsmedien und -bedingungen benötigen oder sich gegenseitig inaktivieren können.^[132] Dennoch gibt es bereits einige erfolgreiche Beispiele und stetig hinzukommende Methoden, die aufzeigen wie diese Problematik bewältigt werden kann.^[133]

Ein Ansatz beruht zum Beispiel auf der Separierung der Katalysatoren innerhalb eines Reaktionssystems, was durch den Einsatz einer semipermeablen Membran erreicht werden kann.^[134] Eine weitere Herangehensweise stellt die Immobilisierung eines der verwendeten Katalysatorsystemen dar, wobei die Immobilisierung sowohl mit dem Enzym als auch mit dem (metall-)organischen Katalysator möglich ist. Diesbezüglich wurden große Fortschritte in der Gruppe von Lipshutz erzielt, die spezielle Tenside entworfen hat, um verschiedene (metall-)organische Katalysatoren sowie Photokatalysatoren in wässrigen Medien löslich zu machen, ohne ihre Aktivität zu verringern. Die entwickelten Tenside bilden in Wasser Nanomizellen aus, die nicht nur als Medium für die Katalysatoren, sondern auch als Reservoir für Substrate und Produkte dienen (Abbildung 47, B).^[135-136]

Eine weitere Perspektive für die Kombination von Biokatalyse und Photokatalyse ist die Entwicklung von Designer-Enzymen, die in der Lage sind, promiskuitive Transformationen zu katalysieren. Durch die Inkorporierung nicht-natürlicher Aminosäuren oder durch die gezielte chemische Modifikation bestimmter Reste könnten Enzyme als chirale Umgebung für eine photokatalytische Reaktion oder für die Entwicklung photoschaltbarer Katalysatoren eingesetzt werden (Abbildung 47, C).^[137-139]

Im Zuge dieser Arbeit wurden Vorarbeiten geleistet, um verschiedene Ansätze für die Kombination von Biokatalyse und Photokatalyse zu ermöglichen. Für die Entwicklung einer linearen Kaskaden-Reaktion, sollten daher für den enzymatischen Schritt zwei unterschiedliche Halogenasen RebH und RadH mit den zugehörigen Regenerations-systemen exprimiert und auf ihre Aktivität überprüft werden. Die natürlichen Substrate

der Halogenasen sind Tryptophan (RebH) und 6-Hydroxyisochinolin (RadH). Der photokatalytische Schritt sollte durch ein Derivat des organischen Photokatalysators 4CzIPN (1,2,3,5-Tetrakis(carbazol-9-yl)-4,6-dicyanbenzol) erfolgen, der eine decarboxylierende C-C-Bindungsknüpfung zwischen einer Säure-Verbindung und einem halogenierten Aromaten katalysiert (Abbildung 47, A). Basierend auf der Struktur des Photokatalysators 4CzIPN sollte zudem ein clickbarer Photokatalysator synthetisiert und deren Photoaktivität getestet werden.

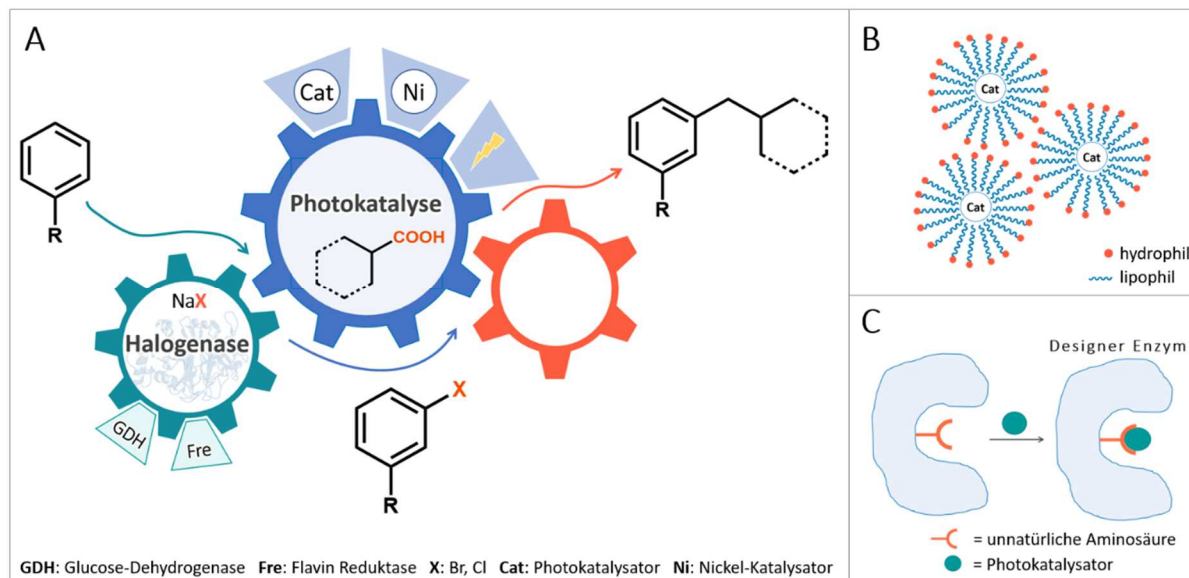


Abbildung 47: A) Photo-biokatalysierte Kaskaden-Reaktion: Im ersten Schritt wird durch eine Halogenase ein aromatisches Substrat halogeniert, das im zweiten Schritt durch einen Photokatalysator mit einer Säure-Verbindung in einer decarboxylierenden C-C-Bindungsknüpfung umgesetzt wird. B) Ansatz für eine Photokatalyse in wässrigem Medium durch Immobilisierung des Photokatalysators in Nanomicellen. C) Kombination von Biokatalyse und Photokatalyse durch Entwicklung von Designer-Enzymen.

4.3.1 Expression und Charakterisierung der Halogenasen mit einem Co-Faktor-Regenerationssystem

Für den enzymatischen Schritt der Kaskaden-Reaktion wurden die Halogenasen RebH und RadH, sowie das Co-Faktor-Regenerationssystem, bestehend aus der Flavin-Reduktase (Fre) und der Glucose-Dehydrogenase (GDH), zunächst kloniert, exprimiert und gereinigt. Das Co-Faktor-Regenerationssystem dient dazu, die erforderliche Menge der Co-Faktoren FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) auf ein Minimum zu beschränken, indem sie enzymatisch durch Fre und GDH regeneriert werden. Während des Prozesses wird dabei das einfach zugängliche Substrat Glucose verbraucht (Abbildung 48).

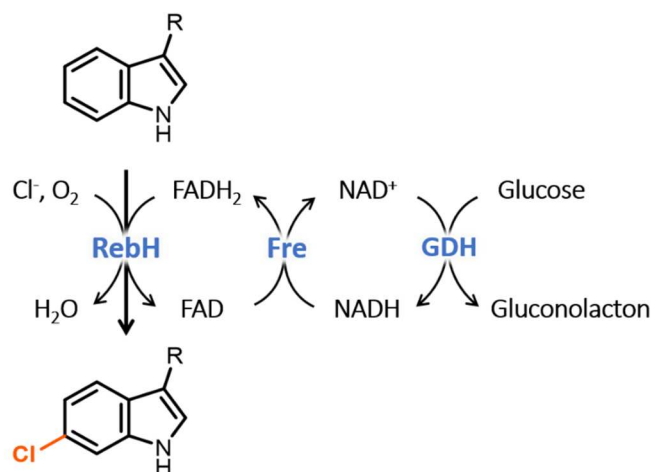


Abbildung 48: Reaktionszyklus der Halogenasen am Beispiel von RebH mit Regenerationssystem aus Flavin-Reduktase (Fre) und Glucose-Dehydrogenase (GDH).

Die Klonierung der Enzyme RebH, RadH und GDH wurde unter Verwendung synthetischer codon-optimierter Gene für die heterologe Expression in *E. coli* durchgeführt. Die synthetischen Gene wurden bei der Firma *ThermoFisher Scientific* in Auftrag gegeben und in dem Trägervektor pMA geliefert (Anhang, Abbildung 101). Nach Vermehrung der Gene in ihrem Klonierungsplasmid pMA, wurden sie anschließend über die *NcoI*- und *XhoI*-Schnittstellen in das Expressionsplasmid pETM11 kloniert. Im Gegensatz zu RadH und GDH, wurde die Halogenase RebH mit dem Gpro7 Chaperone Plasmid co-transformiert und -exprimiert, weil dadurch in der Regel bessere Ausbeuten erreicht wurden.^[140] Schließlich ließen sich alle drei Enzyme erfolgreich in ausreichend löslicher Form exprimieren und per His-Tag Affinitätschromatographie aufzureinigen. Im Falle der Flavin-Reduktase (Fre) wurde zunächst die genomische DNA von *E. coli* ATCC 25922 isoliert und anschließend das Ziel-Gen des Enzyms durch PCR amplifiziert. Das Gen wurde ebenfalls in den Vektor pETM11 kloniert und das Protein in ausreichender Menge exprimiert und isoliert (Abbildung 49).

Die Aktivität der Halogenasen im Zusammenspiel mit dem Regenerationssystem wurde mit den natürlichen Substraten des jeweiligen Enzyms überprüft und nachgewiesen. In beiden Fällen wurde ein Substrat-Umsatz von > 98 % zum chlorierten Produkt beobachtet (Anhang, Abbildungen 86, 87).

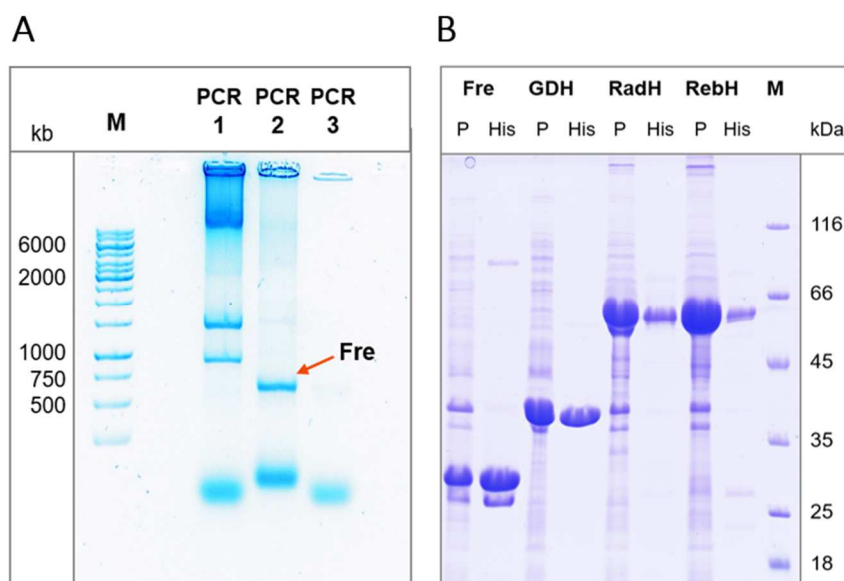


Abbildung 49: A) PCR Reaktionen mit unterschiedlichen Bedingungen zur Amplifizierung des Fre-Gens aus der genomischen DNA von *E. coli* ATCC 25922. B) Proteinaufreinigung der Flavin-Reduktase (Fre), Glucose-Dehydrogenase (GDH) und den beiden Halogenasen RadH und RebH mittels His-Tag Affinitätschromatographie. „P“ steht für das unaufgereinigte Zellpellet, das noch unlösliche Anteile des Enzyms enthält. Die Abkürzung „His“ bezeichnet die aufgereinigte Enzymprobe. (M = Marker, Größenstandard)

4.3.2 Synthese eines clickbaren Photokatalysators

Die photokatalysierte organische Synthese mit Metallkomplexen aus Iridium und Ruthenium hat in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit erlangt. Die organische Verbindung 4CzIPN ist dazu eine ausgezeichnete, preiswerte sowie metallfreie Alternative und bietet aufgrund ihrer Struktur als Donor-Akzeptor-Molekül ein hervorragendes Redox-Fenster, eine gute chemische Stabilität und eine breite Anwendbarkeit. Die Ladungstransfer-Eigenschaften von 4CzIPN-Analoga mit spezifischen Redoxpotenzialen können darüber hinaus durch Austausch von Donatoren und Akzeptoren modifiziert werden (Abbildung 50). Obwohl der Photokatalysator 4CzIPN erst seit 2016 zum Einsatz kommt, wurde bereits ein breites Anwendungsspektrum abgedeckt. So konnten beispielsweise Benzyl-Radikale, Formyl-Radikale, CCl_3 -Radikale, Silyl-Radikale, Amidyl-Radikale, Alkyl-Radikale, Carbamoyl-Radikale, Thieryl-Radikale usw. aus vielen verschiedenen Ausgangssubstanzen generiert und in unterschiedlichen Reaktionen umgesetzt werden.^[141-143]

Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und der flexiblen Anpassung des Redoxpotentials, wurde 4CzIPN für die Ausarbeitung einer *Proof-of-Concept*-Studie ausgewählt, welche die Funktionalisierung des Photokatalysators für Click-Reaktionen und erste Vorversuche für die Inkorporierung des Katalysators in ein Protein vorsah.

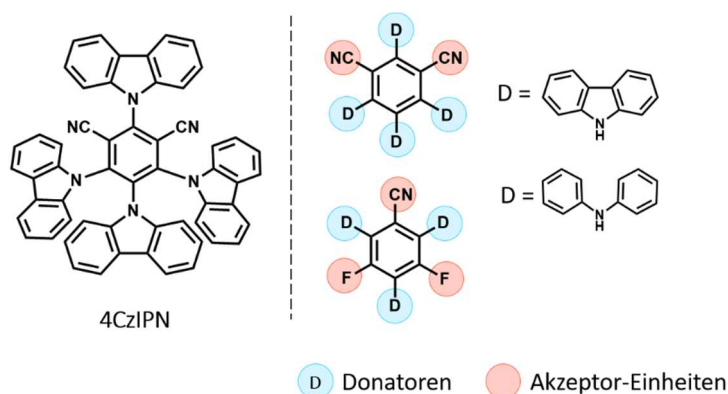


Abbildung 50: Struktur des Photokatalysators 4CzIPN und weitere mögliche Kombinationen aus Donatoren und Akzeptoren.

Für die Synthese des clickbaren Photokatalysators sollte ausgehend von dem kommerziell erhältlichen 3-Bromocarbazol **6** sowohl der Azido-funktionalisierte als auch der Alkin-funktionalisierte Photokatalysator synthetisiert werden. Die Idee war, zunächst nur die Donor-Einheiten des Moleküls 4CzIPN zu verändern und im Falle eines inaktiven Photokatalysators, die Akzeptor-Einheiten so anzupassen, dass das für die Photoaktivität erforderliche Redoxpotential wiederhergestellt werden kann. In der ersten Synthesestrategie bestand der erste Schritt aus einer nukleophilen aromatischen Substitution (S_NAr) mit einer fast quantitativen Umsetzung von 3-Bromocarbazol **6** und Tetrafluor-isophthalonitril **12** zu dem Zwischenprodukt **7**. Jedoch wurden im nächsten Schritt durch die Sonogashira-Kupplung überwiegend unvollständige Kupplungsprodukte erhalten, die zudem schwer chromatographisch trennbar waren. Aus diesem Grund wurde die Synthese-Reihenfolge geändert und die Sonogashira-Kupplung zuerst durchgeführt.

So gelang es, Carbazol **8** mit TMS-geschützter Alkin-Gruppe in quantitativer Ausbeute zu isolieren. Im nächsten Schritt erfolgte die nukleophile aromatische Substitution mit anschließender TMS-Entschützung, ohne Aufreinigung des Zwischenprodukts. Der Alkin-funktionalisierte Photokatalysator **9** konnte auf diese Weise mit einer Ausbeute von 91 % über zwei Stufen erfolgreich hergestellt werden. Die Azido-Funktionalisierung des 3-Bromocarbazols mit Natriumazid wurde unter Verwendung des Liganden **14** und des Katalysators CuI durchgeführt und ergab das gewünschte Produkt 3-Azido-Carbazol **10** mit einer Ausbeute von 87 %. Der letzte Schritt zum Azido-funktionalisierten Photokatalysator **11** wurde wie zuvor beschrieben über eine S_NAr mit 53 % Ausbeute erreicht (Abbildung 51).

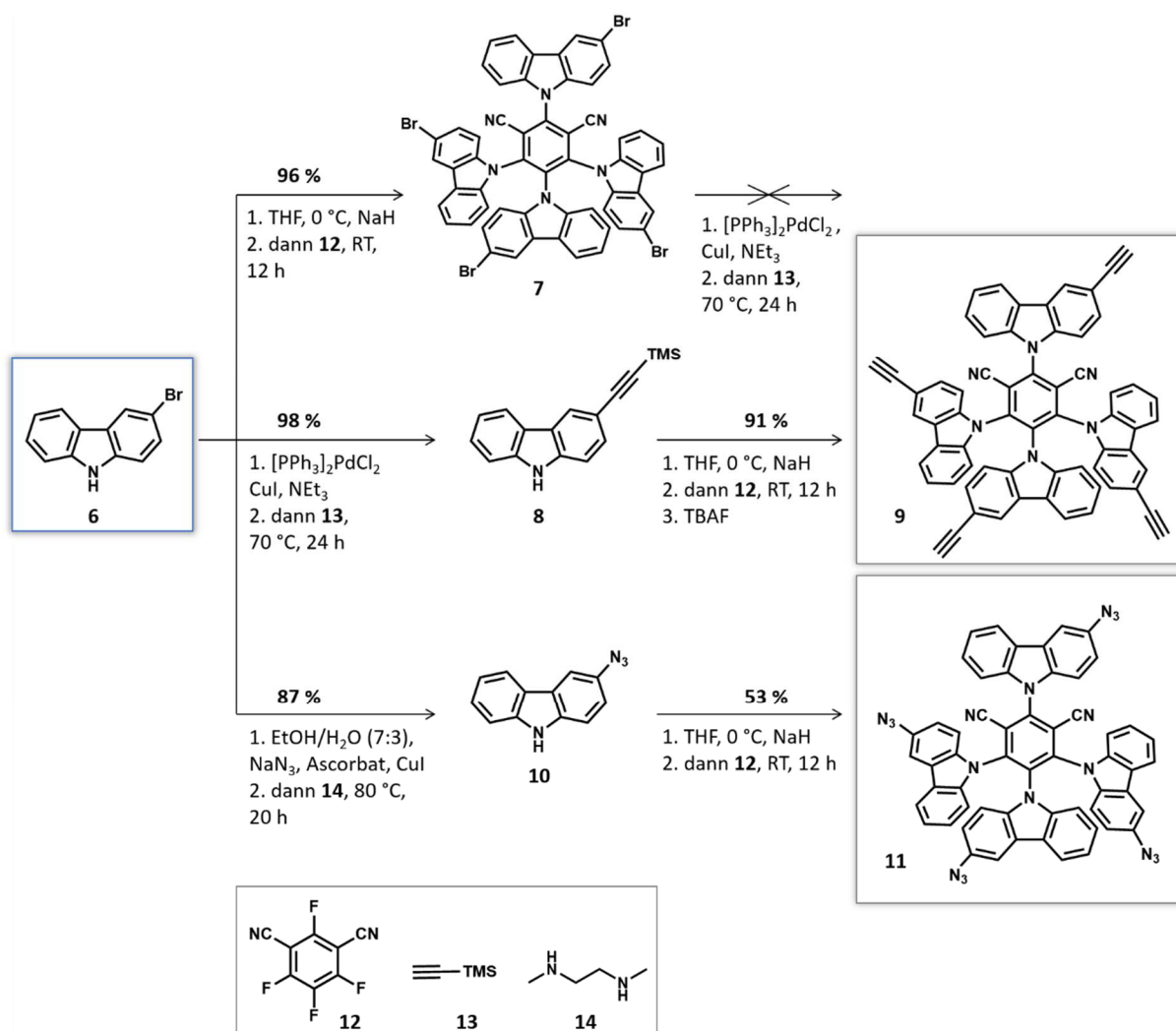


Abbildung 51: Syntheserouten zu den Alkin- und Azid-funktionalisierten Photokatalysatoren **9** und **11**, ausgehend von der kommerziell erhältlichen Verbindung 3-Bromocarbazol **6**.

Die clickbaren Photokatalysatoren **9** und **11** wurden daraufhin in einer photo-redoxkatalysierten Kreuzkupplung von Boc-Prolin **19** und Brombenzol **20** auf ihre katalytische Aktivität getestet. Hierbei erwies sich die Alkin-funktionalisierte Verbindung **9** als photokatalytisch aktiv, wohingegen der Azidophotokatalysator **11** keine Aktivität aufzeigte (Abbildung 53). In der Photoreaktion mit Katalysator **9** lag die isolierte Ausbeute des Kupplungsprodukts **21** bei 12 %, was im Vergleich zu der Reaktion mit dem unmodifizierten Photokatalysator 4CzIPN (72 % Ausbeute) verhältnismäßig gering ausfiel.^[141] Für das weitere Vorgehen lag der Fokus jedoch weniger auf der Optimierung der Reaktionsbedingungen, sondern vielmehr darauf, einen Photokatalysator zu entwickeln, der durch die Kombination mit größeren Strukturen (z. B. Proteine) neue Eigenschaften hervorbringt. Um dieses Vorhaben zu realisieren musste im nächsten Schritt geklärt werden, welchen Einfluss die Erweiterung des Photokatalysators **9** mit

einem Peptid oder einer Aminosäure auf die Aktivität hat, und ob die Photoaktivität nach der Click-Reaktion überhaupt erhalten bleibt.

Zu diesem Zweck wurde das azidofunktionalisierte Peptid **15** mit sechs Aminosäure-Einheiten mittels Festphasensynthese hergestellt und zur Modifizierung des Photokatalysators **9** eingesetzt (Abbildung 52, *oben*). Darüber hinaus wurde mit der Aminosäure Azido-Alanin **17** und Katalysator **9** eine Click-Reaktion durchgeführt, in der alle Alkin-Gruppen des Photokatalysators mit der Aminosäure konjugiert werden sollten (Abbildung 52, *unten*).

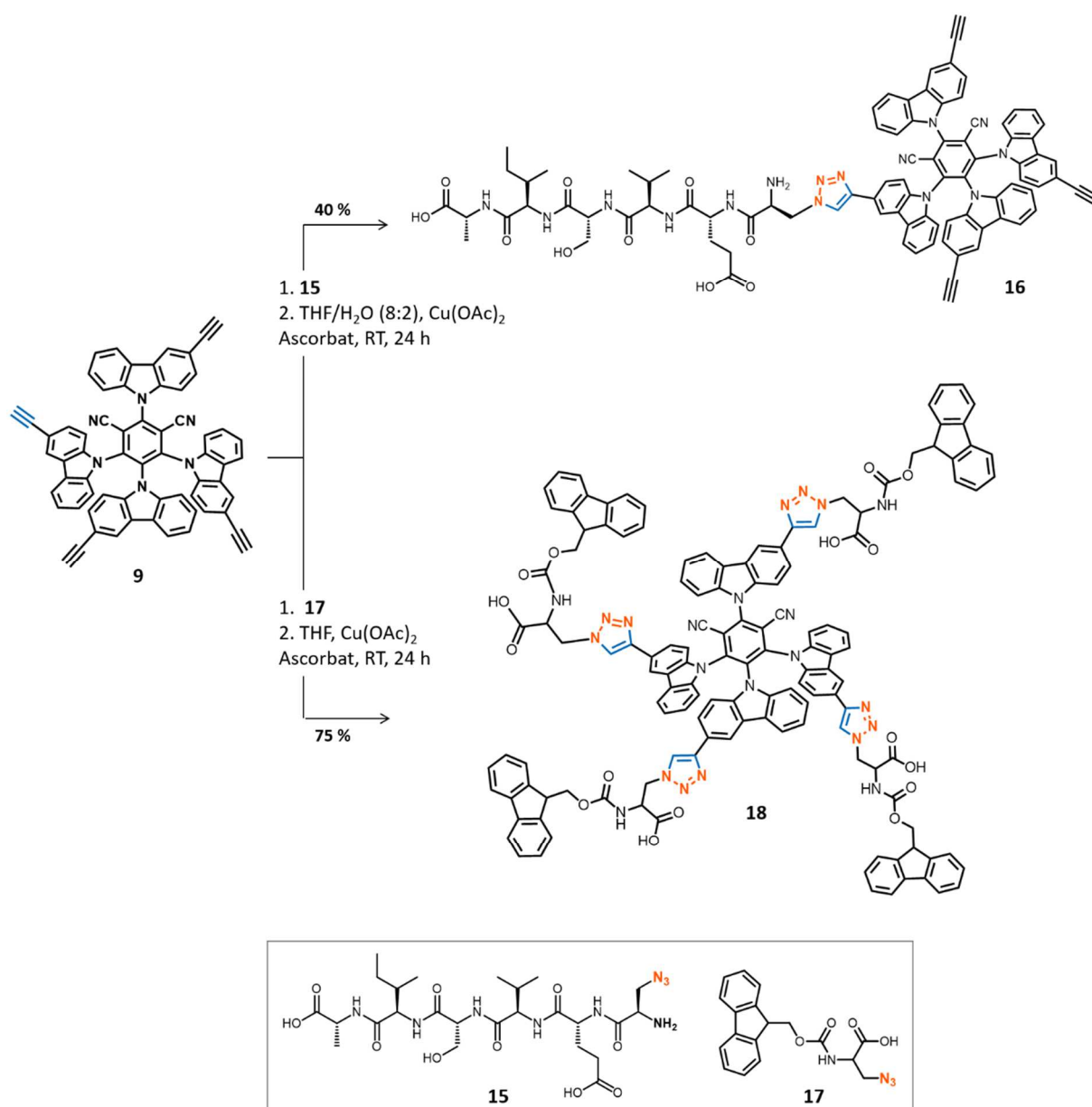


Abbildung 52: Click-Reaktionen des Alkin-funktionalisierten Photokatalysators **9** mit dem Peptid **15** und der Aminosäure **17**.

Die Synthese des Peptid-funktionalisierten Photokatalysators **16** stellt im Wesentlichen ein Vorversuch für die Click-Reaktion mit einem Protein dar und ist daher der erste Schritt in Richtung Entwicklung eines Designer-Enzyms. Mit dem funktionalisierten Photokatalysator **18** sollte der Einfluss der Click-Reaktion auf die Aktivität überprüft und zusätzlich eine chirale Umgebung für den Katalysator erzeugt werden.

Die Aktivität der modifizierten Photokatalysatoren **16** und **18** wurde nach der Photo-reaktion qualitativ mittels Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie ermittelt. In beiden Fällen wurde das Kupplungsprodukt **21** detektiert und die Photo-aktivität damit eindeutig nachgewiesen.

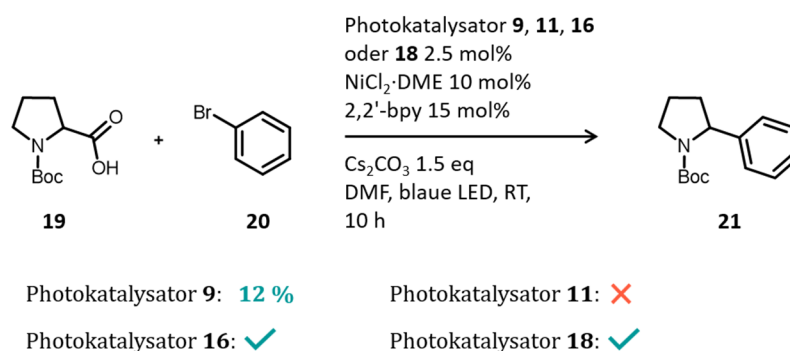


Abbildung 53: Photokatalysierte decarboxylierende C-C-Bindungsknüpfung zwischen Boc-Prolin und Brombenzol mit den synthetisierten Photokatalysatoren **9**, **11**, **16** und **18**. Der grüne Haken bedeutet, dass Aktivität nachgewiesen wurde, während das rote „X“ für einen inaktiven Katalysator steht.

Die in dieser *Proof-of-Concept*-Studie erzielten Ergebnisse ermöglichen den Zugang zu einem clickbaren und aktiven Photokatalysator, der auch nach der Funktionalisierung mit einem Peptid oder einer Aminosäure Aktivität aufwies. Für weiterführende Untersuchungen wäre es sinnvoll, zunächst die Reaktionsbedingungen derart zu optimieren, dass höhere Ausbeuten erreicht werden. Es könnten zum Beispiel unterschiedliche Reaktionsmedien, Basen oder verschiedene Liganden für den Co-Katalysator Nickel getestet werden. Zudem könnte die Kombination anderer Substrate ebenfalls zu signifikanten Änderungen der Reaktionskinetik und Ausbeute führen. In diesem Zusammenhang sollten insbesondere die halogenierten Substrate Tryptophan und Hydroxyisochinolin der Halogenasen RebH und RadH überprüft werden. Dies stellt zugleich eine Voraussetzung dar, um die lineare Kaskaden-Reaktion der Halogenasen mit einem Photokatalysator zu verwirklichen.

Hinsichtlich der Entwicklung eines Designer-Enzyms mit neuartigen Eigenschaften, könnte durch die Auswahl geeigneter chiraler Substrate untersucht werden, ob bereits die Funktionalisierung mit einem Peptid oder einer Aminosäure ausreicht, um die Stereo- oder Enantioselektivität des Photokatalysators zu beeinflussen.

Verglichen mit der klassischen asymmetrischen Synthese, der Organokatalyse und der Enzymkatalyse rangiert das Repertoire der asymmetrischen photokatalysierten Reaktionen weit hinter den anderen und ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Derzeit beruhen die wichtigsten Ansätze für die enantioselektive Photokatalyse auf zwei Strategien: 1) Die duale Katalyse mit zwei Katalysatorsystemen, welches neben dem Photokatalysator noch einen unabhängigen chiralen Katalysator benötigt. 2) In der zweiten Herangehensweise ist die chirale Umgebung in einem einzigen bifunktionellen Photokatalysator integriert.^[144-146] Für die duale kooperative Photokatalyse können verschiedene chirale Co-Katalysatoren, wie z. B. chirale Amine, chirale Lewis-Säuren oder Lewis-Basen, chirale Übergangsmetalle sowie Enzyme ideale Aktivierungspartner sein und eine hervorragende chirale Umgebung für die reaktiven Radikale bieten.^[146]

In den vorgestellten Vorarbeiten zu dem Forschungsbereich der Photo-Biokatalyse wurden verschiedene Konzepte für die Kombination der Enzymkatalyse mit der Photokatalyse vorgestellt und für weiterführende Studien und die Entwicklung einer Kaskaden-Reaktion vorbereitet. In zukünftigen Experimenten kann die enzymatische Synthese halogener aromatischer Verbindungen mit der photokatalysierten C-C-Bindungsknüpfung gekoppelt werden. Hierbei gilt es herauszufinden, welche spezifischen Reaktionsbedingungen notwendig sind, um die Funktionalität beider Katalysatorsysteme (1. Halogenase, 2. Photokatalysator) aufrechtzuerhalten. Die Katalysatorsysteme könnten zum Beispiel durch eine semipermeable Membran getrennt werden oder der Photokatalysator durch Immobilisierung mit Hilfe spezieller Tenside in die wässrige Phase eingebracht werden. Der nächste richtungsweisende Schritt wäre die chemische Modifikation eines Enzyms, in diesem Fall der Halogenase, mit einem clickbaren Photokatalysator. Dies könnte mit der entwickelten Tyrosin-spezifischen Modifikationsmethode erfolgen. Damit wäre es möglich, ein Enzym herzustellen, das nicht nur zwei verschiedene Funktionen hat, sondern zusätzlich photochemisch gesteuert werden kann.

5 Zusammenfassung

Enzym-Modifikationen finden in der Natur in Form von posttranslationalen Protein-Modifikationen statt und sind ein faszinierender Mechanismus, um die biologische Vielfalt und Funktion von Proteinen um ein Vielfaches zu erhöhen. Daher ist es für ein ganzheitliches Verständnis bestimmter biologischer Prozesse oder enzymatischer Struktur-Funktions-Beziehungen unerlässlich, chemische Methoden zu entwickeln, die in der Lage sind, diese natürliche Diversität nachzuahmen.^[61] Die wohl größte Herausforderung der chemischen Protein-Konjugation ist die chemo- und regioselektive Modifikation einer gezielten Aminosäure bei gleichzeitig milden und physiologischen Reaktionsbedingungen. Trotz zahlreich beschriebener Ansätze zur selektiven Protein-Modifikation, bedarf es weiterhin neuer Methoden, da viele bestehende Herangehensweisen auf ein spezielles System zugeschnitten sind.^[9, 63]

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit eine breit anwendbare Methode zur selektiven chemischen Tyrosin-Modifikation am Modell der Levansucrase aus *Bacillus megaterium* entwickelt werden. Durch eine zweistufige Protein-Modifikation, bestehend aus einer En-Reaktion im ersten Schritt und einer Click-Reaktion im zweiten Konjugationsschritt, gelang es die Produktspezifität der *Bm*-Levansucrase rational zu beeinflussen. Zunächst wurde die Tyrosin-spezifische En-Reaktion mit der Luminol-Verbindung **1** an natürlich vorkommenden Tyrosin-Seitenketten der Levansucrase erprobt und analysiert. Hierbei zeigte sich durch massenspektrometrische Untersuchungen, dass hauptsächlich zwei der 25 vorhandenen Tyrosin-Reste mit dem Luminol-Tag **1** modifiziert wurden, zu denen die Seitenketten Y247 und Y196 gehörten. Um die Auswirkungen der Tyrosin-Modifikation leichter interpretieren zu können und eine gegenseitige Beeinflussung auszuschließen, wurde vorerst mit der Einzelmutante Y247F gearbeitet. Da nach der ersten Modifikation der Variante Y247F geringe Veränderungen im Produktspektrum beobachtet wurden, insbesondere im hochmolekularen Bereich, wurde die Click-Reaktion im zweiten Schritt mit der Intention durchgeführt, diesen Effekt zu verstärken. Schließlich bewirkte die Click-Reaktion mit Azidoglucose (AzGlc) bei Variante Y247F-1-AzGlc eine erhebliche Verschiebung der Produktverteilung von kleinen Fructooligosacchariden (ca. 1100 Da) hin zu hochmolekularem Levan (ca. $2,1 \cdot 10^6$ Da).

Drei weitere Positionen, die in der dritten Zone des Enzyms liegen, wurden für die gentechnische Substitution gegen nicht-native Tyrosin-Reste ausgewählt. Dadurch wurden die Varianten E314Y, D248Y sowie F445Y erhalten und anschließend wie zuvor in zwei Schritten chemisch modifiziert. Die Modifikation dieser Varianten führte hinsichtlich der Veränderung des Produktprofils zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie mit

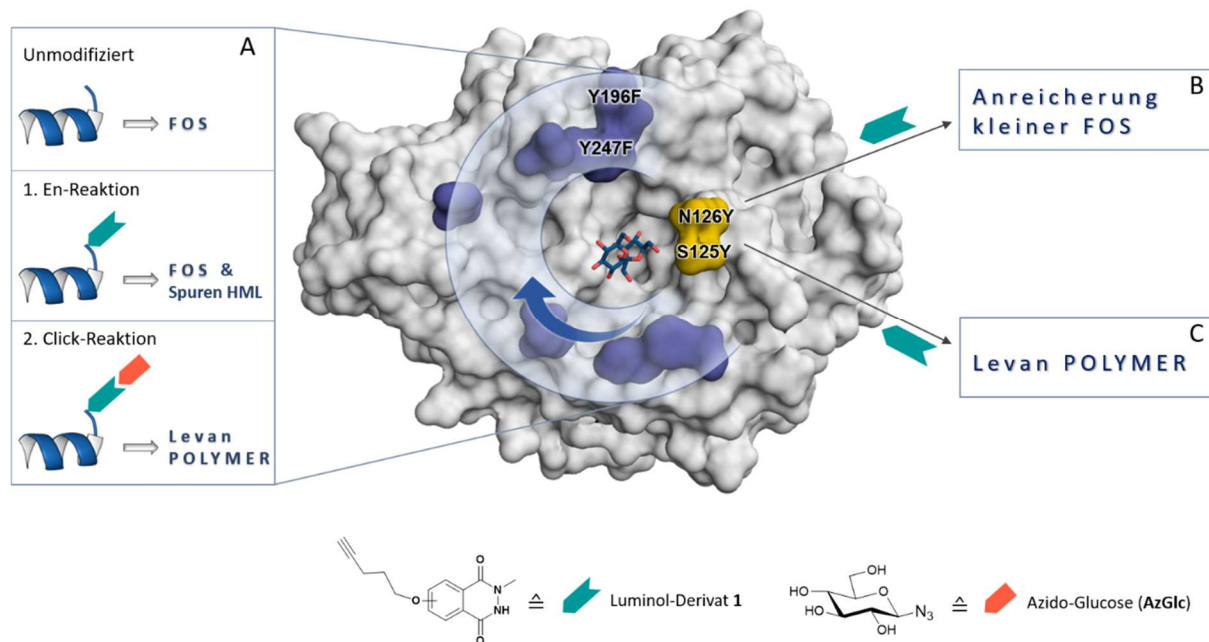
dem Enzym Y247F erhalten wurden (Übersicht 1, A). Um den Einfluss verschiedener Seitenketten zu analysieren, wurden neben der Azidoglucose vier weitere Azido-Verbindungen in der Click-Reaktion getestet.

Die Resultate aus den genannten Untersuchungen und die Einbeziehung molekular-dynamischer Simulationen ließen erste Rückschlüsse auf die mechanistischen Prozesse der *Bm*-Levansucrase und deren gezielte Manipulation zu: Die Größe der eingeführten Seitenkette sowie die Fähigkeit des *Tags* polare Wechselwirkungen auszubilden, spielen eine entscheidende Rolle zur rationalen Modulation der Produktspezifität. Insbesondere die räumliche Orientierung und Bewegung der Seitenkette -1-AzGlc und die damit einhergehende sterische Hinderung trugen dazu bei, eine vorzeitige Dissoziation der wachsenden Fructane zu verhindern und ermöglichten dadurch die prozessive Polymersynthese.

Weitere Erkenntnisse über den Levan-Elongationsmechanismus wurden durch die Modifikation der Varianten N126Y und S125Y erhalten. Diese lagen im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Tyrosin-Resten nicht im Wachstumsverlauf des Substrats und besaßen zudem eine kürzere Distanz zum aktiven Zentrum. In beiden Fällen führte bereits die erste Modifikation mit Luminol-Derivat **1** zu völlig unterschiedlichen Produktprofilen im Vergleich zu den zuvor untersuchten Enzym-Varianten. Während mit der Variante N126Y-**1** eine signifikante Akkumulation (bis zu 800 % Zunahme) verschiedener Oligosaccharide erzielt wurde, synthetisierte die Variante S125Y-**1** schon nach dem ersten Modifikationsschritt Levan-Polymer (Übersicht 1, B/C). Die zugrundeliegenden Interaktionen und Trajektorien der eingeführten Seitenkette wurden ebenfalls mit Hilfe von MD-Simulationen analysiert und bestätigten die zuvor getroffenen Annahmen. Durch die räumliche Nähe zur Substrat-Bindungstasche reichte bei Variante S125Y-**1** bereits die Luminol-Verbindung aus, um die Substrat-Dissoziation zu verhindern und damit die Polymersynthese zu induzieren. Hingegen dazu ergaben die Simulationen eine sehr dynamische und fluktuierende Seitenkette für N126Y-**1**, was vermutlich zur Destabilisierung initialer Wechselwirkungen zwischen Substrat und der Protein-oberfläche führte und dadurch die Freisetzung und Akkumulation kurzer Oligosaccharide begünstigte.

Durch die bioorthogonale chemische Einführung einer artifiziellen Seitenkette war es schließlich möglich, das Produktspektrum der *Bm*-Levansucrase sowohl in Richtung Polymersynthese als auch in Richtung kurzer Oligosaccharide zu lenken. Unter Verwendung der Tyrosin-spezifischen En-Reaktion wurden dafür gezielt native und nicht-native Tyrosin-Reste selektiv modifiziert und in einer Folgereaktion mittels Click-Chemie zusätzlich derivatisiert. Die Auswirkungen der Modifikations-Reaktionen auf den

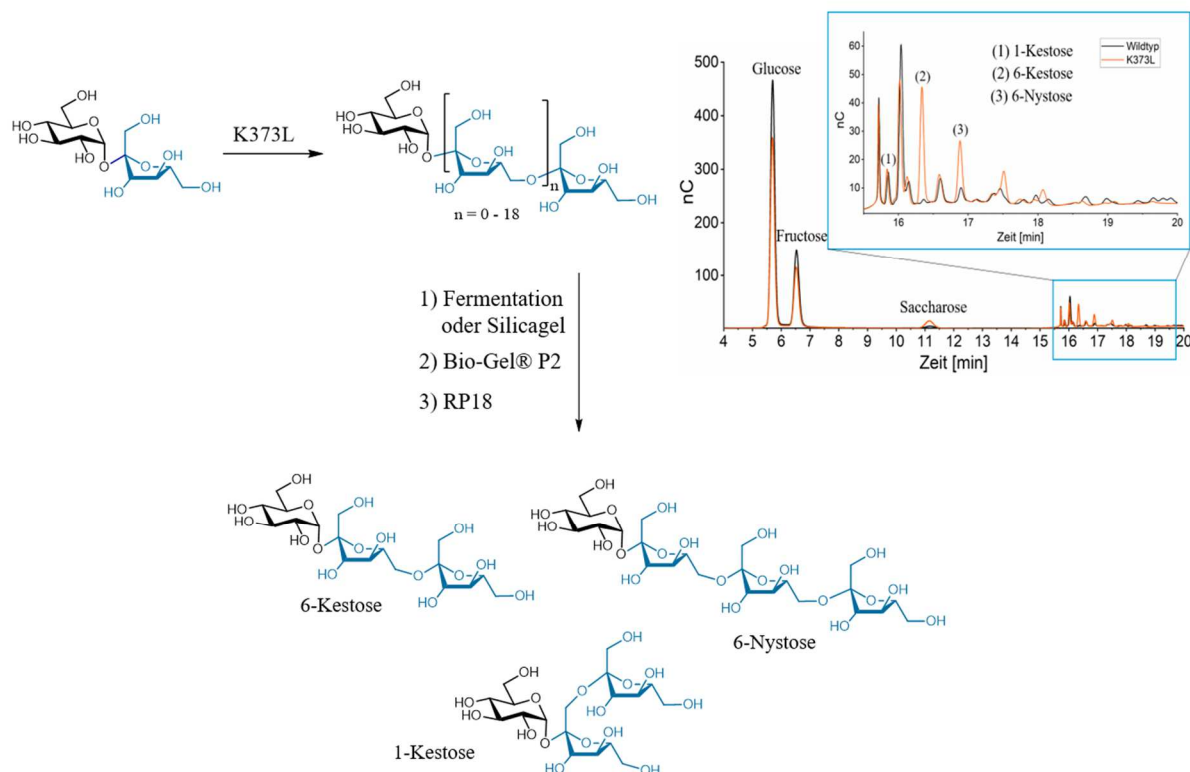
Elongationsmechanismus des Substrats konnten durch MD-Simulationen aufgeklärt werden. Das Ziel, die Produktspezifität der Levansucrase rational zu beeinflussen und in eine gezielte Richtung zu steuern, wurde damit erfolgreich umgesetzt.



Übersicht 1: Oberflächendarstellung der *Bm*-Levansucrase (PDB: 3om2) als Frontansicht mit Saccharose in der Bindungstasche. A) Auswirkung der zweistufigen Tyrosin-Modifikation auf das Produktspektrum von Varianten mit Mutationen in der dritten Zone des Enzyms (blau markierter Bereich). B) Auswirkung der Tyrosin-Modifikation auf das Produktprofil der Variante N126Y-1. C) Auswirkung der Tyrosin-Modifikation auf das Produktprofil der Variante S125Y-1. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46] (FOS=Fructooligosaccharide; HML=Hochmolekulares Levan)

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag darin, eine effiziente und einfache Methode zur Reinigung eines Fructan-Gemisches zu entwickeln, um damit den Zugang zu Oligosacchariden definierter Größen zu vereinfachen. Die Verfügbarkeit bestimmter Oligosaccharide in ausreichender Menge und Reinheit würde die Untersuchung von Fructanen auf ihre präbiotischen Eigenschaften erleichtern und zum Verständnis der Korrelation zwischen dem Darmmikrobiom und verschiedenen Krankheitsbildern beitragen.^[125] Mit Hilfe der Levansucrase-Variante K373L wurde ein Fructan-Gemisch synthetisiert, das im Vergleich zum Produktprofil des Wildtyps einen höheren Anteil kurzkettiger Oligosaccharide aufwies. In einem dreistufigen Reinigungsprozess wurde das Produktgemisch im ersten Schritt von den Monosacchariden Glucose und Fructose sowohl fermentativ durch den Hefestamm *H. polymorpha* als auch chromatographisch per Silicagel separiert. Anschließend erfolgte eine grobe Trennung der Oligosaccharide nach dem Größenausschlussprinzip mit einer Bio-Gel@P2-Säule. Im letzten Schritt wurde die Oligosaccharidfraktion, die hauptsächlich Tri- und Tetrasaccharide enthielt, schließlich

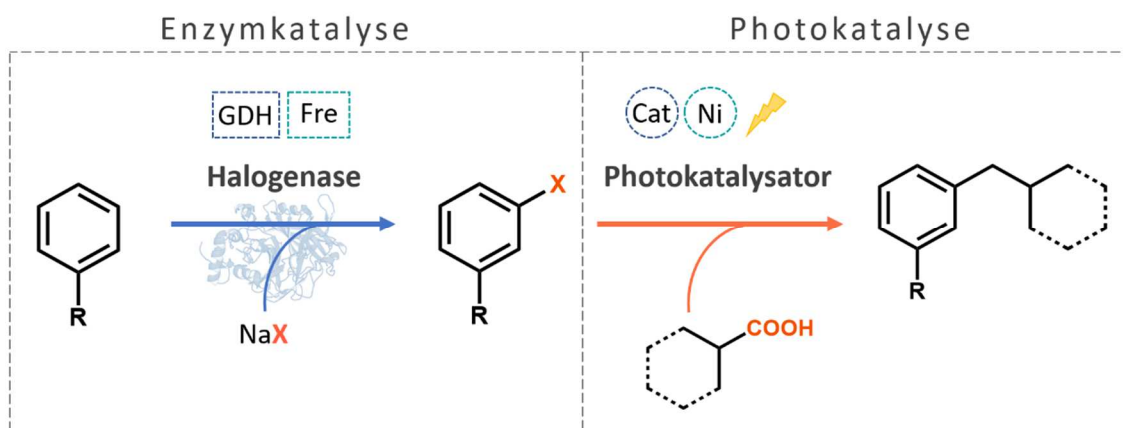
mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie (RP18-HPLC) in die gewünschten Produkte aufgetrennt. Auf diese Weise gelang es, die Oligosaccharide 1-Kestose (28 %), 6-Kestose (56 %) und 6-Nystose (20 %) in hoher Reinheit (> 95 %) und moderaten Ausbeuten zu isolieren (Übersicht 2).



Übersicht 2: Dreistufiger Reinigungsprozess des enzymatisch synthetisierten Rohprodukts der Levansucrase-Variante K373L. Das HPAEC-PAC Diagramm zeigt die Zusammensetzung des Rohprodukts, bestehend aus Mono- und Oligosacchariden. 1) Die Monosaccharide Glucose und Fructose wurden entweder fermentativ durch den Hefestamm *H. polymorpha* oder per Normalphasen-Säulenchromatographie abgetrennt. 2) Anschließend erfolgte eine Trennung der Oligosaccharide mittels Größenausschluss-Chromatographie (Bio-Gel®P2). 3) Durch Umkehrphasen-Chromatographie (RP18-HPLC) wurden schließlich die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose erhalten.

Der letzte Teil dieser Arbeit sollte die verschiedenen Disziplinen der Biokatalyse, chemischen Protein-Modifikation und Click-Reaktion mit einer neuen Komponente, der Photokatalyse, verbinden und in einem innovativen Konzept die Grundlage für die Kombination dieser Forschungsbereiche schaffen. In diesem Kontext wurde einerseits eine lineare photo-biokatalysierte Kaskaden-Reaktion entworfen und vorbereitet, während andererseits die Synthese eines clickbaren Photokatalysators durchgeführt wurde (Übersicht 3). Für den enzymatischen Teil der Kaskaden-Reaktion wurden die Halogenasen RebH und RadH mit den zugehörigen Regenerationssystemen Fre und GDH erfolgreich in *E. coli* exprimiert, gereinigt und deren Aktivität nachgewiesen. Darüber

hinaus wurde ein aktiver Alkin-funktionalisierter Photokatalysator synthetisiert, dessen Aktivität auch nach der Click-Reaktion mit einer Aminosäure und einem Peptid erhalten blieb. Damit wurden die Grundlagen geschaffen, um z. B. photoaktive Bausteine in ein Enzym einzubringen und somit neue lichtabhängige Reaktionszentren oder sogenannte Designer-Enzyme zu erzeugen.



Übersicht 3: Katalysekonzept der linearen photo-biokatalysierten Kaskaden-Reaktion. Im enzymatisch katalysierten Schritt wird eine aromatische Verbindung durch die Halogenasen RebH und RadH halogeniert. Das halogenierte Substrat wird anschließend photokatalytisch mit einer Carbonsäure-Verbindung in einer decarboxylierenden C-C-Bindungsknüpfung umgesetzt.

Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Tyrosin-spezifische Methode zur chemischen Modifikation von Proteinen am Modell der *Bm*-Levansucrase erfolgreich entwickelt. Der Werkzeugkasten für die selektive chemische Protein-Modifikation wurde damit um ein wertvolles Instrument erweitert. Die hier durchgeführten Studien zur rationalen Anpassung der Produktspezifität und die dadurch erhaltenen Erkenntnisse tragen zu einem tieferen Verständnis der mechanistischen Abläufe der Levansucrase bei.

Dieses Wissen kann zukünftig auch auf andere kohlenhydrataktive Enzyme, wie z. B. Glycosyltransferasen, übertragen werden und als Basis für die gezielte Veränderung der Produktspezifität dienen. Hierbei können MD-Simulationen als Vorhersage für mögliche Auswirkungen herangezogen werden.

Die Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der Oligo- oder Polysaccharide von Levan, Inulin, sowie weiterer Fructane, sind abhängig vom Verzweigungsgrad und Molekulargewicht der Produkte. Aus diesem Grund ist die gezielte Synthese von Oligosacchariden definierter Länge ein wichtiger Schritt, um die Verwendung der

Oligosaccharidprodukte in modernen Forschungsgebieten zu erleichtern. Dazu gehören beispielsweise die Entwicklung innovativer Biomaterialien, die sowohl in neuen *Drug-Delivery*-Systemen als auch im Bereich des *Tissue Engineering* zum Einsatz kommen. Darüber hinaus vereinfacht die rationale Modulation des Produktspektrums anschließende Reinigungsschritte, wenn definierte Produktlängen eines Oligosaccharidproduzierenden Enzyms benötigt werden.

Die Anwendung der Tyrosin-spezifischen Modifikationsmethode auf weitere Enzymklassen (wie z. B. Halogenasen) bietet auch hier die Möglichkeit die Substrat- oder Produktspezifität zu beeinflussen, indem die Zonen um das aktive Zentrum gezielt modifiziert werden, um etwa eine Vergrößerung oder Verengung der Bindungstasche zu erzielen. Des Weiteren können durch die Einführung photoaktiver funktioneller Gruppen in ein Enzym völlig neue Forschungsthemen erschlossen werden. Das aktive Zentrum oder die Oberfläche des Enzyms könnten dabei als chirale Umgebung für eine photokatalytische Reaktion dienen, sodass eine enantioselektive Photoreaktion realisiert werden kann. Die kovalente Bindung des Photokatalysators an ein Enzym oder eine größere Peptidstruktur könnte zudem interessante Auswirkungen auf dessen Löslichkeit und Aktivität in verschiedenen Lösemitteln haben und eventuell photokatalytische Reaktionen in Wasser ermöglichen.

6 Summary

Enzyme modifications occur in nature in the course of post-translational protein modifications and are fascinating mechanisms to increase the biological variety and function of proteins many times over. For a deep understanding of certain biological processes or enzymatic structure-function relationships, it is therefore essential to develop chemical methods that are able to mimic this natural diversity.^[61] Probably the greatest challenge of chemical protein conjugation is the chemo- and regioselective modification of a particular amino acid while using mild and physiological reaction conditions. Despite numerous approaches to selective protein modification, new methods are still needed, as many existing strategies are customized for a specific system.^[9, 63]

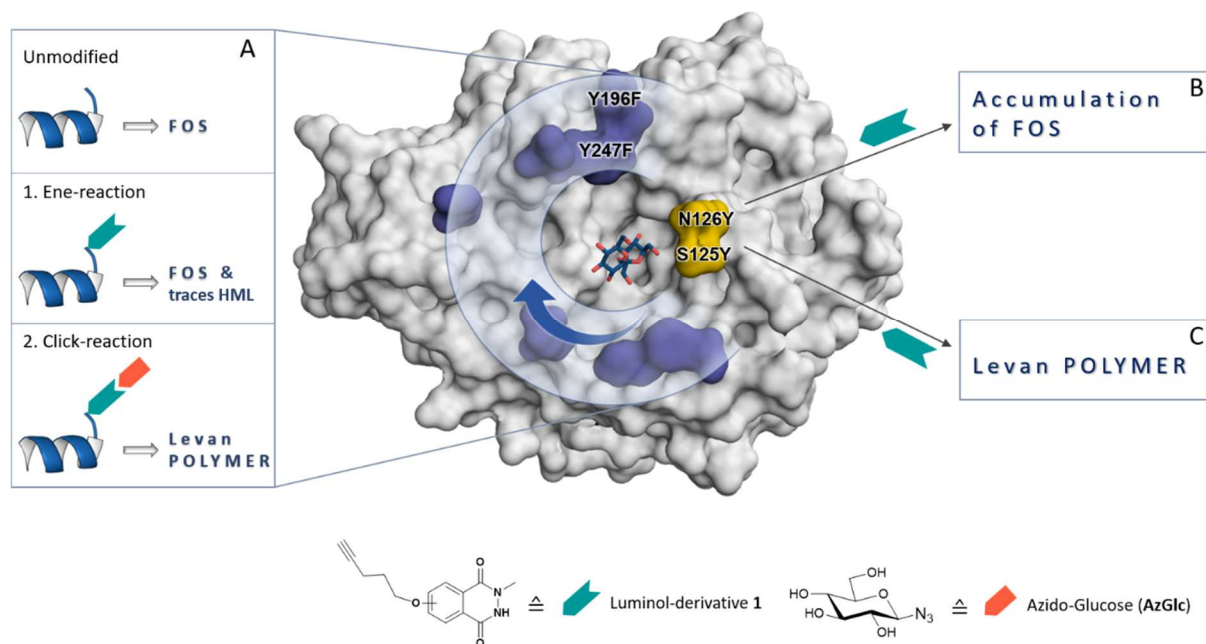
Therefore, the aim of this work was to develop a widely applicable method for selective chemical tyrosine modification using the levansucrase from *Bacillus megaterium* as a model system. By a two-step protein modification consisting of an ene-reaction in the first step and a click-reaction in the second conjugation step, the product specificity of the *Bm*-levansucrase could be rationally controlled. In the early stages, the tyrosine-specific ene-reaction with luminol compound **1** was tested and analyzed on naturally occurring tyrosine residues. Mass spectroscopic investigations showed that mainly 2 of the 25 existing tyrosine residues were modified with luminol tag **1**, including the tyrosines Y247 and Y196. In order to be able to interpret the effects of the tyrosine modification more easily and to exclude a mutual influence of the introduced side chains, the single mutant Y247F was used for further investigations. Since small changes in the product spectrum were observed after the first modification of the levansucrase variant Y247F, especially in the high molecular weight range, the second modification was carried out with the intention of intensifying this effect even further. Finally, the click reaction with azido-glucose (AzGlc) in variant Y247F-**1**-AzGlc caused a significant shift in the product distribution from small fructooligosaccharides (approx. 1100 Da) to high molecular weight levan (approx. $2,1 \cdot 10^6$ Da).

Three further positions, located in the third zone of the enzyme, were selected for genetic substitution against non-native tyrosine residues. Thus, the variants E314Y, D248Y and F445Y were obtained and then chemically modified in two steps as described before. In terms of product distribution and polymer synthesis, the modification of these variants led to comparable results to those obtained with the enzyme Y247F (overview 1, A). To analyze the influence of different side chains regarding size and polarity, four additional azido compounds were tested in the click reaction in comparison to the azidoglucose. The results of the above-mentioned investigations and the consideration of molecular dynamic simulations allowed first conclusions about the mechanistic processes of the

Bm-levansucrase and its specific manipulation. The size of the introduced side chain as well as the ability of the tag to form polar interactions play an important role in the rational modulation of the product specificity. In particular, the spatial orientation and movement of the tag and the resulting steric hindrance helped to prevent premature dissociation of the growing fructans and thus enabled the processive polymer synthesis.

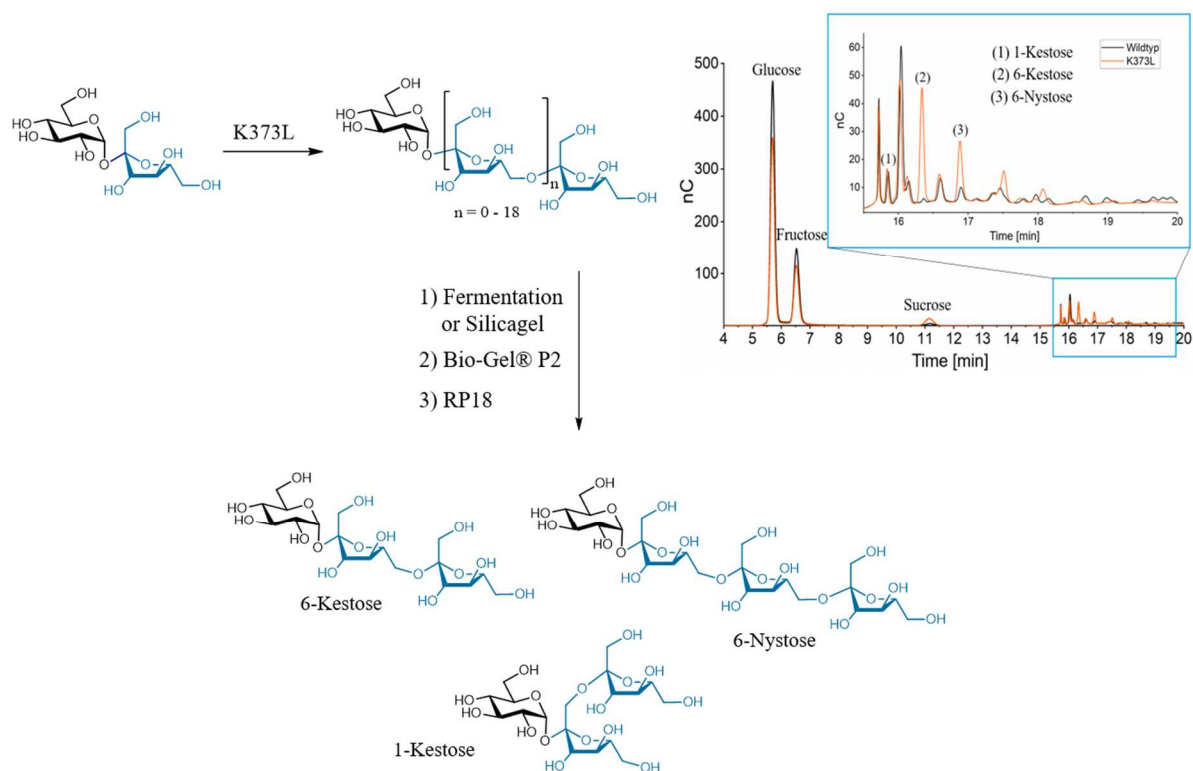
Further insights into the levan elongation mechanism were obtained by modifying the variants N126Y and S125Y. In contrast to previously investigated tyrosine residues, these positions were not located in the oligosaccharide elongation pathway and further they had a shorter distance to the active centre. In both cases, already the first modification with luminol derivative **1** led to completely different product profiles. While the variant N126Y-**1** showed a distinct accumulation (up to 800 % increase) of different oligosaccharides, the variant S125Y-**1** synthesized levan polymer already after the first modification step (overview 1, B/C). The interactions and trajectories of the introduced side chain were again analyzed with the aid of MD simulations and confirmed the previous assumptions. Due to the proximity to the substrate binding pocket, the luminol *tag* of variant S125Y-**1** was already sufficient to prevent substrate dissociation and to induce polymer synthesis. In contrast, the simulations revealed a very dynamic and fluctuating side chain for N126Y-**1**, which presumably led to the destabilization of initial interactions between the substrate and the protein surface and thus triggered the release and accumulation of short oligosaccharides.

Finally, the bioorthogonal chemical introduction of an artificial side chain made it possible to steer the product spectrum of the *Bm*-levansucrase towards both polymer synthesis and short oligosaccharides. Using the tyrosine specific ene-reaction, native and non-native tyrosine residues were selectively modified and additionally derivatized in a subsequent reaction by click-chemistry. The effects of the modification reactions on the elongation mechanism of the substrate were elucidated by MD simulations. The goal of rationally influencing the product specificity of the levansucrase and controlling the product synthesis in a specific direction was thereby successfully achieved.



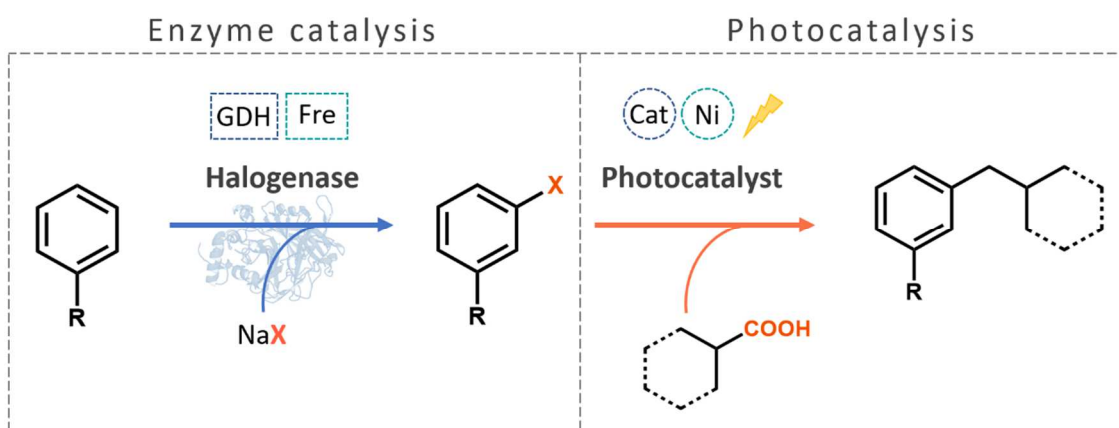
Overview 1: Surface representation of the *Bm*-levansucrase (PDB: 3om2) as front view with sucrose in the binding pocket. A) Effect of the two-step tyrosine modification on the product spectrum of variants with mutations in the third zone of the enzyme (blue marked area). B) Effect of the tyrosine modification on the product profile of variant N126Y-1. C) Effect of the tyrosine modification on the product profile of variant S125Y-1. Figure modified from Ertl *et al.*^[46] (FOS=fructooligosaccharides; HML=high molecular weight levan)

Another focus of this work was to develop an efficient and simple method for the purification of a fructan mixture in order to facilitate the access to oligosaccharides of defined sizes. The availability of certain oligosaccharide lengths in sufficient quantity and purity would improve the investigation of fructans for their prebiotic properties and contribute to the understanding of the correlation between the intestinal microbiome and various diseases.^[125] By using the levansucrase variant K373L, a fructan mixture with a higher content of certain oligosaccharides compared to the product profile of the wild type enzyme, was synthesized. In a three-step purification process, the first step was to separate the product mixture from the monosaccharides glucose and fructose both by fermentation using the yeast strain *H. polymorpha* and chromatographically by silica gel. Subsequently, the oligosaccharides were separated by size exclusion chromatography using a Bio-Gel®P2 column. In the last step, the oligosaccharide fraction, which mainly contained tri- and tetrasaccharides, was finally separated into the desired products by reversed phase column chromatography (RP18-HPLC). In this way it was successfully achieved to isolate the oligosaccharides 1-kestose (28 %), 6-kestose (56 %) and 6-nystose (20 %) in high purity (> 95 %) and moderate yields (overview 2).



Overview 2: Three-step purification process of the enzymatically synthesized raw product of the levansucrase variant K373L. The HPAEC-PAC diagram shows the composition of the raw product, consisting of mono- and oligosaccharides. 1) The monosaccharides glucose and fructose were separated either fermentatively by the yeast strain *H. polymorpha* or by normal phase column chromatography. 2) The oligosaccharides were then separated by size exclusion chromatography (Bio-Gel®P2). 3) Finally, the oligosaccharides 1-kestose, 6-kestose and 6-nystose were obtained by reversed phase chromatography (RP18-HPLC).

The last part of this work was intended to combine the different disciplines of biocatalysis, chemical protein modification and click reaction with the new component photocatalysis, and to create the basis for combining these research areas in an innovative concept. In this context a linear photo-biocatalysed cascade reaction was developed and prepared on the one side, while on the other side the synthesis of a clickable photocatalyst was performed (overview 3). For the enzymatic part of the cascade reaction the halogenases RebH and RadH with the corresponding regeneration systems Fre and GDH were successfully expressed, purified and their activity with the natural substrates was verified. In addition, an active alkyne-functionalized photocatalyst was synthesized, whose activity was retained even after the click reaction with an amino acid or peptide. This created the basis for introducing photoactive building blocks into larger structures or an enzyme and thereby generating new light-dependent reaction centres or so-called designer enzymes.



Overview 3: Catalysis concept of the linear photo-biocatalysed cascade reaction. In the enzymatic step an aromatic compound is halogenated by the halogenases RebH and RadH. The halogenated substrate will then be photocatalytically reacted with carboxylic acids as coupling partners in a C-C bond formation.

Conclusion and outlook

In this thesis, a tyrosine-specific method for the chemical modification of proteins was successfully developed by using the *Bm*-levansucrase as a model enzyme. This is a valuable technique expanding the toolbox for selective chemical protein modification. The studies in this work related to the rational tuning of the product specificity contribute to a deeper understanding of the mechanistic processes of the levansucrase.

In future, this knowledge can also be transferred to other carbohydrate-active enzymes, such as glycosyltransferases, and thus serves as a basis for the controlled modification of their product specificity. For this purpose, MD simulations could be used to predict possible effects.

The properties and possible applications of the oligo- or polysaccharides of levan, inulin and other fructans, depend on the degree of branching and molecular weight of the products. For this reason, the targeted synthesis of oligosaccharides with a defined length is an important step to facilitate the use of oligosaccharide products in modern research areas. This includes, for example, the development of innovative biomaterials that can be used in new drug-delivery-systems as well as in tissue engineering. In addition, the rational modulation of the product spectrum simplifies subsequent purification steps whenever defined product lengths of an oligosaccharide-producing enzyme are required.

The application of the tyrosine-specific modification method to other enzyme classes (such as halogenases) provides the opportunity to influence the substrate or product specificity by selectively modifying the zones around the active centre. In this way, an

extension or constriction of the binding pocket can be achieved. Furthermore, the introduction of photoactive functional groups into an enzyme can open up new research topics. The active centre or the surface of the enzyme could serve as a chiral environment for a photocatalytic reaction, so that an enantioselective photoreaction can be realized. The covalent binding of the photocatalyst to an enzyme or a larger peptide structure could also have interesting effects on its solubility and activity in different solvents and possibly enable photocatalytic reactions in water.

7 Material und Methoden

7.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav	Thermo Scientific™
Elektrophorese	Electrophoresis Power Supply-EPS 301	
FPLC System	Äktaprime plus	GE Healthcare Life Sciences
Gel-Scanning-Station	ArbusX1 Software	Biostep
HPAEC-PAD	Dionex ICS-5000+ SP	Thermo Scientific™
Inkubator	INCU-Line	VWR
	MaxQ™ 8000	Thermo Scientific™
	Incubating Orbital Shaker	VWR
Kessil A160WE	LED Licht Tuna Blue Marine	Meerwasser Hardware
Lyophile	Alpha 2-4 LDplus	Christ
Mastercycler	Mastercycler personal	Eppendorf AG
Mikroplatten-Leser	Sunrise™	Tecan
pH-Elektrode	FiveGo™	Mettler Toledo
Photometer	Biophotometer	Eppendorf AG
Real time PCR	Mx3005P/3000P QPCR System	Agilent Technologies, Stratagene Products
Sonotrode	Sonoplus HD 2200	Bandelin
SpeedVac	Savant DNA120	Thermo Scientific™
Spritzenpumpe	KDS 100	KD Scientific
Sterilwerkbank	SAFE2020	Thermo Scientific™
Thermomixer	Thermomixer Comfort 1.5 mL and 2 mL	Eppendorf AG
Thermoblock	Duotherm	Biometra
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA
Waagen	MC5	Sartorius
	PE 360 DeltaRange	Mettler Toledo
	AS220-4	Kern
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Refrigerated	DuPont Instruments
	Superspeed	
	Multifuge 1L-R	Heraeus
	Fresco17	Heraeus
	Galaxy Mini	VWR
Zentrifugen-Rotor	Sorvall Superspeed Angle Rotor GSA	DuPont Instruments

Microplate Rotor MP 3300	Thermo Scientific™
Thermo Scientific BioShield 600 Rotor	Thermo Scientific™
Rotor with ClickSeal™ Biocontainment Lid	Thermo Scientific™
Rotor F-45-12-11	Eppendorf AG

7.2 Material

7.2.1 Verbrauchsmaterial und Kits

Material	Typ	Hersteller
FPLC Säulen	HiTrap™ Desalting (5 mL) HiTrap™ HP (1 mL)	GE Healthcare Life Sciences
HPAEC Säule	Carbopac PA10, Carbopac PA200	Thermo Scientific™
Dünnschichtchromatographie	POLYGRAM® SIL G/UV254 ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 Merck TLC Silica gel 60 RP-18 F254S	Macherey-Nagel
Kit	Plasmid Miniprep Kit, peqGOLD Cycle-Pure Kit, peqGOLD Gel Extraction Kit, peqGOLD	Peqlab Peqlab Peqlab
Marker	Pierce™ Unstained Protein MW Marker GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific
Mikropipette	Rainin Pipette Lite LTS (2 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL) Rainin LTS E-MAN Hybrid (200 µL) Eppendorf Research (5 mL)	Mettler-Toledo Intl. Inc.
Protein Konzentrator	Vivaspin (2 mL, 15 mL)	Sartorius
Säulenchromatographie	Silica Gel (Partikelgröße 0.032-0.062 mm)	Macherey-Nagel
Steril-Filter	Syringe Filters with Acrylic Housing, Cellulose Acetate, 0.2 µm	VWR
Zentrifugenbecher	Centrifuge Bottles with Sealing Cap, PP-Copolymer, 250 mL	Nalgene

7.2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Medien sind, wenn nicht anders beschrieben, kommerziell erhältlich und wurden von *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, USA), *VWR* (Radnor, Pennsylvania), *Carbosynth* (Compton, Berkshire, England), *Alfa-Aesar* (Ward Hill, Massachusetts, USA), *Jena Bioscience* (Jena) und *Carl-Roth* (Karlsruhe) erhalten. Das Luminol-Derivat **1** wurde von Jürgen Mut synthetisiert.^[41] Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert oder für die Verwendung unter Schutzgasatmosphäre von einer SPS (*Solvent Purification System*)-Anlage von *Inert* bezogen. Reaktionen unter Schutzgas wurden mit Stickstoff (99,996 %) von *Linde* durchgeführt.

7.2.3 Enzyme

Die für Klonierungsarbeiten eingesetzten Enzyme XhoI, NcoI, T4 Polynucleotide Kinase, Proteinase K und T4-DNA Ligase wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen. Die *PfuTurbo* DNA Polymerase wurde von Agilent, die *AccuPOL* DNA Polymerase von VWR und die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase von Thermo Fisher Scientific erhalten.

7.2.4 Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Genotyp	Verwendung	Quelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F-</i> <i>ompT gal dcm lon hsdSB (rB-,mB-)</i> <i>λ</i> (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Expressionsstamm	BioLabs Inc.
<i>E. coli</i> One Shot™ TOP10	<i>F-</i> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139</i> <i>Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR)</i> <i>endA1 nupG</i>	Klonierungsstamm	Invitrogen
<i>E. coli</i> ATTC® 25922™		Gen Amplifizierung	ATCC

7.2.5 Verwendete Plasmide

Plasmid	Promoter	Induktor	Resistenz	Quelle
pETM11	T7/lac	IPTG	Kanamycin	EMBL
pGro7	araB	L-Arabinose	Chloramphenicol	Takara

7.2.6 Verwendete Oligonukleotide/Primer

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma *Sigma-Aldrich* bezogen und für die ortsgerichtete Mutagenese von Enzym-Varianten verwendet. Schnittstellen und Mutationen sind hervorgehoben und unterstrichen. Die Enzym-Modifikationen wurden entweder durch die QuikChange® oder Round-the-Horn Methode eingeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5`- 3`) Primer <i>forward</i> /Primer <i>reverse</i>
Primer für die ortsgerichtete Mutagenese mittels QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit oder Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	
Y196F	GGATTATTCAGGTAACAAT <u>TTC</u> GGAAAAACAAACGTTAACGAC/ TCGTTAACGTTTGT'TTTCC <u>GA</u> ATTGTTTACCTGAATAATCCG
Y247F	ATGAAGGCGGT <u>TTC</u> GACACAGGGGATAAC/ GTTATCCCCTGTGTC <u>GAA</u> ACCGCCTTCATC
Y196F/Y247F	Primer von Y196F and Y247F
Y196F/Y247F/E314Y	GCTTCTTGAAGGATCTAATAAA <u>TAC</u> AAAGCTTCTTTAGCAAACGGGGC/ CCCCGTTTGCTAAAGAAGCTTT <u>GT</u> ATTATTAGATCCTTCAAGAAGC
Y196F/Y247F/F445Y	<i>Forward</i> Primer von Y196F, Y247F and F445Y: CATGACAAATAGAGGCT <u>TAC</u> TATGAAGACAACCACTATAC
Y446F	CATGACAAATAGAGGCTTT <u>TTC</u> GAAAGACAACCACTCTAC/ GTAGAGTGGTTGTCTTC <u>GAA</u> AAAAGCCTCTATTTGTCATG
Y446F/Y247F/Y196F	Primer von Y446F
N126Y/Y196F/Y247F	GGTGATCCAAAAGATTTCG <u>TAC</u> GACACGTCTGTTTATCTTTTC/ GAAAAGATAAACAGACGTGTC <u>GTA</u> CGAATCTTTTGGATCACC
S125Y/Y196F/Y247F/K373A	CACCGATTCTCGCGGATCT <u>GCA</u> ATGACGATTGATGGAATC/ GATTCCATCAATCGTCAT <u>TGC</u> AGATCCGCGAGAATCGGTG
S125Y/Y196F/Y247F/K373R	CACCGATTCTCGCGGATCTAG <u>A</u> ATGACGATTGATGGAATC/ GATTCCATCAATCGTCAT <u>TCT</u> AGATCCGCGAGAATCGGTG
S125Y/Y196F/Y247A	GTTTATTGATGAAGGCGGT <u>GCT</u> GACACAGGGGATAACC/ GGTTATCCCCTGTGTC <u>AGC</u> ACCGCCTTCATCAATAAAC
Primer für die ortsgerichtete Mutagenese mittels „Round-The-Horn“	
Q381Y/N126Y/Y247F/Y196F	<u>TAC</u> GATGATGTGTATGCTAGGCTATG/ TCCGATTCCATCAATCGTCATTTTAG

E314Y/N126Y/Y247F/Y196F	<u>TAC</u> AAAGCTTCTTTAGCAAACG/ TTTATTAGATCCTTCAAGAAGC
Y196F/Y247F/D248Y	<u>TAC</u> ACAGGGGATAACCATACGCTAAG/ GAAACCGCCTTCATCAATAAACTGC
S125Y/Y196F/Y247F	<u>TAC</u> AATGACACGTCTGTTTTATCTTTTCTATAAAAAAGCTGG/ ATCTTTTGGATCACCTGCTAGGGCAAACACAATTTG

7.2.7 Kulturmedien

LB - Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	1000 mL

2xYT - Medium

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	1000 mL

TB - Medium

(Die Zugabe des 10 x TB-Puffers erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums)

Trypton	20 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 mL
ddH ₂ O	900 mL
10 x TB-Puffer	100 mL

10 x TB-Puffer

KH ₂ PO ₄ (1 M)	23,1 g
K ₂ HPO ₄ (1 M)	125,4 g
ddH ₂ O	1000 mL

YM - Medium

Pepton aus Soja	5 g
Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Glucose	10 g
ddH ₂ O	1000 mL

LB-Agar

(Die Zugabe der Antibiotika Lösungen erfolgte nach dem Autoklavieren des LB-Agar)

Agar	15 g
LB-Flüssigmedium	1000 mL
Antibiotika-Lösung	30 - 100 µg/ml

YM-Agar

Agar	15 g
YM-Flüssigmedium	1000 mL

Alle Kulturmedien wurden bei 120 °C für 30 min im Autoklaven sterilisiert. Thermolabile Zusatzstoffe, wie z. B. Antibiotika, wurden steril filtriert und erst nach der Hitze-sterilisation der Nährmedien zugegeben.

7.2.8 Puffer und Lösungen

Stammlösungen

Substanz	Konzentration	Endkonzentration in Nährmedium
Ampicillin	100 mg/mL	100 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL	50 µg/mL
Chloramphenicol	30 mg/mL	30 µg/mL
IPTG	0,5 M	Siehe Sektion 7.4.3

Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Tfbl-Puffer

Kaliumacetat	30 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH 5,8	mit Essigsäure

TfbII-Puffer

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH 6,5	mit HCl und NaOH

Puffer für Agarose-Gelelektrophorese**50x TAE-Puffer**(vor Gebrauch auf 1x TAE
verdünnen)

Tris-HCl	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM
ddH ₂ O	1000 mL

Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese**6x SDS Puffer**

Tris-HCl pH 8	350 mM
DTT	600 mM
Glycerol	30 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,12 % (w/v)

10x Elektrophorese-Puffer

Tris	1 M
HEPES	1 M
SDS	35 mM
ddH ₂ O	1000 mL

Coomassie-Färbelösung

Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure (99,8 %)	10 % (v/v)
ddH ₂ O	60 % (v/v)
Coomassie-Brilliantblau R-250	1 g/l

Coomassie-Entfärbelösung

Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure (99,8 %)	10 % (v/v)
ddH ₂ O	60 % (v/v)

Tris-Puffer 1

Tris HCl	1 M
pH 6,8	mit HCl und NaOH

Tris-Puffer 2

Tris HCl	1,5 M
pH 8,8	mit HCl und NaOH

Puffer für die Proteinaufreinigung per Affinitätschromatographie

Lysis-Puffer	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,45 g (25 mM)
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	4,44 g (25 mM)
	NaCl	17,5 g (300 mM)
	Imidazol	1,72 g (20 mM)
	pH 8	mit HCl und NaOH
	ddH ₂ O	1000 mL

Elutions-Puffer	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,45 g (25 mM)
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	4,44 g (25 mM)
	NaCl	17,5 g (300 mM)
	Imidazol	17 g (250 mM)
	pH 8	mit HCl und NaOH
	ddH ₂ O	1000 mL

Stripping-Puffer	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	2,22 g (20 mM)
	NaCl	7,3 g (500 mM)
	EDTA	3,65 g (50 mM)
	pH 7,4	mit HCl und NaOH
	ddH ₂ O	250 mL

Puffer zur Isolierung genomischer DNA

TE-Puffer	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8	mit HCl und NaOH
	ddH ₂ O	250 mL

7.3 Molekularbiologische Methoden

7.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung der genomischen DNA aus *E. coli* ATTC® 25922™ wurde eine 5 mL Vorkultur in LB-Medium bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Zellkultur wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 500 µL TE Puffer resuspendiert. Es wurden 12 µL einer SDS-Lösung (25 %) und 3 µL der Proteinase K (20 mg/mL) zugegeben und 1 h bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Eine 500 µL Lösung aus Phenol/Chloroform (1:1) wurde zugegeben und das Eppendorf-Tube vorsichtig invertiert bis keine Phasentrennung mehr erkennbar war. Die Mischung wurde für 10 min bei

12000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Tube überführt und erneut mit 500 µL Phenol/Chloroform (1:1) gewaschen und abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die wässrige Phase mit 50 µL Natriumacetat versetzt und die darin enthaltene DNA mit 330 µL Isopropanol ausgefällt. Der DNA-Niederschlag wurde 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 290 µL TE Puffer und 10 µL RNase (10 mg/mL) resuspendiert und anschließend mit 30 µL Natriumacetat versetzt. Die DNA wurde erneut mit 900 µL Ethanol gefällt und zur vollständigen Fällung über Nacht bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Mischung für 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet nach Trocknung (Eppendorf mit offenem Deckel stehen lassen) mit 100 µL TE Puffer resuspendiert.

7.3.2 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kit I nach der Herstellervorschrift extrahiert und aufgereinigt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch, durch Messung der Extinktion bei 260 nm, bestimmt. Für die Langzeitlagerung wurden Plasmide bei -20 °C aufbewahrt.

7.3.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde mit der Firma Eurofins (Luxemburg) durchgeführt. Dafür wurden in einem Eppendorf-Tube DNA-Proben mit einem Volumen von 20 µL und einer Konzentration von 50-70 ng/µL vorbereitet.

7.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese wird die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten ermöglicht. Zunächst wurde ein Agarosegel aus 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer und 0,005 % Gel-Red hergestellt und in dafür vorgesehene Kammern gegossen. Die DNA-Proben wurden mit dem 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific) versetzt und in das Gel aufgetragen. Durch das Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes (100 V) wurden die DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe und Konformation getrennt, wobei kleinere Moleküle schneller durch die Agarose-Matrix laufen. Als DNA-Marker wurde der GeneRuler 1kb DNA Ladder verwendet. Die DNA-Banden im Agarose-Gel wurden mit UV Licht sichtbar gemacht und zur Isolation mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus den Gelbanden erfolgte mit Hilfe des Gel Extraktion Kit (peqGOLD) nach Herstellervorschrift.

7.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde für die gezielte Amplifizierung von DNA-Sequenzen aus genomischer DNA verwendet oder für die Umklonierung von DNA-Abschnitten in andere Vektoren. Der PCR-Prozess wird in einem Thermocycler durchgeführt und kann 20-50 Zyklen enthalten. Dabei wird im ersten Schritt die doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen (92-98 °C) denaturiert, um die Stränge zu trennen. Durch das *Primer Annealing* lagern sich die Primer spezifisch an die DNA an, welche dann in der *Elongation* von der DNA-Polymerase vervielfältigt werden kann. Die Verdopplung der DNA-Stränge nach jedem Zyklus führt somit zu einer exponentiellen Amplifikation des Zielgens. Für die *Elongation* wurde entweder die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase oder die AccuPOL DNA Polymerase eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese auf erfolgte Amplifikation überprüft und die DNA-Fragmente sofort mit Hilfe des Gel Extraction Kits isoliert. Die Reaktionsansätze mit dazugehörigen PCR-Programmen werden nachfolgend aufgeführt.

Umklonierung *Bacillus subtilis* Levansucrase

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x Ammonium Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1 µL	0,2 µM
10 mM dNTP-Mix	1 µL	0,2 mM
Templat DNA	2 µL	0,01 ng/µL
AccuPOL DNA-Polymerase	1 µL	2,5 Units
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
2. Denaturierung	95 °C	30 sec
3. Annealing	T _m Primer – 3 °C	30 sec
4. Elongation	72 °C	3 min
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (30x)		
5. Finale Elongation	72 °C	5 min
6. Halten	10 °C	∞

Amplifizierung der *Flavin-Reduktase (Fre)* aus *E. coli* ATTC® 25922™

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
5x Phusion HF Puffer	4 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1 µL	0,5 µM
10 mM dNTP-Mix	0,4 µL	0,2 mM
Templat DNA	1 µL	1 µg
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,2 µL	0,4 Units
ddH ₂ O	auf 20 µL	-

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec
2. Denaturierung	98 °C	10 sec
3. Annealing	60 °C	30 sec
4. Elongation	72 °C	25 sec
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (30x)		
5. Finale Elongation	72 °C	5 min
6. Halten	10 °C	∞

7.3.6 QuikChange® - Ortsgerichtete Mutagenese

Gezielte Punktmutationen einer Gensequenz wurden mit Hilfe der QuikChange® Methode durchgeführt. Für die ortsgerechte Mutagenese (Modifikation, Insertion, Deletion) werden zwei komplementäre Primer benötigt, die beide die gewünschte Modifikation enthalten und entgegengesetzt amplifiziert werden.

Ortsgerichtete Mutagenese von *Bacillus megaterium* Levansucrase

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x Reaktions-Puffer	2,5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1 µL	63 ng
10 mM dNTP-Mix	0,5 µL	0,2 mM
Templat DNA	1 µL	25 ng
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase	0,5 µL	1,25 Units
ddH ₂ O	auf 25 µL	-

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	30 sec
2. Denaturierung	95 °C	30 sec
3. Annealing	T _m Primer - 3 °C	1 min
4. Elongation	68 °C	3 min
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (18x)		
5. Finale Elongation	68 °C	5 min
6. Halten	10 °C	∞

Das Amplifikations-Produkt wurde anschließend mit 1 µL (10 U/µL) des *Dpn* I Restriktionsenzym versetzt und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dadurch wird die methylierte Templat-DNA verdaut. Die Transformation des verdauten PCR-Ansatzes erfolgte mit chemisch kompetenten *E. coli* XL10-GOLD Zellen. Nach Isolierung der mutierten Plasmide wurde zur Kontrolle eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

7.3.7 „Round-the-horn“ - Ortsgerichtete Mutagenese

Durch die „Round-the-horn“ Methode können sowohl Punktmutationen als auch mehrfache DNA-Modifikationen gleichzeitig durchgeführt werden. Dafür werden zwei komplementäre Primer benötigt, von denen ein Primer die gewünschte Modifikation enthält. Zunächst werden diese Primer phosphoryliert, sodass sie bei der späteren Ligation zu einem geschlossenen Plasmid verbunden werden können.

Phosphorylierung der Primer

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x Kinase-Reaktions-Puffer	2 µL	4x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1 µL	5 µM
10 mM ATP	2 µL	1 mM
T4-Polynukleotid-Kinase	1 µL	10 Units
ddH ₂ O	auf 20 µL	-

Der Phosphorylierungs-Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend bei 75 °C für 10 min durch Denaturierung der Kinase gestoppt. Zur Amplifikation der Templat-DNA mit den phosphorylierten Primern wird eine PCR-Reaktion durchgeführt.

PCR-Ansatz für Round-the-horn Methode

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x Reaktions-Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 2 µL	0,2 µM
10 mM dNTP-Mix	2 µL	0,4 mM
Templat DNA	1 µL	25 ng
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase	1 µL	2,5 Units
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	1 min
3. Annealing	T _m Primer – 3 °C	30 sec
4. Elongation	72 °C	6,4 min
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (25x)		
5. Finale Elongation	72 °C	5 min
6. Halten	10 °C	∞

Die PCR-Reaktion wurde anschließend mit 1 µL (10 U/µL) des *Dpn* I Restriktionsenzym versetzt und für 60 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um die methylierte Templat-DNA zu verdauen. Das PCR-Produkt wurde durch eine präparative Agarose-

Gelelektrophorese aufgereinigt und mit Hilfe des Gel Extraction Kits isoliert. Für die Ligation der linearen DNA-Stränge wurden 8 μL der PCR-DNA mit 1 μL der T4-Ligase (5 U/ μL) und 1 μL 10x T4 DNA-Ligase Puffer bei 20 °C für 30 min inkubiert. Zuletzt erfolgte die Transformation mit 50 μL kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen und dem kompletten Ligations-Ansatz.

7.3.8 Restriktionsverdau mit Restriktionsenzymen

Für Klonierungen wurde der Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt, um eine sequenzspezifische Hydrolyse von DNA-Fragmenten zu erhalten. Die dadurch erzeugten *sticky ends* führen in der darauffolgenden Ligation zu höheren Ausbeuten. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme *XhoI* und *NcoI* eingesetzt und mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern und Vorgaben verwendet. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C über Nacht und wurde dann durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und die DNA-Fragmente mit Hilfe des Gel Extraction Kits isoliert.

7.3.9 Ligation von DNA Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Sequenzen (Vektor, Insert) enzymkatalysiert an ihren Enden verknüpft. Hierfür kam die T4-DNA Ligase zum Einsatz, welche eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe eines DNA-Moleküls mit der 5'-Phosphatgruppe eines anderen DNA-Fragments bildet. Bei einem Gesamtvolumen von 10 μL wurden das Insert und der Vektor mit der entsprechenden Menge ddH₂O verdünnt und mit 1 μL T4-Ligase und 1 μL 10x T4 DNA-Ligase Puffer versetzt. Mögliche Nebenreaktionen, wie z. B. die Bildung von Vektor-Dimeren oder die Re-Ligation des Vektors, wurden durch einen dreifachen Überschuss des Inserts verhindert. Die Ligations-Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und direkt im Anschluss in kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen transformiert, wobei der gesamte Ligations-Ansatz eingesetzt wurde. Zur Kontrolle der Ligations-Produkte, wurde die DNA isoliert und eine Sequenzierung durchgeführt.

7.4 Mikrobiologische Methoden

7.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (BL21(DE3), TOP10) erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode. Dadurch wird die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht und somit die Aufnahme von Fremd-DNA verbessert. Dazu wurden 100 mL

LB-Medium mit 250 μL einer Übernachtskultur der entsprechenden *E. coli* Zellen beimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte OD_{600} von 0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C; 10 min; 4000 rpm) und das Zell-Pellet in 40 mL eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert und in 5 mL TfbII-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 0 °C wurde die Zellsuspension aliquotiert (je 50 μL) und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

7.4.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Hitzeschock-Methode angewendet. Die chemisch kompetenten Zellen (50 μL) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit 1 μL Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden die Zellen für 90 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort für 2 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde für die Zellregeneration 500 μL LB-Medium zugegeben und im Thermomixer für 60 min bei 37 °C und 500 rpm geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden schließlich auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

7.4.3 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die heterologe Proteinexpression wurden DNA-Plasmide in die entsprechenden Expressionsstämme durch die Hitzeschock-Methode eingebracht und die transformierten Zellen auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen. Eine Einzelkolonie der erfolgreichen Transformation wurde schließlich verwendet, um eine Übernachtskultur mit 5 mL LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, anzupflanzen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 180 rpm wurden 250 mL der Hauptkultur mit 2,5 mL der Übernachtskultur inokuliert. Die Zellen der Hauptkultur wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert und nach Abkühlen auf die Expressionstemperatur mit IPTG oder L-Arabinose induziert. Die Zellkulturen wurden nach der Induktion bei der vorgesehenen Temperatur und 180 rpm über Nacht inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall RC-5B Refrigerated) für 10 min und bei 4 °C. Das Zell-Pellet wurde in 8 mL Lysis-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen. Die resultierenden Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 30 min und 4 °C vom Extrakt getrennt.

Tabelle 5: Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit erfolgreich exprimierten Proteine in *E. coli*.

Konstrukt	Expressionsstamm	Expressions-temperatur	Expressions-medium	Induktor
pETM11_Levansucrase ^a	BL21(DE3)	18 °C	LB-Medium	0,5 mM IPTG
pETM11_RebH+pGro7 ^b	BL21(DE3)	30 °C	TB-Medium	0,1 mM IPTG, 2 mg/mL Arabinose
pETM11_RadH	BL21(DE3)	18 °C	2xYT-Medium	0,1 mM IPTG
pETM11_Fre	BL21(DE3)	18 °C	LB-Medium	0,1 mM IPTG
pETM11_GDH	BL21(DE3)	18 °C	LB-Medium	0,1 mM IPTG

^a alle Levansucrase-Varianten und -Mutanten wurden nach dieser Methode exprimiert

^b Co-Transformation in BL21(DE3)

7.4.4 Kultivierung von *Hansenula polymorpha*

Die Hefeart *Hansenula polymorpha* wurde vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen und wurde als getrocknetes Pellet in einer Glasampulle erhalten. Die Hefe-Zellen wurden zunächst mit 500 µL Wasser versetzt und 30 min zum Quellen stehen gelassen. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit YM-Medium dünn ausgestrichen und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien dienten schließlich zum Animpfen von 5 mL Vorkulturen mit YM-Medium. Zur Langzeitlagerung wurden aus den Vorkulturen Glystocks hergestellt. Dafür wurden 300 µL Glycerin zu 700 µL der Vorkultur in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gegeben, gut durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glystocks wurden bei -80 °C gelagert. Vorkulturen zur Inokulation von Hauptkulturen wurden mit den Glystocks angesetzt. Für die Hauptkultur wurden 250 mL YM-Medium mit 2 mL einer Vorkultur beimpft und 24 h bei 25 °C und 140 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und die Hefezellen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.4.5 Immobilisierung von *Hansenula polymorpha*

Zur Herstellung immobilisierter Hefe-Zellen wurde zuerst eine Alginat-Lösung aus 1,56 g Natriumalginat in 100 mL Wasser vorbereitet und auf 70 °C erhitzt bis eine zähflüssige Lösung entstand. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 12,5 g (Feuchtgewicht) der frisch geernteten Hefe zugegeben und gerührt bis eine homogene Suspension erhalten wurde. Die Alginat-Hefe-Suspension wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe in 500 mL einer Calciumchlorid-Lösung (150 mM) zugetropft, welche langsam mit einem Rührfisch gerührt wurde. Dabei haben sich kleine immobilisierte Alginat-Hefekügelchen

ausgebildet, die für mindestens 1 h in der Calciumchlorid-Lösung ausgehärtet und anschließend abgesiebt wurden.

7.5 Biochemische Methoden

7.5.1 Proteinaufreinigung

Zur Aufreinigung der verwendeten Enzyme wurde eine His₆-Tag Affinitätschromatographie durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss wurden die gereinigten Zellextrakte auf eine 1 mL HisTrap FF-Säule (GE Healthcare Life Sciences) mit einer Spritzenpumpe aufgetragen und an ein Äktaprime plus FPLC System angeschlossen. Die Beladung der Säulenmatrix mit dem aufzureinigenden Enzym basiert auf der Affinität des His₆-Tag zu Ni²⁺-Ionen. Unspezifisch bindende Proteine können somit einfach mit dem Lysis-Puffer von der Säule gespült werden. Durch die erhöhte Konzentration von Imidazol im Elutions-Puffer kann schließlich das erwünschte Enzym durch einen linearen Gradienten eluiert werden, da Imidazol die Histidin-Reste des Enzyms kompetitiv verdrängt. Reine Enzymfraktionen der Levansucrase-Varianten wurden kombiniert, konzentriert und gegen einen 20 mM Tris-Puffer pH 7,5 ausgetauscht. Der im pETM11-Vektor enthaltene N-terminale Histidin-Tag kann durch die TEV-Protease abgespalten werden. Dazu wurde ein Verhältnis von 1:100 TEV/Enzym gewählt und für 24 h bei 300 rpm und 20 °C geschüttelt. Die Enzyme wurden vom abgespaltenen Peptid und der TEV-Protease mittels Größenausschluss-Chromatographie über eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule (GE Healthcare Life Sciences) getrennt. Im Falle der Halogenasen, Fre und GDH wurde der N-terminale Histidin-Tag nicht abgespalten und die reinen Fraktionen konzentriert und gegen den entsprechenden Puffer ohne Imidazol ausgetauscht. Die Konzentrationen der gereinigten Proteine wurden mit dem jeweiligen Extinktionskoeffizienten und einer Weglänge von 1 cm bei 280 nm bestimmt. Alle aufgereinigten Enzymlösungen wurden zu je 150-300 µL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der exprimierten und aufgereinigten Enzyme wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Methode ermöglicht eine Trennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht und dient zusätzlich zur qualitativen Analyse der Reinheit eines Proteins. Für die Gelelektrophorese wurde zwischen zwei Glasplatten ein 12 %-iges Trenngel (1,6 mL dH₂O; 2,0 mL Acrylamidlösung; 1,3 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 50 µL 10% w/v SDS, 50 µL 10% Ammoniumperoxidsulfat; 2 µL TEMED) gegossen

und bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol mit einem Filterpapier entfernt und über das Trenngel ein Sammelgel (1,4 ml dH₂O; 330 µL 30% Acrylamidlösung; 250 µL 1 M Tris-HCl pH 6,8; 20 µL 10 % w/v SDS; 20 µL 10 % Ammoniumperoxidsulfat; 2 µL TEMED) gegossen, welches mit Hilfe eines eingesetzten Probenkamms zur Probenauftragung und Fokussierung der Proteinbanden diente. Im Zuge der Probenvorbereitung wurden 15 µL der Probe (aufgereinigte Enzyme: ca. 10 µg) mit 5 µL 6x SDS Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Molekulargewichtstandard wurde der Pierce™ Unstained Protein MW Marker verwendet. Das Gel wurde schließlich in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit dem 1x Elektrophorese-Puffer bedeckt. Für die Elektrophorese wurde eine konstante elektrische Spannung von 150 V bei einer Stromstärke von 40 mA angelegt. Nach 1 h wurde die Elektrophorese gestoppt, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mit einer Coomassie-Färbelösung für mindestens 2 h gefärbt. Mit der Entfärbelösung wurde das Gel bis zum gewünschten Grad entfärbt und schließlich in dH₂O gelagert.

7.5.3 Aktivitätstest und Bestimmung kinetischer Parameter

Aktivitätstest und kinetische Parameter für Levansucrase Enzyme

Die Aktivität der Levansucrase wurde mit Hilfe der DNS-Methode^[147] (3,5-Dinitrosalicylsäure) bestimmt. Hierbei wird die Freisetzung von reduzierenden Zuckern über einen Zeitraum von 12 min verfolgt und somit die Aktivität des Enzyms indirekt nachgewiesen. Die Reaktionen für Aktivitätsassays enthielten das zu untersuchende Enzym mit 0,5 M Saccharose in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9. Reaktionen zur Bestimmung der katalytischen Parameter wurden mit gereinigtem Enzym in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 und unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen von 5 bis 600 mM durchgeführt. Die Konstanten K_M und k_{cat} wurden durch Fitting der verarbeiteten Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung unter Verwendung nichtlinearer Kurven in OriginPro (OriginLab) erhalten.

Aktivitätstest für Halogenasen und Cofaktor-Enzyme

Für die Aktivitätsbestimmung der Halogenasen RebH und RadH wurden 15 µM des gereinigten Enzyms mit Fre (4 µM), FAD (1 µM), NADH (100 µM), GDH (10 µM), Glucose (20 mM), MgCl₂ (10 mM) und dem zugehörigen Substrat (0,5 mM; RebH: Tryptophan; RadH: 6-Hydroxyisoquinoline) in 25 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) für 2 h bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Denaturierung der Enzyme bei 95 °C für 5 min gestoppt. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt und die Reaktionslösung mittels LC-MS analysiert.

7.5.4 Bestimmung des optimalen pH-Wertes für Levansucrase-Enzyme

Reaktionen zur Bestimmung von pH-abhängigen Aktivitätsprofilen enthielten 1 U mL⁻¹ Enzym und 0,5 M Saccharose in 50 mM Acetat oder Sørensen-Puffer. Der Bereich der unterschiedlichen Pufferlösungen lag zwischen pH 5-8 mit einem Anstieg von 0,5 pH-Einheiten. Acetatpuffer wurde für Reaktionen bei pH 5,0 und 5,5 eingesetzt. Für die restlichen pH-Werte wurde der Sørensen-Puffer verwendet. Die globalen Aktivitäten wurden aus der Freisetzung von reduzierenden Zuckern unter Verwendung der DNS-Methode (3,5-Dinitro-Salicylsäure-Methode) berechnet.

7.5.5 Tyrosin-spezifische Modifikations-Reaktion

Modifikations-Reaktionen wurden mit 10 µM gereinigtem Enzym, 1 mM H₂O₂, 10 µM Hemin und 1 mM Luminol-Derivat **1** in 0,1 M Phosphatpuffer durchgeführt. Eine wässrige Lösung von H₂O₂ wurde vor jeder Verwendung frisch hergestellt. Luminol-Derivat **1** und Hemin wurden zuvor in 100 bzw. 15 % DMSO (w/v) in dH₂O gelöst. Die Reaktion wurde für 22 h bei 20 °C und 350 rpm im Thermomixer geschüttelt. Für die Blindproben wurden dieselben Bedingungen verwendet, jedoch ohne die Zugabe des Luminol-Derivats. Die Tyrosin-Modifikations-Reaktionen wurden durch einen Pufferaustausch gegen 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit einer 5 mL HiTrap Entsalzungssäule (GE Healthcare Life Sciences) aufgereinigt. Reine Enzymfraktionen wurden vereinigt und für weitere Anwendungen konzentriert.

7.5.6 Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditions-Reaktion (CuAAC)

Für die Kupfer-katalysierten Click-Reaktionen wurden 10 µM Protein mit 100 µM CuSO₄, 0,5 mM THPTA und 50 µM des Azids in 0,1 M Phosphatpuffer inkubiert. Das CuSO₄ und THPTA wurden vor der Zugabe zur Lösung vorgemischt. Der Reaktionsstart wurde mit 5 mM Natriumascorbat eingeleitet. Die Reaktionen der Blindproben verliefen unter denselben Bedingungen, jedoch ohne die Zugabe des Azids. Nach 3 h wurde die Click-Reaktion durch Zugabe von 1 mM EDTA gestoppt und sofort über einen Pufferaustausch gegen 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,5 gereinigt.

7.5.7 Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Differential Scanning Fluorimetry ist eine Methode zur Messung der Thermostabilität eines Proteins. Durch die Zugabe eines Bindungspartners, z. B. Substrat oder Ligand, und die schrittweise Erhöhung der Temperatur kann die Änderung der Thermostabilität der Proteinfaltung verfolgt werden. Dies lässt Rückschlüsse auf Protein-Substrat-Interaktionen zu und dient der indirekten Bestimmung von Bindungskonstanten. Für die

Messungen wurden 150 μL Proben mit einer Endkonzentration von 2 μM Protein (Monomere von Y247F-**1** oder Y247F-**1**-1AzGlc), 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 und 5 \times Sypro Orange (Thermo Fisher, Deutschland) hergestellt. Die Proben wurden danach mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Substrats Levan versetzt, sodass Endkonzentrationen von 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 15,0; 22,0; 35,0 bis 50,0 mM Levan erreicht wurden. Der durchschnittliche Polymerisationsgrad von Levan betrug 9. Kontrollexperimente ohne Protein wurden ebenfalls durchgeführt. Aliquote von 25 μL jeder Probe wurden 4 Mal auf eine 96-Well-Platte aufgetragen, die anschließend mit einer transparenten Klebefolie versiegelt und für 1 Minute bei 500 \times g zentrifugiert wurde. Die Well-Platte wurde in ein HT/7900-Fast-Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems, Deutschland) gegeben, und Änderungen der Fluoreszenz über einen Temperaturbereich wurden unter Verwendung des ROX-Filters und des folgenden Programms aufgezeichnet. Fluoreszenzdaten wurden in OriginPro verarbeitet, um die Schmelztemperatur bei jeder Levan-Konzentration durch Anpassen der Daten an die Boltzmann-Funktion zu erhalten. Die Schmelztemperaturwerte von zwei unabhängigen Messungen mit jeweils vier Wiederholungen wurden verwendet, um die Dissoziationskonstante K_d zu berechnen. Dafür wurde die GraphPad Prism-Software zu Hilfe genommen.^[122]

7.6 Bioinformatische Methoden

Die bioinformatischen Methoden wurden von *Thien Anh Le* unter der Leitung von *Prof. Bernd Engels* am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie durchgeführt. Molekulardynamische Simulationen wurden zur Analyse von Wechselwirkungen und Trajektorien zwischen dem kovalent gebundenen Luminol-Derivat **1** und **1**-1AzGlc mit der Proteinoberfläche der Varianten Y247F, N126Y/Y247F/Y196F und S125Y/Y247F/Y196F durchgeführt. Simulationen und Berechnungen erfolgten mit dem Programmpaket AMBER14.^[148] Die PDB Datei des Levansucrase-Wildtyps wurde von der kristallisierten Variante D257A (pdb-Code 3OM2^[16]) und durch den Ersatz von Ala257 durch Asp257 erhalten. Für die kovalente Bindung von **1** und **1**-1AzGlc an die jeweilige Variante wurde das Avogadro-Programmpaket (<http://avogadro.cc/>) unter Berücksichtigung der Enzymumgebung (5 Å Radius des entsprechenden Tyrosin-Restes) angewendet.^[149] Das Substrat Saccharose wurde eingefügt, indem die Röntgenstruktur von *Bm*-Levansucrase, komplexiert mit Saccharose (pdb-Code 1PT2^[23]), mit der Wildtyp Struktur von D257A (von 3OM2) ausgerichtet wurde. Die Positionierung der 6-Kestose wurde durch die Überlagerung der Fructose-Einheit der Saccharose mit 6-Kestose umgesetzt. Das Protein wurde durch das AMBER-Kraftfeld ff14SB beschrieben, während für **1**, **1**-1AzGlc das generalisierte AMBER-Kraftfeld (GAFF) und für 6-Kestose das Glycam-06j-Kraftfeld angelegt wurde.^[150-153] Für Luminol-Derivat **1** und **1**-1AzGlc wurden RESP-

Ladungen (restrained electrostatic potential) auf Hartree Fock-Niveau mit der 6-31G(d)-Basis berechnet, die im Programmpaket Gaussian03 festgelegt wurde.^[154-155] Durch die Nutzung von *tleap* der AMBERTools14 wurden dem Protein Wasserstoffatome zugewiesen, Ladungen durch Na⁺-Ionen neutralisiert und das TIP3P-Wassermodell angewendet, um das modifizierte Protein in einer verkürzten oktaedrischen Hülle mit einem Radius von 8 Å mit Wassermolekülen zu solvatisieren.^[156] Eine Minimierung von 1000 Zyklen wurde mit Einschränkungen am Protein-Liganden-Komplex (Kraftkonstante von 500 kcal·mol⁻¹·Å⁻²) durchgeführt, gefolgt von 2500 Schritten ohne Einschränkungen, die auf die Minimierung des gesamten Systems abzielen. Minimierungen wurden mit *sander* durchgeführt. Die sukzessive Erwärmung von 0 auf 300 K wurde mit einer Dauer von 100 ps, inklusive Einschränkungen (Kraftkonstante von 10,0 kcal·mol⁻¹·Å⁻²) auf dem gelösten Protein-Liganden-Komplex und 6-Kestose, eingesetzt. Die Simulation wurde für 20 ns ohne Einschränkungen in Zeitschritten von 1 fs fortgesetzt und zusätzlich für weitere 80 ns mit einem Zeitschritt von 2 fs für 100 ns simuliert. Um die Temperatur auf 300 K zu halten, wurde die Langevin-Dynamik mit einer Kollisionsfrequenz von 1,0 ps⁻¹ verwendet. Die elektrostatischen Wechselwirkungen wurden mit der PME-Methode (Particle Mesh Ewald) behandelt, Wasserstoff mit dem SHAKE-Algorithmus eingeschränkt und ein Grenzradius für Van-der-Waals-Interaktionen von 12,0 Å verwendet.^[157] Jeder Simulationslauf wurde mit periodischen Randbedingungen durchgeführt.

7.7 Chemisch-analytische Methoden

7.7.1 HPAEC-PAD Analyse des Produktprofils

Die Analyse des Produktprofils von modifizierten und unmodifizierten Levansucrase-Varianten und die Bestimmung des Transfer/Hydrolyse-Verhältnisses wurden mit Reaktionen durchgeführt, die 0,5 M Saccharose und 3 U mL⁻¹ des Enzyms in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 enthielten. Die Detektion und die Untersuchung von Oligosacchariden erfolgte mit einem Dionex ICS-5000+SP System (HPAEC-PAD) unter Verwendung einer Carbopac PA10 Säule. Die Eluenten der angewandten Methode waren 100 mM NaOH (A) und 1 M NaOAc (B). Die Quantifizierung von Glucose und Fructose erfolgte mit einem mehrstufigen Gradienten, der wie folgt programmiert wurde: 0-5 min 100 % A, 5-30 min 0-50 % B, 30-45 min 100 % A. Die Freisetzung von Glucose spiegelt die globale Aktivität (Hydrolyse und Transfructosylierung) wider, während die Fructose nur durch Hydrolyse entsteht. Die Differenz zwischen Glucose- und Fructose-Konzentration entspricht der Transfructosylierungsrate.

7.7.2 Gel-Permeations-Chromatographie

Reaktionen für die GPC-Analyse wurden mit dem entsprechenden Enzym in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 0,5 M Saccharose und 3 U mL⁻¹ Enzymaktivität durchgeführt. Nach einer Zeitspanne von 24-48 h wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50 mM NaOH gestoppt. Die Aufreinigung der synthetisierten Produkte von unterschiedlichen Varianten der Levansucrase erfolgte durch Ethanolfällung. Dabei wurden 5 Volumina kaltes Ethanol pro 1 Volumen des Reaktionsansatzes zugegeben. Die ausgefallenen Oligosaccharide wurden zunächst zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet erneut in dH₂O gelöst. Anschließend wurden die Oligosaccharide wieder mit 5 Volumina kaltem Ethanol gefällt, und der Überstand verworfen. Durch diesen Vorgang konnten noch enthaltene Monosaccharide abgetrennt werden. Die gereinigten Oligo- und Polysaccharide wurden schließlich in dH₂O gelöst und gefriergetrocknet. Für die Analyse wurde ein GPC-System von Malvern (Herrenberg, Deutschland) eingesetzt. Das System besteht aus einem Viscotek GPCmax (Inline-Entgaser, 2-Kolbenpumpe und Autosampler), einem Säulenofen (35 °C), einem Brechungsindex-(RI)-Detektor (Viscotek VE3580) und Viscotek A-Säulen (Schutzsäule und zwei analytische Säulen A6000M, Länge = 50 mm + bzw. 300 mm, Breite = 8 mm, poröses Poly(methylmethacrylat), Partikelgröße 13 µm). Nach dem Auflösen der Proben über Nacht wurden sie mit einer 0,45 µm Cellulose Membran gefiltert. Eine Endkonzentration von 1 g l⁻¹ Levan in einem Volumen von 100 µL wurde in das GPC-System injiziert und mit einer Elutionsrate von 0,7 mL min⁻¹ eluiert. Als Lösungsmittel und Elutionsmittel wurde eine wässrige Lösung von ddH₂O mit 8,5 g L⁻¹ NaNO₃ und 0,2 g L⁻¹ NaN₃ verwendet. Die Molekulargewichte der Poly- und Oligosaccharide wurden mit einer konventionellen Kalibrierung aus Dextran-Standards (SIGMA, Deutschland) berechnet.

7.7.3 HPLC und LC-MS Analytik

Die Analyse der Modifikationsreaktionen erfolgte durch LC-MS an einem micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) mit einer ESI-Ionenquelle (Apollo II), welches an ein Agilent 1100 HPLC-System gekoppelt war. Die Auflösung des Q-TOF MS Gerätes beträgt 20.000 und besitzt eine Massengenauigkeit von 5 ppm bei externer Kalibrierung. Proteine wurden auf eine Umkehrphasen-Säule (YMS-Pack C4, 15 cm x 4,6 mm ID, 5 µM, YMC) geladen und mit einem Stufengradienten von 25 % bis 90 % Acetonitril und einem konstanten Fluss von 0,5 mL min⁻¹ über 30 Minuten eluiert. Die MS-Spektren wurden kontinuierlich im Bereich m/z 200 - 3000 mit folgenden Einstellungen aufgezeichnet: *Capillary Voltage* -4,5 kV, *end plate voltage* -4 kV, Stickstoff-Verneblerdruck 3 bar, *dry gas* Fluss 12 L min⁻¹, *dry gas* Temperatur 180 °C; *funnel* 1 und 2 RF 400 Vpp, Hexapol RF 200 Vpp; Quadrupol-

Ionenenergie 5 eV, Quadrupol niedrige Masse 200 m/z; Kollisionsenergie 7 eV, Kollision RF 1000 Vpp, Übertragungszeit 100 μ s, Vorimpulsspeicher 10 μ s. Die Kalibrierung des Instruments erfolgte mit dem MMI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent) vor der Messung der Proben. Die Genauigkeit des Gerätes wurde durch wiederholtes Messen des Tuning Mix nach den Probenmessungen gewährleistet. Die Spektren wurden mit der Kompass-Software (Bruker Daltonics) aufgenommen, welche die OTOF Control 3.4 und Hystar 3.2 Software zur Steuerung des MS-Gerätes und der HPLC enthält. Für die Spektren Dekonvolution und Datenauswertung wurde die Datenanalysesoftware DA 4.2 (Bruker Daltonics) eingesetzt.

7.7.4 NanoLC-MS Analytik

Das Tyrosin-modifizierte Enzym (5 μ g) wurde nach Herstellervorschrift mit NuPAGE™ Sample Reducing Agent reduziert und mit Iodacetamid alkyliert, um auf eine 12 %-ige Acrylamid-SDS-PAGE geladen zu werden. Die erhaltenen Gelbanden wurden herausgeschnitten und mit 30 % Acetonitril in 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 8) entfärbt, mit 100 % Acetonitril versetzt und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet (Concentrator 5301, Eppendorf, Deutschland). Der Proteinverdau wurde mit 0,1 μ g Elastase pro Gelbande über Nacht bei 37 °C in 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 8) durchgeführt. Der Überstand wurde entfernt und die erhaltenen Peptide wurden aus den Gelstücken mit 5 %-iger Ameisensäure extrahiert. Anschließend wurden die extrahierten Peptide mit dem Überstand vereint. NanoLC-MS/MS-Analysen wurden an einer Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) durchgeführt, die mit einer PicoView Ionenquelle (New Objective) ausgestattet und mit einem EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) gekoppelt war. Die Peptide wurden auf Kapillarsäulen (PicoFrit, 30 cm x 150 μ m ID, New Objective) geladen, die mit ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 μ m gepackt waren und mit einem 30-minütigen linearen Gradienten von 3 % bis 40 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure und einer Flussrate von 500 nL min^{-1} getrennt wurden. Sowohl MS- als auch MS/MS-Scans wurden im Orbitrap *analyzer* mit einer Auflösung von 60.000 für MS-Scans und 15.000 für MS/MS-Scans erfasst. Es wurde eine gemischte ETD/HCD-Methode verwendet. Die HCD-Fragmentierung wurde mit 35 % normierter Kollisionsenergie durchgeführt. Für ETD wurden kalibrierte ladungsabhängige ETD-Parameter verwendet. Es wurde eine datenabhängige MS/MS-Methode mit einer festen Zykluszeit von 3 Sekunden verwendet. Der dynamische Ausschluss wurde mit einer Wiederholungszahl von 1 und einer Ausschlussdauer von 10 Sekunden angewendet; einfach geladene Vorläufer wurden von der Auswahl ausgeschlossen. Der minimale Signalschwellenwert für die Vorläuferauswahl wurde auf 50.000 gesetzt. Es wurde ein AGC (automatic generation control) System verwendet, sowie ein Zielwert von 2×10^5 für MS-Scans und 5×10^4 für

MS/MS-Scans. Für die interne Kalibrierung wurde EASY-IC verwendet. PEAKS Studio 8.0 wurde für die Rohdatenverarbeitung und Datenbanksuche mit folgenden Parametern verwendet: übergeordnete Massenfehlertoleranz: 7,0 ppm, Fragment-Massenfehlertoleranz: 0,015 Da, Enzym: keine, variable Modifikationen: Carbamidomethyl (C) (57,02 Da), Oxidation (M) (15,99 Da), Acetylierung (Protein N-terminal) (42,01 Da), Pyro-Glu (N-Terminal Q) (17,03 Da), **1** (markiert als J2) (Y) (256,08 Da) und **1-1AzGlc** (markiert als J2-Azido-glucopyranosid (Y)) (461,15 Da). Eine kleine, maßgeschneiderte Datenbank (ca. 200 Proteine) mit Sequenzen von Wildtyp *Bm*-LS und seinen Varianten wurde eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit 1 % FDR auf PSM-Ebene gefiltert.^[46]

7.7.5 NMR-Spektroskopie

Die Messungen von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren, sowie die 2D-NMR-Spektren (COSY, DEPT, HMBC, HSQC, NOESY) wurden mit einem BRUKER AVANCE 400 FT-NMR oder einem BRUKER AVANCE DMX 600 FT-NMR Spektrometer bei 25 °C durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm (parts per million) gemessen und auf TMS (Tetramethylsilan) $\delta=0$ ppm als Standard bezogen. Die Kalibrierung der ¹H-NMR-Spektren erfolgte durch das Restprotonensignal der verwendeten deuterierten Lösungsmittel, welche als internen Standard dienten (CDCl₃: $\delta=7,26$ ppm). ¹³C-NMR-Spektren wurden durch das ¹³C-Resonanzsignal der jeweiligen Lösemittel kalibriert (CDCl₃: $\delta=77,16$ ppm). Die Multiplizitäten sind als s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), t (Triplet) und m (Multipllett) bezeichnet, wobei ein sehr breites Signal mit *br* (*broad*) gekennzeichnet wurde. Die Kopplungskonstanten *J* wurden in Hz angegeben.

7.8 Synthesevorschriften

7.8.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese clickbarer Peptide

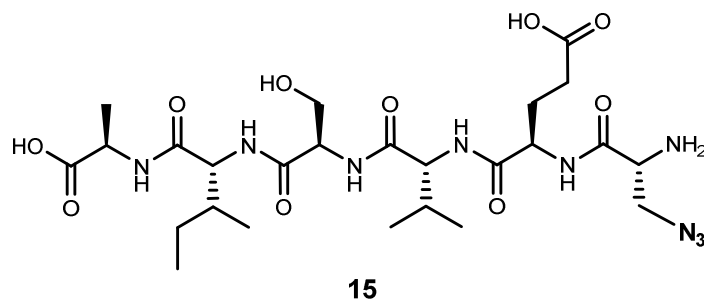
Zunächst wurden 50 mg (0,025 mmol, 1 Äq) HMBP ChemMatrix® Resin in einem Reaktionsgefäß für 30 min mit DCM überschichtet. Nach Aufquellen der Reaktionsmatrix wurde das DCM abgelassen und 10 Äq (0,25 mmol) der ersten Fmoc-L-Aminosäure zugegeben und in DCM gelöst. Für die erste Beladung des Hydroxymethyl Resins wurde die MSNT/Melm Methode gewählt. Dafür wurden zur gelösten Aminosäure 7,5 μ L (94 μ mol, 3,75 Äq) 1-Methylimidazol und 37 mg (0,125 mmol, 5 Äq) MSNT gegeben und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgelassen und das Resin mit DCM (5 x 5 mL) und DMF (5 x 5 mL) gewaschen. Zur Reaktionskontrolle wurde der TNBS-Test durchgeführt. Dabei werden die Resin-Kügelchen im Falle von freien Amin-Gruppen rot und bei geschützten Amin-Gruppen

weiß. Nach erfolgreicher Aminosäure-Kopplung erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit je 4 mL 20%-iger Piperidin-Lösung in DMF für 2 x 10 min. Die Matrix wurde erneut mit DCM (5 x 5 mL) und DMF (5 x 5 mL) gewaschen und der TNBS-Test ausgeführt, um die Entschützung zu überprüfen. Bei einem positiven Ergebnis (rote Resin-Kügelchen) wurde die zweite Fmoc-Aminosäure angebracht. Hierfür wurden 5 Äq (0,125 mmol) der nächsten Aminosäure, 5 Äq (0,125 mmol) HATU sowie 10 Äq (0,25 mmol) DIPEA zum Resin gegeben, in DMF gelöst und geschüttelt. Nach 1 h Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung abgelassen und die Matrix mit DCM (5 x 5 mL) und DMF (5 x 5 mL) gewaschen. Zur Reaktionskontrolle wurde wieder der TNBS-Test durchgeführt und bei erfolgreicher Kopplung die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Für die folgenden Aminosäuren wurde wie zuvor beschrieben die nächste Fmoc-L-Aminosäure zugegeben und ein neuer Kopplungszyklus gestartet. Nachdem die letzte Aminosäure gekoppelt und entschützt wurde, konnte das Peptid durch die Zugabe von 2 mL einer Lösung bestehend aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser (95:2,5:2,5) vom Resin abgespalten werden. Für eine vollständige Abspaltung wurde das Resin für 30 min mit der TFA-Lösung geschüttelt. Das Trägermaterial wurde zusätzlich mit 1 mL Trifluoressigsäure nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Peptid in Methanol oder Wasser gelöst und mit 40 mL kaltem Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und das Peptid-Pellet in Wasser gelöst und lyophilisiert.

TNBS-Test:

Der TNBS-Test wurde mit einigen zuvor gewaschenen Matrix-Kügelchen durchgeführt. Dafür wurden die Kügelchen mit je einem Tropfen 1 % TNBS in DMF und 10 % DIPEA in DMF versetzt. Nach 5 min bei Raumtemperatur oder kurzem Erwärmen wurden die Kügelchen mit einem Mikroskop auf ihre Färbung untersucht.

7.8.1.1 Synthese von OH-Ala-Ile-Ser-Val-Glu-Aza-NH₂



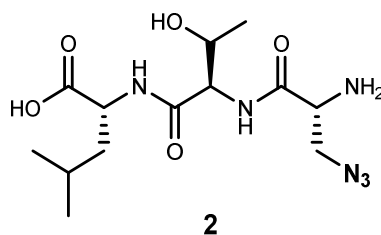
Aminosäure	Molare Masse [g mol ⁻¹]	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]
Fmoc-Ala-OH	311,33	0,25	77,8
Fmoc-Ile-OH	353,41	0,125	44,2
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	0,125	47,9
Fmoc-Val-OH	339,39	0,125	42,5
Fmoc-Glu(O ^t Bu)-OH	425,47	0,125	53,2
Fmoc-Aza-OH	352,34	0,125	44,1

Ausbeute: 6.45 mg, 10.0 μmol, 41 %

Summenformel: C₂₅H₄₃N₉O₁₀ (629,67 g mol⁻¹)

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₂₅H₄₄N₉O₁₀ [M+H]⁺ 630,32057; gefunden 630,32086; (|Δm/z| = 0,46 ppm)

7.8.1.2 Synthese von OH-Leu-Thr-Aza-NH₂

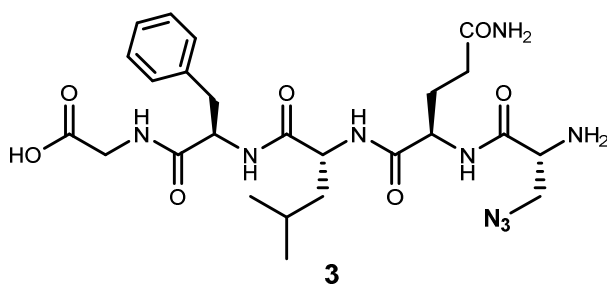


Aminosäure	Molare Masse [g mol ⁻¹]	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]
Fmoc-Leu-OH	353,41	0,25	84,4
Fmoc-Thr-OH	359,37	0,125	44,9
Fmoc-Aza-OH	352,34	0,125	44,1

Ausbeute: 4.56 mg, 13.0 μmol, 53 %

Summenformel: C₁₃H₂₄N₆O₅ (344,37 g mol⁻¹)

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₁₃H₂₅N₆O₅ [M+H]⁺ 345,18809; gefunden 345,18827; (|Δm/z| = 0,52 ppm)

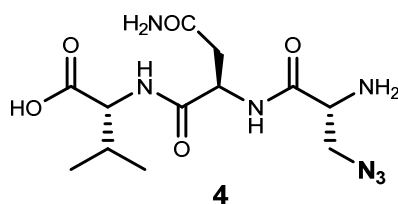
7.8.1.3 Synthese von OH-Gly-Phe-Leu-Gln-Aza-NH₂

Aminosäure	Molare Masse [g mol ⁻¹]	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,25	74,3
Fmoc-Phe-OH	387,43	0,125	48,4
Fmoc-Leu-OH	353,41	0,125	44,2
Fmoc-Gln-OH	368,39	0,125	46,1
Fmoc-Aza-OH	352,34	0,125	44,1

Ausbeute: 6.04 mg, 11.0 μmol, 42 %

Summenformel: C₂₅H₃₇N₉O₇ (575,63 g mol⁻¹)

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₂₅H₃₈N₉O₇ [M+H]⁺ 576,28887; gefunden 576,28967; (|Δm/z| = 1,39 ppm)

7.8.1.4 Synthese von OH-Val-Asn-Aza-NH₂

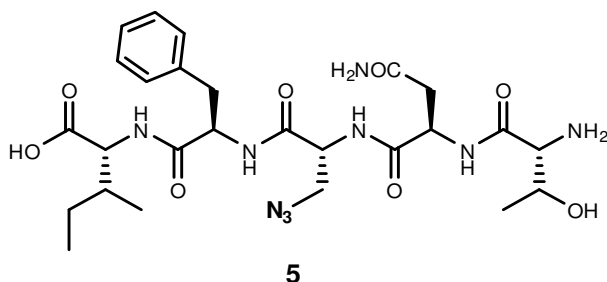
Aminosäure	Molare Masse [g mol ⁻¹]	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]
Fmoc-Val-OH	339,39	0,25	84,8
Fmoc-Asn-OH	352,34	0,125	44,3
Fmoc-Aza-OH	352,34	0,125	44,1

Ausbeute: 4.03 mg, 12.0 μmol , 47 %

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_5$ (343,34 g mol^{-1})

HRMS (ESI, m/z): berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 344,16769; gefunden 344,16768; ($|\Delta\text{m/z}| = 0,04$ ppm)

7.8.1.5 Synthese von OH-Ile-Phe-Aza-Asn-Thr-NH₂



Aminosäure	Molare Masse [g mol^{-1}]	Stoffmenge [mmol]	Masse [mg]
Fmoc-Ile-OH	353,41	0,25	88,4
Fmoc-Phe-OH	387,43	0,125	48,4
Fmoc-Aza-OH	352,34	0,125	44,1
Fmoc-Asn-OH	352,34	0,125	44,3
Fmoc-Thr-OH	359,37	0,125	44,9

Ausbeute: 5.91 mg, 9.00 μmol , 39 %

Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_9\text{O}_8$ (605,65 g mol^{-1})

HRMS (ESI, m/z): berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 606,2994; gefunden 606,3014; ($|\Delta\text{m/z}| = 3,2$ ppm)

7.8.2 Allgemeine Vorschrift zur Synthese und Isolation von 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose

Die enzymatische Synthese der Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose wurde mit der Levansucrase-Variante K373L durchgeführt, da diese Variante eine erhöhte Produktion dieser Zucker-Moleküle aufweist. Dafür wurden 125 mL einer wässrigen Lösung aus 0,5 M Saccharose, 50 mM Sörensen-Puffer pH 6,6 und 3 U mL^{-1} des Enzyms 48 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95 °C

für 10 Minuten gestoppt. Nach Filtration der Mischung (0,2 µm Cellulose Filter) wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt und 19,5 g eines farblosen Rohprodukts erhalten. Das Rohprodukt enthielt die Monosaccharide Glucose und Fructose, sowie eine Mischung aus Di- und Oligosacchariden. Zur Eliminierung des hohen Glucose- und Fructosegehalts wurden zwei Methoden getestet: Normalphasen-Säulenchromatographie mit Kieselgel und Fermentation mit der Hefe *H. polymorpha*. Der Eluent für die Kieselgel-Säulenchromatographie war H₂O/Isopropanol/Ethylacetat (1:3:6). Für die Fermentation von Glucose und Fructose wurden 5 g des Rohprodukts verwendet, in 150 mL ddH₂O gelöst und mit 50 g immobilisierter *H. polymorpha* Hefe versetzt. Das Gemisch wurde 24 h bei 25 °C inkubiert. Die Fermentation wurde durch Erhitzen bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Die Hefealginat wurden durch Filtration zurückgewonnen und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Es wurden 2,9 g eines farblosen Sirups erhalten, der über die Größenausschluss säule Bio-Gel®P2 (Eluent ddH₂O) aufgereinigt wurde, um Fructooligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad von 3-4 und Verunreinigungen von Glycerin zu erhalten. Im Anschluss wurden mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie (RP-18, Eluent ddH₂O) die gewünschten Produkte 1-Kestose (43 mg, 28 % von 1-Kestosegehalt in 19,5 g Rohprodukt), 6-Kestose (111 mg, 56 %) und 6-Nystose (62 mg, 20 %) erhalten.

Charakterisierung der Produkte:

1-Kestose:

Ausbeute: 43,0 mg, 28 %

Summenformel: C₁₈H₃₂O₁₆ (504,44 g mol⁻¹)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.40 (1H, d, ³J = 3.8 Hz, H_{Glu-1}), 4.25 (1H, d, ³J = 8.7 Hz, H_{Fru1-3'}), 4.16 (1H, d, ³J = 8.5 Hz, H_{Fru2-3''}), 4.05 (1H, dd, ³J = 8.5, 8.5 Hz, H_{Fru2-4''}), 4.02 (1H, dd, ³J = 8.7, 8.7 Hz, H_{Fru1-4'}), 3.86-3.83 (2H, m, H_{Fru1-5'}, H_{Fru2-5''}), 3.86-3.79 (1H, m, H_{Fru2-1''a}), 3.83-3.80 (2H, m, H_{Fru1-6'b}, H_{Glu-5}), 3.83-3.74 (4H, m, H_{Fru1-6'}, H_{Fru2-6''}), 3.82-3.78 (1H, m, H_{Fru1-1'a}), 3.79-3.77 (2H, m, H_{Glu-6}), 3.74 - 3.71 (1H, dd, ³J = 9.9, 9.6 Hz, H_{Glu-3}), 3.73-3.64 (1H, m, H_{Fru2-1''b}), 3.71-3.67 (1H, m, H_{Fru1-1'b}), 3.52 (1H, dd, ³J = 9.9, 3.8 Hz, H_{Glu-2}), 3.46-3.43 (1H, dd, ³J = 9.6, 9.6 Hz, H_{Glu-4}) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 103.7 (C_{Fru2-2''}), 103.2 (C_{Fru1-2'}), 92.4 (CH_{Glu-1}), 81.1 (2C, CH_{Fru1-5'}, CH_{Fru2-5''}), 76.5 (2C, CH_{Fru1-3'}, CH_{Fru2-3''}), 74.4 (CH_{Fru2-4''}), 73.8 (CH_{Fru1-4'}), 72.5 (CH_{Glu-3}), 72.3 (CH_{Glu-5}), 71.1 (CH_{Glu-2}), 69.1 (CH_{Glu-4}), 62.2, (2C, CH_{2,Fru1-6'}, CH_{2,Fru2-6''}), 60.8 (2C, CH_{2,Fru1-1'}, CH_{2,Fru2-1''}), 60.0 (CH_{2,Glu-6}) ppm

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₁₈H₃₂NaO₁₆ [M+Na]⁺ 527,15826; gefunden 527,15996; (|Δm/z| = 3,2 ppm)

6-Kestose:**Ausbeute:** 111 mg, 56 %**Summenformel:** C₁₈H₃₂O₁₆ (504,44 g mol⁻¹)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.35 (1H, d, ³J = 3.9 Hz, H_{Glu-1}), 4.17 (1H, d, ³J = 8.7 Hz, H_{Fru1-3'}), 4.14 (1H, d, ³J = 8.4 Hz, H_{Fru2-3''}), 4.07 (1H, dd, ³J = 8.4, 8.0 Hz, H_{Fru2-4''}), 4.02 (1H, dd, ³J = 8.7, 8.6 Hz, H_{Fru1-4'}), 3.94 – 3.91 (2H, m, H_{Fru1-5'}, H_{Fru1-6'a}), 3.86-3.84 (1H, m, H_{Fru2-5''}), 3.84-3.79 (2H, m, H_{Fru1-6'b}, H_{Fru2-6''a}), 3.83-3.77 (3H, m, H_{Glu-6a}, H_{Glu-6b}, H_{Glu-5}), 3.77-3.75 (1H, m, H_{Fru2-1''a}), 3.74-3.71 (1H, dd, ³J = 9.8, 9.5 Hz, H_{Glu-3}), 3.66-3.59 (4H, m, H_{Fru1-1'}, H_{Fru2-1''b}, H_{Fru2-6''b}), 3.54-3.52 (1H, dd, ³J = 9.8, 3.9 Hz, H_{Glu-2}), 3.45-3.42 (1H, dd, ³J = 9.5, 9.5 Hz, H_{Glu-4}) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 103.7 (2C, C_{Fru1-2'}, C_{Fru2-2''}), 92.1 (CH_{Glu-1}), 81.1 (CH_{Fru2-5''}), 80.3 (CH_{Fru1-5'}), 76.4 (CH_{Fru2-3''}), 76.0 (CH_{Fru1-3'}), 74.6 (CH_{Fru2-4''}), 74.3 (CH_{Fru1-4'}), 72.5 (CH_{Glu-3}), 72.4 (CH_{Glu-5}), 71.0 (CH_{Glu-2}), 69.2 (CH_{Glu-4}), 62.9 (CH_{2,Fru1-6'}), 62.6 (CH_{2,Fru2-6''}), 61.1 (CH_{2,Fru1-1'}), 60.2 (CH_{2,Glu-6}), 59.7 (CH_{2,Fru2-1''}) ppm

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₁₈H₃₂NaO₁₆ [M+Na]⁺ 527,15826; gefunden 527,15916; (|Δm/z| = 1,7 ppm)

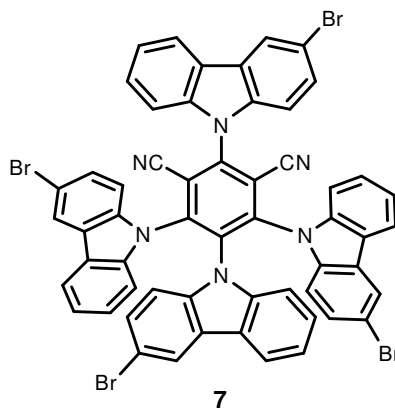
6-Nystose:**Ausbeute:** 62,0 mg, 20 %**Summenformel:** C₂₄H₄₂O₂₁ (666,60 g mol⁻¹)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.40 (1H, d, ³J = 3.9 Hz, H_{Glu-1}), 4.24 (1H, d, ³J = 8.6 Hz, H_{Fru1-3'}), 4.16 (1H, d, ³J = 8.5 Hz, H_{Fru3-3'''}), 4.15 (1H, d, ³J = 8.5 Hz, H_{Fru2-3''}), 4.10 (1H, dd, ³J = 8.5, 8.5 Hz, H_{Fru2-4''}), 4.04 (1H, dd, ³J = 8.6, 8.6 Hz, H_{Fru1-4'}), 4.02 (1H, dd, ³J = 8.5, 7.8 Hz, H_{Fru3-4'''}), 3.94 – 3.91 (2H, m, H_{Fru3-5'''}, H_{Fru3-6'''a}), 3.87-3.84 (2H, m, H_{Fru1-5'}, H_{Fru2-5''}), 3.83-3.82 (1H, m, H_{Fru2-1''a}), 3.83-3.76 (3H, m, H_{Fru1-6'}, H_{Fru2-6''a}), 3.82-3.80 (1H, m, H_{Glu-5}), 3.82-3.78 (2H, m, H_{Glu-6}), 3.81 (2H, m, H_{Fru3-1'''}), 3.76-3.75 (1H, m, H_{Fru1-1'a}), 3.75-3.72 (1H, m, H_{Fru3-6'''b}), 3.73 (1H, dd, ³J = 9.6, 9.6 Hz, H_{Glu-3}), 3.68-3.64 (1H, m, H_{Fru2-6''b}), 3.67-3.65 (2H, m, H_{Fru2-1''b}), 3.52 (1H, dd, ³J = 9.6, 3.9 Hz, H_{Glu-2}), 3.45 (1H, dd, ³J = 9.6, 9.6 Hz, H_{Glu-4}) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 103.9 (C_{Fru3-2'''}), 103.7 (C_{Fru2-2''}), 103.2 (C_{Fru1-2'}), 92.4 (CH_{Glu-1}), 81.2 (CH_{Fru2-5''}), 81.1 (CH_{Fru1-5'}), 80.2 (CH_{Fru3-5'''}), 76.5 (CH_{Fru2-3''}), 76.4 (CH_{Fru1-3'}), 76.3 (CH_{Fru3-3'''}), 75.1 (CH_{Fru3-4'''}), 74.6 (CH_{Fru2-4''}), 73.7 (CH_{Fru1-4'}), 72.5 (CH_{Glu-3}), 72.3 (CH_{Glu-5}), 71.0 (CH_{Glu-2}), 69.1 (CH_{Glu-4}), 63.1 (CH_{2,Fru3-6'''}), 62.5 (CH_{2,Fru2-6''}), 62.0 (CH_{2,Fru1-6'}), 60.7 (CH_{2,Fru1-1'}), 60.3 (CH_{2,Glu-6}), 60.0 (CH_{2,Fru3-1'''}), 59.8 (CH_{2,Fru2-1''}) ppm

HRMS (ESI, m/z): berechnet für $C_{24}H_{42}NaO_{21}$ $[M+Na]^+$ 689,21108; gefunden 689,21240; ($|\Delta m/z| = 1,9$ ppm)

7.8.3 Synthese von (2*R*,4*S*,6*S*)-2,4,5,6-Tetrakis(3-brom-9*H*-carbazol-9-yl)isophthalonitril



120 mg (60 % in Öl, 3,00 mmol, 7,5 Äq) NaH wurden portionsweise zu einer im Eisbad gekühlten Lösung aus 492 mg (2 mmol, 5 Äq) 3-Brom-9*H*-carbazol in trockenem THF (5 mL) unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden 80,0 mg (400 µmol, 1 Äq) Tetrafluorisophthalonitril hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde langsam auf Raumtemperatur gebracht und weitere 12 h gerührt. Das überschüssige NaH wurde vorsichtig mit 10 mL Wasser gequencht und die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelbe Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Dichlormethan (3:1) gereinigt.

Ausbeute: 424 mg, 0.38 mmol, 96 %

Summenformel: $C_{56}H_{28}Br_4N_6$ (1104,50 g mol⁻¹)

R_f-Wert (SiO₂, Cy/DCM 3:1, UV): 0,16

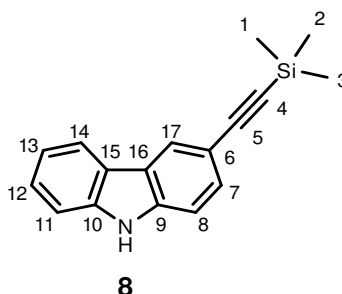
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.64-6.83 (m, 4H), 6.85-6.91 (m, 1H), 6.93-6.95 (m, 1H), 7.01-7.18 (m, 6H), 7.19-7.21 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 2H), 7.32-7.35 (m, 1H), 7.48-7.52 (m, 3H), 7.59-7.62 (m, 1H), 7.68-7.75 (m, 3H), 7.77-7.80 (m, 1H), 7.83-7.87 (m, 2H), 8.16-8.18 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 8.34 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (Gemisch aus Isomeren bzw. Rotameren) = 109.3 (CH), 109.4 (CH), 109.6 (CH), 109.7 (CH), 109.9 (CH), 110.0 (CH), 110.0 (CH), 110.1 (CH), 110.4 (CH), 110.5 (CH), 110.6 (CH), 110.6 (CH), 110.0 (CH), 111.1 (CH), 111.2 (CH), 111.2 (CH),

111.3 (CH), 114.4 (C_q), 114.4 (C_q), 114.5 (C_q), 115.3 (C_q), 115.3 (C_q), 115.4 (C_q), 115.8 (C_q), 116.5 (2C, CN), 120.4 (CH), 121.0 (CH), 121.9 (CH), 121.9 (CH), 122.0 (CH), 122.1 (CH), 122.8 (CH), 123.1 (CH), 123.2 (CH), 123.6 (CH), 123.6 (CH), 123.7 (CH), 123.8 (CH), 124.0 (CH), 124.5 (CH), 125.9 (CH), 125.9 (CH), 125.9 (CH), 126.0 (CH), 126.5 (C_q), 126.5 (C_q), 126.9 (CH), 126.9 (CH), 127.0 (CH), 127.7 (CH), 128.0 (CH), 128.5 (CH), 128.6 (CH), 128.7 (CH), 128.8 (CH), 129.9 (CH), 134.5 (C_q), 135.7 (C_q), 135.7 (C_q), 135.7 (C_q), 136.7 (C_q), 136.8 (CH), 137.2 (C_q), 137.3 (C_q), 137.3 (C_q), 138.5 (C_q), 138.6 (C_q), 138.6 (C_q), 140.2 (C_q), 144.6(C_q), 144.9 (C_q)

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₅₆H₂₈Br₄ClN₆ [M+Cl]⁻ 1134,8803; gefunden 1134,8757; (|Δm/z| = 4,0 ppm)

7.8.4 Synthese von 3-((Trimethylsilyl)ethynyl)-9H-carbazol



In einem 50 mL-Schlenkkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 2,5 g (10 mmol, 1 Äq) 3-Brom-9H-carbazol, 0,7 g (1 mmol, 0,1 Äq) Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)-chlorid und 95,2 mg (0,5 mmol, 0,05 Äq) Kupferiodid in 25 mL Triethylamin gelöst. Nach Entgasen durch die Freeze-pump-thaw Methode wurden der Reaktionslösung 3 mL (30 mmol, 3 Äq) Ethynyltrimethylsilan zugegeben. Zuvor wurde Ethynyltrimethylsilan nach derselben Methode separat entgast. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter Rückflusskühlung bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden 50 mL Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Dichlormethan (8:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.58 g, 9.80 mmol, 98 %

Summenformel: C₁₇H₁₇NSi (263,42 g mol⁻¹)

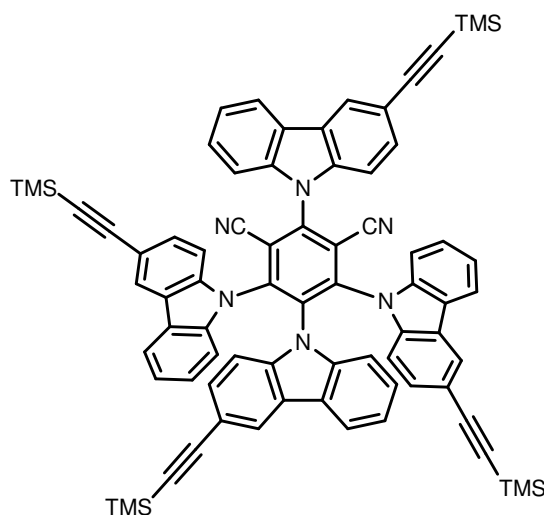
R_f-Wert (SiO₂, Cy/DCM 3:2, UV): 0,33

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.32 (s, 9H, *H*-1-3), 7.24-7.29 (m, 2H, *H*-12), 7.28 (dd, ⁵*J* = 0.7 Hz, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-8), 7.36-7.39 (m, ⁴*J* = 0.8 Hz, ³*J* = 1.1 Hz, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-14), 7.42-7.46 (m, ⁴*J* = 1.1 Hz, ³*J* = 7.0 Hz, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-13), 7.54 (dd, ⁴*J* = 1.6 Hz, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 8.04-8.06 (m, 1H, *H*-11), 8.24-8.26 (m, 1H, *H*-17)

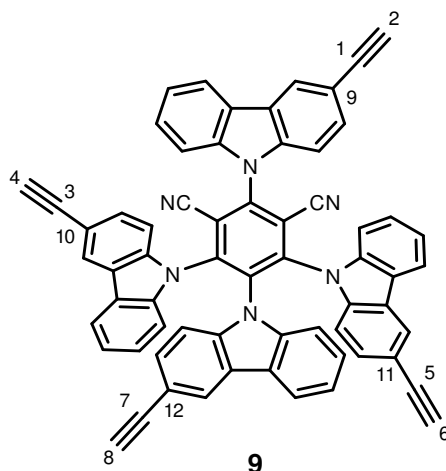
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 0.3 (*C*-1, *C*-2, *C*-3), 92.0 (*C*-4), 106.7 (*C*-5), 110.6 (*C*-8), 110.9 (*C*-14), 113.9 (*C*-6), 120.1 (*C*-12), 120.6 (*C*-11), 122.9 (*C*-16), 123.3 (*C*-15), 124.6 (*C*-17), 126.5 (*C*-13), 129.9 (*C*-7), 139.3 (*C*-9), 139.8 (*C*-10)

HRMS (ESI, *m/z*): berechnet für C₁₇H₁₆NSi [*M*-H]⁻ 262,1057; gefunden 262,1047; (|Δ*m/z*| = 4,0 ppm)

7.8.5 Synthese von (2*R*,4*S*,6*S*)-2,4,5,6-Tetrakis(3-((trimethylsilyl)ethynyl)-9*H*-carbazol-9-yl)isophthalonitril



Zu einer gekühlten Lösung aus 263 mg (1 mmol, 5 Äq) der Verbindung **8** und trockenem THF (7 mL) wurden unter Stickstoffatmosphäre 40,0 mg (60 % in Öl, 1,00 mmol, 5 Äq) NaH portionsweise zugegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden 40,0 mg (200 µmol, 1 Äq) Tetrafluorisophthalonitril hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde langsam auf Raumtemperatur gebracht und weitere 12 h gerührt. Das überschüssige NaH wurde vorsichtig mit 10 mL Wasser gequencht und die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelbe Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion umgesetzt.

7.8.6 Synthese von (2*R*,4*S*,6*S*)-2,4,5,6-Tetrakis(3-ethynyl-9*H*-carbazol-9-yl)isophthalonitril

Das Rohprodukt der Synthese 7.8.5 wurde unter Schutzgasatmosphäre in 8 mL trockenem THF mit 2,3 μL (40,0 μmol , 0,2 \AA q) Essigsäure gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die TMS-Schutzgruppe wurde durch eine katalytische Menge Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) abgespalten, indem eine 0,3 molare TBAF-Lösung langsam und unter Kühlung zugetropft wurde. Schon nach wenigen Tropfen konnte mittels Dünnschichtchromatographie eine vollständige Entschützung festgestellt werden. Die Reaktionslösung wurde mit 20 mL Wasser versetzt und mit Ethylacetat (3 x 30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Dichlormethan (3:2) gereinigt.

Ausbeute: 161 mg, 0.18 mmol, 91 % über 2 Stufen

Summenformel: $\text{C}_{64}\text{H}_{32}\text{N}_6$ (885,00 g mol^{-1})

R_f-Wert (SiO₂, Cy/DCM 3:2, UV): 0,08

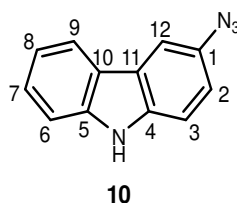
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (Gemisch aus Isomeren bzw. Rotameren) = 2.99 (app t, $J = 4.1$ Hz, 1H, *H*-2 oder *H*-8), 3.03-3.05 (m, 2H, *H*-4, *H*-6), 3.18 (s, 1H, *H*-2 oder *H*-8), 6.64-6.90 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.07-7.24 (m, 10H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.34-7.36 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.50-7.55 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.58-7.65 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.71-7.75 (m, 3H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.83-7.90 (m, 3H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 8.20-8.22 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 8.38 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (Gemisch aus Isomeren bzw. Rotameren) = 76.3/76.4/76.5 (*C*-2 oder *C*-8), 76.7 (*C*-4 oder *C*-6), 76.7 (*C*-4 oder *C*-6), 76.8 (Signal überlagert mit Resonanzsignal des Lösungsmittels, *C*-2 oder *C*-8), 83.8 (*C*-3 oder *C*-5), 83.8 (*C*-3 oder *C*-5),

83.9/83.9 (C-1 oder C-7), 83.9 (C-1 oder C-7), 109.1 (CH), 109.2 (CH), 109.3 (CH), 109.3 (CH), 109.4 (CH), 109.5 (CH), 109.6 (CH), 109.7 (CH), 109.8 (CH), 109.9 (CH), 110.0 (CN), 111.3 (CN), 114.9/115.0/115.0 (C-9 oder C-12), 115.9/115.9/115.9/115.9/116.0/116.0/116.0 (C-10, C-11), 116.5/116.5 (C-9 oder C-12), 120.4 (CH), 121.0/121.0/121.0 (CH), 121.8 (CH), 121.9/122.0/122.1 (CH), 122.8 (CH), 122.9 (CH), 123.2 (CH), 123.2 (CH), 124.0 (CH), 124.0 (CH), 124.4 (CH), 124.7 (CH), 124.9 (CH), 124.9 (CH), 125.2 (CH), 125.7 (CH), 125.8 (CH), 126.6 (CH), 126.7 (CH), 127.8 (CH), 128.9 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (CH), 130.0 (CH), 131.0 (CH), 134.4 (C_q), 134.4 (C_q), 134.5 (C_q), 136.7 (C_q), 136.8 (C_q), 136.8 (C_q), 137.2 (C_q), 137.8 (C_q), 137.9 (C_q), 138.5 (C_q), 138.5 (C_q), 139.7 (C_q), 140.3 (C_q), 144.6 (C_q), 144.8 (C_q), 144.8 (C_q)

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₆₄H₃₂N₆Na [M+Na]⁺ 907,2581; gefunden 907,2558; (|Δm/z| = 2,5 ppm)

7.8.7 Synthese von 3-Azido-9H-carbazol



In einem 25 mL-Schlenkkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 492 mg (2,00 mmol, 1 Äq) 3-Brom-9H-carbazol, 260 mg (4,00 mmol, 2 Äq) Natriumazid, 19,8 mg (0,10 mmol, 0,05 Äq) Natriumascorbat, 38,1 mg (0,20 mmol, 0,1 Äq) Kupferiodid und 43,1 µL (0,40 mmol, 0,2 Äq) N¹,N²-dimethylethan-1,2-diamin in 4 mL Ethanol/Wasser (7:3) gelöst. Die Reaktionslösung wurde unter Rückfluss bei 80 °C für 20 h gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Gemisch wurde mit 50 mL destilliertem Wasser versetzt und mit Ethylacetat (4 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert, mit Ethylacetat nachgespült und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der goldbraune Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Toluol (4:1) gereinigt.

Ausbeute: 362 mg, 1.74 mmol, 87 %

Summenformel: C₁₂H₈N₄ (208,22 g mol⁻¹)

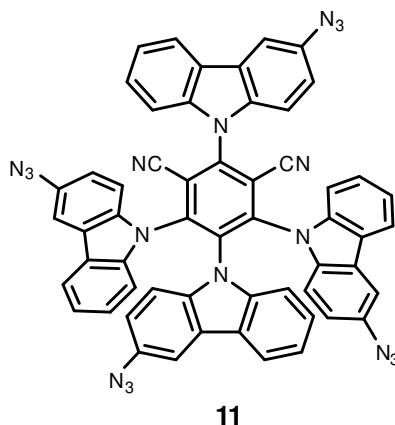
R_f-Wert (SiO₂, Cy/Toluol 4:1, UV): 0,17

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.10 (dd, ⁴J = 2.2 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, H-2), 7.23-7.27 (m, 1H, H-9), 7.40 (dd, ⁴J = 0.5 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, H-3), 7.43-7.45 (m, 2H, H-7 und H-8), 7.72-7.73 (m, 1H, H-12), 8.03-8.06 (m, 2H, H-6 und NH)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 110.4 (C-12), 111.0 (C-7 oder C-8), 111.8 (C-3), 117.6 (C-2), 119.8 (C-9), 120.7 (C-6), 122.8 (C-10), 124.5 (C-11), 126.7 (C-7 oder C-8), 131.9 (C-4), 137.1 (C-1), 140.3 (C-5)

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₁₂H₇N₄ [M-H]⁻ 207,0676; gefunden 207,0678; (|Δm/z| = 1,0 ppm)

7.8.8 Synthese von (2*R*,4*S*,6*S*)-2,4,5,6-Tetrakis(3-azido-9*H*-carbazol-9-yl)isophthalonitril



Zu einer gekühlten Lösung aus 87,5 mg (0,42 mmol, 5 Äq) der Verbindung **10** und trockenem THF (3 mL) wurden unter Stickstoffatmosphäre 18,0 mg (60 % in Öl, 0,42 mmol, 5 Äq) NaH portionsweise zugegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden 16,1 mg (84,0 μmol, 1 Äq) Tetrafluorisophthalonitril hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde langsam auf Raumtemperatur gebracht und weitere 12 h gerührt. Das überschüssige NaH wurde vorsichtig mit 10 mL Wasser gequencht und die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das rotbraune Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Dichlormethan (3:2) gereinigt.

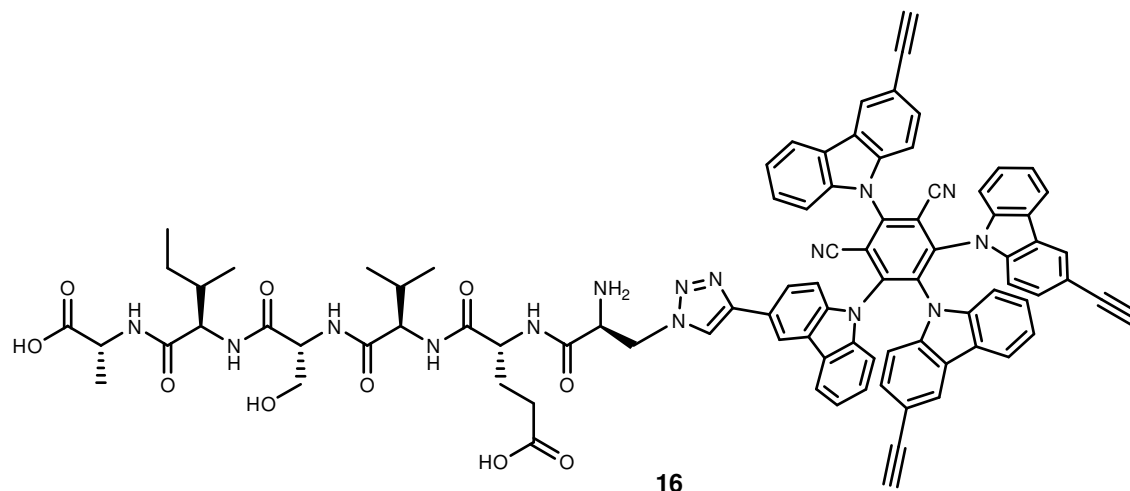
Ausbeute: 42.4 mg, 45.0 μmol, 53 %

Summenformel: C₅₆H₂₈N₁₈ (952,97 g mol⁻¹)

R_f-Wert (SiO₂, Cy/DCM 3:2, UV): 0,20

HRMS (ESI, m/z): berechnet für $C_{56}H_{28}ClN_{18}$ $[M+Cl]^-$ 987,2438; gefunden 987,2435;
 $(|\Delta m/z| = 0,3 \text{ ppm})$

7.8.9 Synthese von Photokatalysator **16**



In einem 10 mL Rundkolben wurden 4,41 mg (7,0 μmol , 1 Äq) des Peptids **15** und 6,20 mg (7,0 μmol , 1 Äq) des Photokatalysators **9** in 1 mL THF/Wasser (8:2) gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit 14 μL (100 mM, 1,40 μmol , 0,2 Äq) Kupfer(II)-Acetat versetzt und der Reaktionsstart durch die Zugabe von 2,8 μL (1 M, 2,80 μmol , 0,4 Äq) Natriumascorbat eingeleitet. Nach 24 h wurde erneut dieselbe Menge Kupfer(II)-Acetat und Natriumascorbat hinzugefügt. Die Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgte ohne vorherige Entfernung des Lösemittels durch eine HPLC mit einer C18-Säule (YMC-Pack ODS-A). Es wurde folgendes Programm für die Elution des Produkts gewählt:

Flussrate: 0,25 mL min^{-1} A: 95/5/0,1 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{Ameisensäure}$)

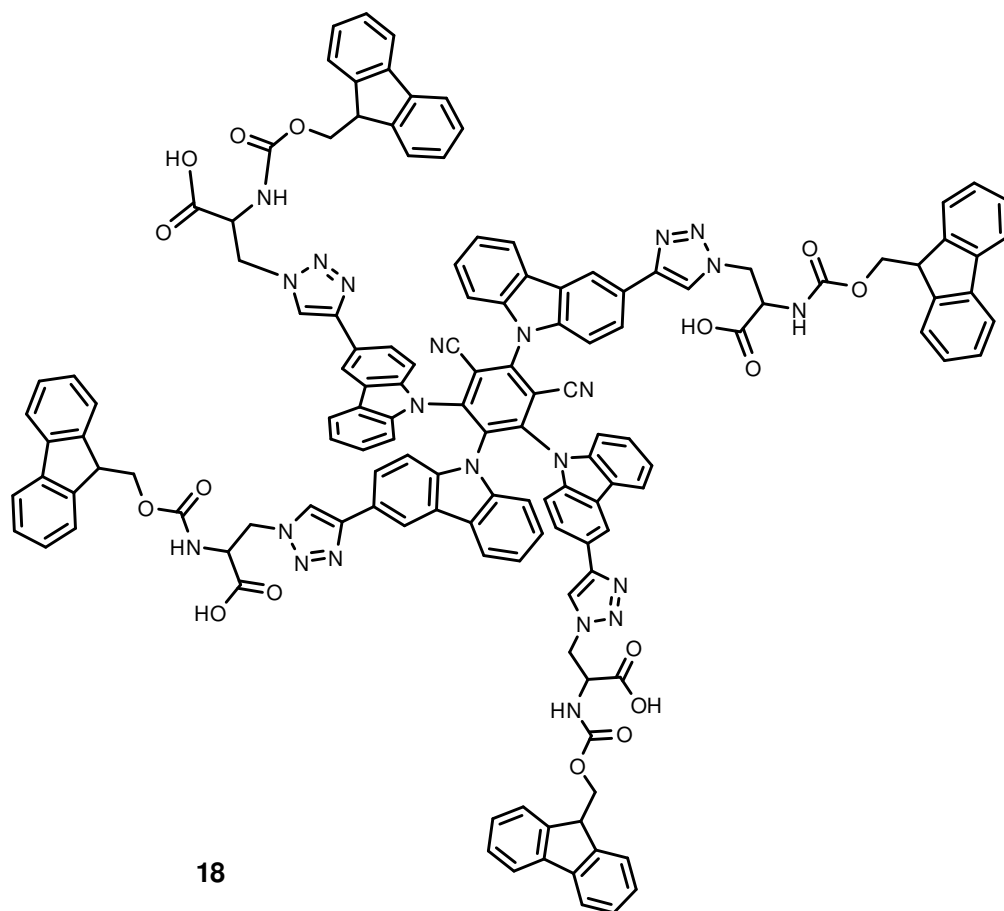
B: 95/5/0,1 ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}/\text{Ameisensäure}$)

Time [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
5	50	50
20	0	100
25	0	100
26	90	10
45	90	10

Ausbeute: 4.24 mg, 2.80 μmol , 40 %

Summenformel: $C_{89}H_{75}N_{15}O_{10}$ (1514,67 g mol^{-1})

HRMS (ESI, m/z): berechnet für $C_{89}H_{76}N_{15}O_{10}$ $[M+H]^+$ 1514,5894; gefunden 1514,5850;
 $(|\Delta m/z| = 2,9 \text{ ppm})$

7.8.10 Synthese von Photokatalysator **18**

In einem 10 mL Rundkolben wurden 16,9 mg (48,0 μmol , 4,8 \AA q) Fmoc-L- β -Azidoalanin und 8,85 mg (10,0 μmol , 1 \AA q) des Photokatalysators **9** in 2 mL THF gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit 20 μL (100 mM, 1,40 μmol , 0,2 \AA q) Kupfer(II)-Acetat versetzt und der Reaktionsstart durch die Zugabe von 4 μL (1 M, 2,80 μmol , 0,4 \AA q) Natriumascorbat eingeleitet. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol mit 0,1 % TFA (von 50:1 schrittweise zu 10:1) gereinigt.

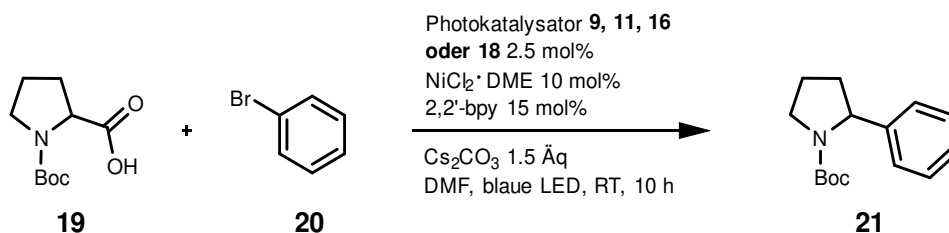
Ausbeute: 17.2 mg, 7.50 μmol , 75 %

Summenformel: $\text{C}_{136}\text{H}_{96}\text{N}_{22}\text{O}_{16}$ (2294,40 g mol $^{-1}$)

R_f-Wert (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, UV): 0,20

HRMS (ESI, m/z): berechnet für $\text{C}_{136}\text{H}_{95}\text{N}_{22}\text{O}_{16}$ [M-H] $^{-}$ 2291,73019; gefunden 2291,73137; ($|\Delta m/z| = 0,51$ ppm)

7.8.11 Allgemeine Vorschrift für die photokatalysierte decarboxylierende Alkylierung



In einem Reaktionsgefäß wurden 53,8 mg (0,25 mmol, 1 Äq) Boc-L-Prolin, 122 mg (0,37 mmol, 1,5 Äq) Caesiumcarbonat, 5,49 mg (25,0 µmol, 0,1 Äq) NiCl₂ glyme, 5,86 mg (37,0 µmol, 0,15 Äq) 2,2'-Bipyridin und der entsprechende Photokatalysator (7,50 µmol, 0,03 Äq) in trockenem THF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde durch Stickstoff-Einleitung für 20 min bei 0 °C entgast. Nach Zugabe von 26 µL (0,25 mmol, 1 Äq) Brombenzol wurde das Gemisch 4 cm von einer blauen LED Lampe entfernt gerührt. Um eine konstante Raumtemperatur zu halten wurde die Abwärme der Lampe durch einen Ventilator gekühlt. Nach 18 h wurde die Reaktionslösung in 20 mL Wasser überführt und mit Ethylacetat (3 x 30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat (15:1) gereinigt.

Aktivität: mit Photokatalysator **9**: 12 % mit Photokatalysator **11**: inaktiv
 mit Photokatalysator **16**: aktiv mit Photokatalysator **18**: aktiv

Summenformel: C₁₅H₂₁NO₂ (247,24 g mol⁻¹)

R_f-Wert (SiO₂, Cy/EtOAc 5:1): 0,58

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.17 (s, 6H, CMe₃), 1.45 (s, 3H, CMe₃), 1.79-1.92 (m, 3H, CH₂), 2.31 (bs, 1H, CH₂), 3.44-3.70 (m, 2H, NCH₂), 4.75-4.95 (m, 1H, NCH), 7.15-7.18 (m, 2H, Ph), 7.20-7.22 (m, 1H, Ph), 7.27-7.33 (m, 2H, Ph)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 23.3 (CH₂), 28.3 (CMe₃), 36.2 (CH₂), 47.2 (NCH₂), 61.5 (NCH), 79.3 (CMe₃), 125.6 (Ph), 126.6 (Ph), 128.2 (Ph), 145.3 (*ipso*-Ph), 154.7 (C=O)

Die erhaltenen NMR-Daten entsprechen denen der Literatur.^[158]

HRMS (ESI, m/z): berechnet für C₁₅H₂₁NO₂ [M+Na]⁺ 270,1464; gefunden 270,1465; (|Δm/z| = 0,1 ppm)

Literaturverzeichnis

- [1] J. Ertl, M. E. Ortiz-Soto, T. A. Le, J. Bechold, J. Shan, J. Teßmar, B. Engels, J. Seibel, *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 6456-6456.
- [2] E. Gooch, *Journal of Chemical Education* **2002**, *79*, 562.
- [3] F. W. Lichtenthaler, in *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, **2010**.
- [4] R. A. Dwek, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 683-720.
- [5] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [6] C. H. Wong, *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2003**.
- [7] J. Edelman, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **1956**, pp. 189-232.
- [8] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger, *Essentials of Glycobiology, 3rd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2015-2017**.
- [9] O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 2174-2195.
- [10] W. Xu, D. Ni, W. Zhang, C. Guang, T. Zhang, W. Mu, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2019**, *59*, 3630-3647.
- [11] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*, 307-317.
- [12] B. Henrissat, *Biochemical Journal* **1991**, *280*, 309-316.
- [13] A. Lévassieur, E. Drula, V. Lombard, P. M. Coutinho, B. Henrissat, *Biotechnology for Biofuels* **2013**, *6*, 41.
- [14] V. Lombard, T. Bernard, C. Rancurel, H. Brumer, Pedro M. Coutinho, B. Henrissat, *Biochemical Journal* **2010**, *432*, 437-444.
- [15] B. Henrissat, A. Bairoch, *Biochemical Journal* **1996**, *316*, 695-696.
- [16] C. P. Strube, A. Homann, M. Gamer, D. Jahn, J. Seibel, D. W. Heinz, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 17593-17600.
- [17] C. K. M. Chen, N.-L. Chan, A. H. J. Wang, *Trends in Biochemical Sciences* **2011**, *36*, 553-561.
- [18] M. E. Ortiz-Soto, J. R. Porras-Domínguez, J. Seibel, A. López-Munguía, *Carbohydrate Polymers* **2019**, *219*, 130-142.
- [19] M. A. Anwar, S. Kralj, A. V. Piqué, H. Leemhuis, M. J. E. C. van der Maarel, L. Dijkhuizen, *Microbiology* **2010**, *156*, 1264-1274.
- [20] C. Olvera, S. Centeno-Leija, A. Lopez Munguia canales, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **2007**, *92*, 11-20.
- [21] R. Chambert, G. Treboul, R. Dedonder, *European Journal of Biochemistry* **1974**, *41*, 285-300.

- [22] R. Chambert, G. Gonzy-Treboul, *European Journal of Biochemistry* **1976**, *71*, 493-508.
- [23] G. Meng, K. Fütterer, *Nature Structural Biology* **2003**, *10*, 935.
- [24] L. K. Ozimek, S. A. F. T. van Hijum, G. A. van Koningsveld, M. J. E. C. van der Maarel, G. H. van Geel-Schutten, L. Dijkhuizen, *FEBS Letters* **2004**, *560*, 131-133.
- [25] C. S. Rye, S. G. Withers, *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 573-580.
- [26] B. Bissaro, P. Monsan, R. Fauré, Michael J. O'Donohue, *Biochemical Journal* **2015**, *467*, 17-35.
- [27] M. L. Sinnott, *Chemical Reviews* **1990**, *90*, 1171-1202.
- [28] A. Homann, R. Biedendieck, S. Gotze, D. Jahn, J. Seibel, *Biochemical Journal* **2007**, *407*, 189-198.
- [29] G. Meng, K. Fütterer, *BMC Structural Biology* **2008**, *8*, 16.
- [30] L. K. Ozimek, S. Kralj, M. J. E. C. van der Maarel, L. Dijkhuizen, *Microbiology* **2006**, *152*, 1187-1196.
- [31] L. Hernandez, J. Arrieta, C. Menendez, R. Vazquez, A. Coego, V. Suarez, G. Selman, M. F. Petit-Glatron, R. Chambert, *The Biochemical journal* **1995**, *309 (Pt 1)*, 113-118.
- [32] E. Castillo, A. López-Munguía, *Journal of biotechnology* **2004**, *114*, 209-217.
- [33] T. Tanaka, S. Oi, T. Yamamoto, *The Journal of Biochemistry* **1980**, *87*, 297-303.
- [34] J. R. Porras-Domínguez, Á. Ávila-Fernández, A. Miranda-Molina, M. E. Rodríguez-Alegría, A. L. Munguía, *Carbohydrate Polymers* **2015**, *132*, 338-344.
- [35] T. Tanaka, S. Oi, T. Yamamoto, *The Journal of Biochemistry* **1979**, *85*, 287-293.
- [36] E. Raga-Carbajal, E. Carrillo-Nava, M. Costas, J. Porras-Dominguez, A. López-Munguía, C. Olvera, *Glycobiology* **2015**, *26*, 377-385.
- [37] E. Raga-Carbajal, A. López-Munguía, L. Alvarez, C. Olvera, *Scientific Reports* **2018**, *8*, 15035.
- [38] C.-J. Chiang, J.-Y. Wang, P.-T. Chen, Y.-P. Chao, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *82*, 445.
- [39] A. Hill, S. Karboune, C. Mateo, *Process Biochemistry* **2017**, *61*, 63-72.
- [40] F. Benyahia, R. Chambert, M.-F. Petit-Glatron, *Microbiology* **1988**, *134*, 3259-3268.
- [41] M. E. Ortiz-Soto, J. Ertl, J. Mut, J. Adelman, T. A. Le, J. Shan, J. Teßmar, A. Schlosser, B. Engels, J. Seibel, *Chemical Science* **2018**, *9*, 5312-5321.
- [42] S. Li, Y. Yan, Z. Zhou, H. Yu, Y. Zhan, W. Zhang, M. Chen, W. Lu, S. Ping, M. Lin, *Molecular Biology Reports* **2011**, *38*, 2437-2443.
- [43] M. E. Ortiz-Soto, M. Rivera, E. Rudiño-Piñera, C. Olvera, A. López-Munguía, *Protein Engineering, Design and Selection* **2008**, *21*, 589-595.
- [44] M. Elena Ortiz-Soto, C. Possiel, J. Görl, A. Vogel, R. Schmiedel, J. Seibel, *Glycobiology* **2017**, *27*, 755-765.

- [45] R. Beine, R. Moraru, M. Nimtz, S. Na'amnieh, A. Pawlowski, K. Buchholz, J. Seibel, *Journal of Biotechnology* **2008**, *138*, 33-41.
- [46] J. Ertl, M. E. Ortiz-Soto, T. A. Le, J. Bechold, J. Shan, J. Teßmar, B. Engels, J. Seibel, *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 6533-6541.
- [47] Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, Á. Domínguez, M. A. Galán, E. M. Martín del Valle, *Biocatalysis and Biotransformation* **2018**, *36*, 233-244.
- [48] E. T. Öner, L. Hernández, J. Combie, *Biotechnol Adv* **2016**, *34*, 827-844.
- [49] R. Srikanth, C. H. S. S. Reddy, G. Siddartha, M. J. Ramaiah, K. B. Uppuluri, *Carbohydrate Polymers* **2015**, *120*, 102-114.
- [50] E. J. Yoon, S.-H. Yoo, J. Cha, H. Gyu Lee, *Int J Biol Macromol* **2004**, *34*, 191-194.
- [51] A. M. Abdel-Fattah, A. M. Gamal-Eldeen, W. A. Helmy, M. A. Esawy, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *89*, 314-322.
- [52] J. Liu, J. Luo, H. Ye, X. Zeng, *Food and Chemical Toxicology* **2012**, *50*, 767-772.
- [53] R. Srikanth, G. Siddartha, C. H. S. S. Sundhar Reddy, B. S. Harish, M. Janaki Ramaiah, K. B. Uppuluri, *Carbohydrate Polymers* **2015**, *123*, 8-16.
- [54] G. R. Gibson, M. B. Roberfroid, *The Journal of Nutrition* **1995**, *125*, 1401-1412.
- [55] Y. Yang, S. Galle, M. H. A. Le, R. T. Zijlstra, M. G. Gänzle, *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81*, 5743.
- [56] K. Adamberg, K. Tomson, T. Talve, K. Pudova, M. Puurand, T. Visnapuu, T. Alamäe, S. Adamberg, *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0144042.
- [57] E. M. Martín del Valle, M. A. Galán, R. G. Carbonell, *Ind Eng Chem Res* **2009**, *48*, 2475-2486.
- [58] B. D. Ulery, L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J Polym Sci B Polym Phys* **2011**, *49*, 832-864.
- [59] S.-J. Kim, P. K. Bae, B. H. Chung, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 107-110.
- [60] T. D. Gomes, S. G. Caridade, M. P. Sousa, S. Azevedo, M. Y. Kandur, E. T. Öner, N. M. Alves, J. F. Mano, *Acta Biomaterialia* **2018**, *69*, 183-195.
- [61] C. D. Spicer, B. G. Davis, *Nature Communications* **2014**, *5*, 4740.
- [62] C. T. Walsh, *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2006**, *34*, 461-462.
- [63] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, B. G. Davis, in *Ideas in Chemistry and Molecular Sciences*, **2010**, pp. 59-91.
- [64] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877.
- [65] H. Cho, T. Daniel, Y. J. Buechler, D. C. Litzinger, Z. Maio, A.-M. H. Putnam, V. S. Kraynov, B.-C. Sim, S. Bussell, T. Javahishvili, S. Kaphle, G. Viramontes, M. Ong, S. Chu, B. Gc, R. Lieu, N. Knudsen, P. Castiglioni, T. C. Norman, D. W. Axelrod, A. R. Hoffman, P. G. Schultz, R. D. DiMarchi, B. E. Kimmel, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 9060.
- [66] M. Schnolzer, S. B. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221.
- [67] L. S. Witus, M. B. Francis, *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 774-783.

- [68] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 730-741.
- [69] C. D. Spicer, E. T. Pashuck, M. M. Stevens, *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 7702-7743.
- [70] H. Ban, J. Gavriyuk, C. F. Barbas, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1523-1525.
- [71] K. Wals, H. Ovaa, *Front Chem* **2014**, *2*, 15.
- [72] J. M. Palomo, *RSC Advances* **2014**, *4*, 32658-32672.
- [73] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chemistry – An Asian Journal* **2009**, *4*, 630-640.
- [74] P. M. S. D. Cal, G. J. L. Bernardes, P. M. P. Gois, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 10585-10587.
- [75] H. P. Hemantha, S. N. Bavikar, Y. Herman-Bachinsky, N. Haj-Yahya, S. Bondalapati, A. Ciechanover, A. Brik, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 2665-2673.
- [76] Z. Liu, T. Liu, Q. Lin, C. Bao, L. Zhu, *Chemical Communications* **2014**, *50*, 1256-1258.
- [77] O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, M. Fernández-González, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 1432-1436.
- [78] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5052-5053.
- [79] T. Bavaro, M. Filice, C. Temporini, S. Tengattini, I. Serra, C. F. Morelli, G. Massolini, M. Terreni, *RSC Advances* **2014**, *4*, 56455-56465.
- [80] A. O.-Y. Chan, C.-M. Ho, H.-C. Chong, Y.-C. Leung, J.-S. Huang, M.-K. Wong, C.-M. Che, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 2589-2598.
- [81] S. Diethelm, M. A. Schafroth, E. M. Carreira, *Organic Letters* **2014**, *16*, 3908-3911.
- [82] A. Díaz-Rodríguez, B. G. Davis, *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 211-219.
- [83] H. Ban, M. Nagano, J. Gavriyuk, W. Hakamata, T. Inokuma, C. F. Barbas, *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 520-532.
- [84] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3718-3723.
- [85] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15942-15943.
- [86] H.-M. Guo, M. Minakawa, L. Ueno, F. Tanaka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 1210-1213.
- [87] D. Kaiser, J. M. Winne, M. E. Ortiz-Soto, J. Seibel, T. A. Le, B. Engels, *The Journal of Organic Chemistry* **2018**, *83*, 10248-10260.
- [88] R. Adamo, Q.-Y. Hu, A. Torosantucci, S. Crotti, G. Brogioni, M. Allan, P. Chiani, C. Bromuro, D. Quinn, M. Tontini, F. Berti, *Chemical Science* **2014**, *5*, 4302-4311.

- [89] D. M. Bauer, I. Ahmed, A. Vigovskaya, L. Fruk, *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 1094-1101.
- [90] S. Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, *ACS Chemical Biology* **2015**, *10*, 2633-2640.
- [91] J. M. McFarland, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 13490-13491.
- [92] J. M. Antos, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10256-10257.
- [93] A. On-Yee Chan, J. Lui-Lui Tsai, V. Kar-Yan Lo, G.-L. Li, M.-K. Wong, C.-M. Che, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 1428-1430.
- [94] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 633-645.
- [95] R. Huisgen, *Proceedings of the Chemical Society* **1961**, 357-396.
- [96] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [97] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [98] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [99] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 210-216.
- [100] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 2210-2215.
- [101] V. K. Tiwari, B. B. Mishra, K. B. Mishra, N. Mishra, A. S. Singh, X. Chen, *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 3086-3240.
- [102] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [103] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [104] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1540-1573.
- [105] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chemical Biology* **2006**, *1*, 644-648.
- [106] F. Liu, R. S. Paton, S. Kim, Y. Liang, K. N. Houk, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 15642-15649.
- [107] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 19.
- [108] J.-F. Lutz, Z. Zarafshani, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 958-970.
- [109] L. Schermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catalysis* **2019**, *9*, 4115-4144.

- [110] L. Hilterhaus, A. Liese, U. Kettling, G. Antranikian, *Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., **2016**.
- [111] R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 801-838.
- [112] J. Du, K. L. Skubi, D. M. Schultz, T. P. Yoon, *Science* **2014**, *344*, 392.
- [113] M. A. Ischay, M. E. Anzovino, J. Du, T. P. Yoon, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 12886-12887.
- [114] M. H. Shaw, J. Twilton, D. W. C. MacMillan, *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 6898-6926.
- [115] T. Lazarides, I. V. Sazanovich, A. J. Simaan, M. C. Kafentzi, M. Delor, Y. Mekmouche, B. Faure, M. Réglier, J. A. Weinstein, A. G. Coutsolelos, T. Tron, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 3095-3103.
- [116] S. H. Lee, D. S. Choi, S. K. Kuk, C. B. Park, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 7958-7985.
- [117] M. A. Emmanuel, N. R. Greenberg, D. G. Oblinsky, T. K. Hyster, *Nature* **2016**, *540*, 414-417.
- [118] W. Zhang, E. F. Fueyo, F. Hollmann, L. L. Martin, M. Pesic, R. Wardenga, M. Höhne, S. Schmidt, *European Journal of Organic Chemistry* **2019**, *2019*, 80-84.
- [119] X. Guo, Y. Okamoto, M. R. Schreier, T. R. Ward, O. S. Wenger, *Chemical Science* **2018**, *9*, 5052-5056.
- [120] A. Hill, F. Tian, S. Karboune, *Current Organic Chemistry* **2017**, *21*, 149-161.
- [121] D. Goldman, N. Lavid, A. Schwartz, G. Shoham, D. Danino, Y. Shoham, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 32209-32217.
- [122] M. Vivoli, H. R. Novak, J. A. Littlechild, N. J. Harmer, *JoVE* **2014**, e51809.
- [123] Y. Hua, A. H. Flood, *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1262-1271.
- [124] M. E. Ortiz-Soto, C. Possiel, J. Görl, A. Vogel, R. Schmiedel, J. Seibel, *Glycobiology* **2017**, *27*, 755-765.
- [125] M. Carabotti, A. Scirocco, M. A. Maselli, C. Severi, *Ann Gastroenterol* **2015**, *28*, 203-209.
- [126] C. Megan, A. Nadia, H. Lindsey, B. Manisha, W. Emily, W. Sarah, **2017**.
- [127] C. Possiel, M. E. Ortiz-Soto, J. Ertl, A. Münch, A. Vogel, R. Schmiedel, J. Seibel, *Scientific Reports* **2019**, *9*, 7720.
- [128] O. Hernández, A. I. Ruiz-Matute, A. Olano, F. J. Moreno, M. L. Sanz, *International Dairy Journal* **2009**, *19*, 531-536.
- [129] C. Nobre, J. A. Teixeira, L. R. Rodrigues, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2015**, *55*, 1444-1455.
- [130] K. Viigand, K. Põšnograjeva, T. Visnapuu, T. Alamäe, *Genes* **2018**, *9*.
- [131] R. Ye, J. Zhao, B. B. Wickemeyer, F. D. Toste, G. A. Somorjai, *Nature Catalysis* **2018**, *1*, 318-325.

- [132] Z. C. Litman, Y. Wang, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Nature* **2018**, *560*, 355-359.
- [133] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nature Catalysis* **2018**, *1*, 12-22.
- [134] J. Latham, J.-M. Henry, H. H. Sharif, B. R. K. Menon, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Nature communications* **2016**, *7*, 11873-11873.
- [135] M.-j. Bu, C. Cai, F. Gallou, B. H. Lipshutz, *Green Chemistry* **2018**, *20*, 1233-1237.
- [136] M. Cortes-Clerget, N. Akporji, J. Zhou, F. Gao, P. Guo, M. Parmentier, F. Gallou, J.-Y. Berthon, B. H. Lipshutz, *Nature Communications* **2019**, *10*, 2169.
- [137] A. S. Baker, A. Deiters, *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 1398-1407.
- [138] I. Drienovská, C. Mayer, C. Dulson, G. Roelfes, *Nature Chemistry* **2018**, *10*, 946-952.
- [139] Y. Yu, C. Hu, L. Xia, J. Wang, *ACS Catalysis* **2018**, *8*, 1851-1863.
- [140] J. T. Payne, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 5271-5274.
- [141] J. Luo, J. Zhang, *ACS Catalysis* **2016**, *6*, 873-877.
- [142] T.-Y. Shang, L.-H. Lu, Z. Cao, Y. Liu, W.-M. He, B. Yu, *Chemical Communications* **2019**, *55*, 5408-5419.
- [143] E. Speckmeier, T. G. Fischer, K. Zeitler, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 15353-15365.
- [144] A. Bauer, F. Westkämper, S. Grimme, T. Bach, *Nature* **2005**, *436*, 1139-1140.
- [145] K. F. Biegasiewicz, S. J. Cooper, X. Gao, D. G. Oblinsky, J. H. Kim, S. E. Garfinkle, L. A. Joyce, B. A. Sandoval, G. D. Scholes, T. K. Hyster, *Science* **2019**, *364*, 1166.
- [146] C. Jiang, W. Chen, W.-H. Zheng, H. Lu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2019**, *17*, 8673-8689.
- [147] G. L. Miller, *Anal Chem* **1959**, *31*, 426-428.
- [148] D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerruti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman, *University of California, San Francisco* **2014**.
- [149] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, *J Cheminform* **2012**, *4*, 17.
- [150] K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. González-Outeiriño, C. R. Daniels, B. L. Foley, R. J. Woods, *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 622-655.
- [151] J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling, *J Chem Theory Comput* **2015**, *11*, 3696-3713.
- [152] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case, *J Mol Graph Model* **2006**, *25*, 247-260.

- [153] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1157-1174.
- [154] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, J. T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Wallingford CT, **2004**.
- [155] W. J. Hehre, R. Ditchfield, J. A. Pople, *The Journal of Chemical Physics* **1972**, *56*, 2257-2261.
- [156] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926-935.
- [157] J.-p. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys* **1977**, 327-341.
- [158] G. Barker, P. O'Brien, K. R. Campos, *Organic Letters* **2010**, *12*, 4176-4179.
- [159] A. Münch, Institut für organische Chemie, Universität Würzburg, Bachelor Thesis, **2018**.
- [160] A. Dümmler, A.-M. Lawrence, A. de Marco, *Microbial Cell Factories* **2005**, *4*, 34.
- [161] © Life Technologies Corporation,
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/geneart/geneart-vector-map.pdf#page=1&zoom=auto,-90,798>, **2013**.

Anhänge

NMR-Spektren

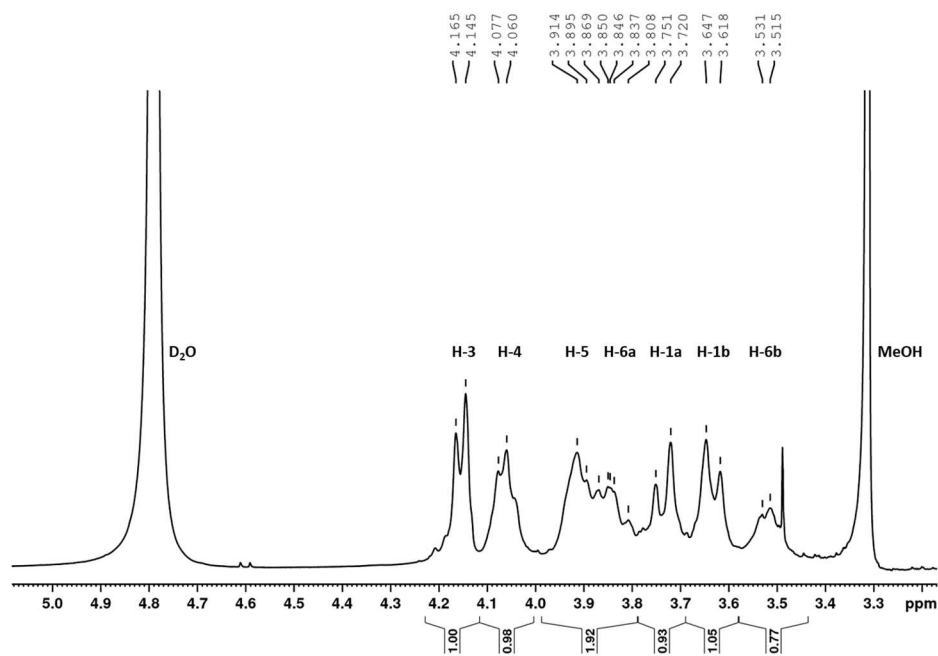


Abbildung 54: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, D₂O/MeOD) von Levan synthetisiert von Y247F-1-AzGlc.

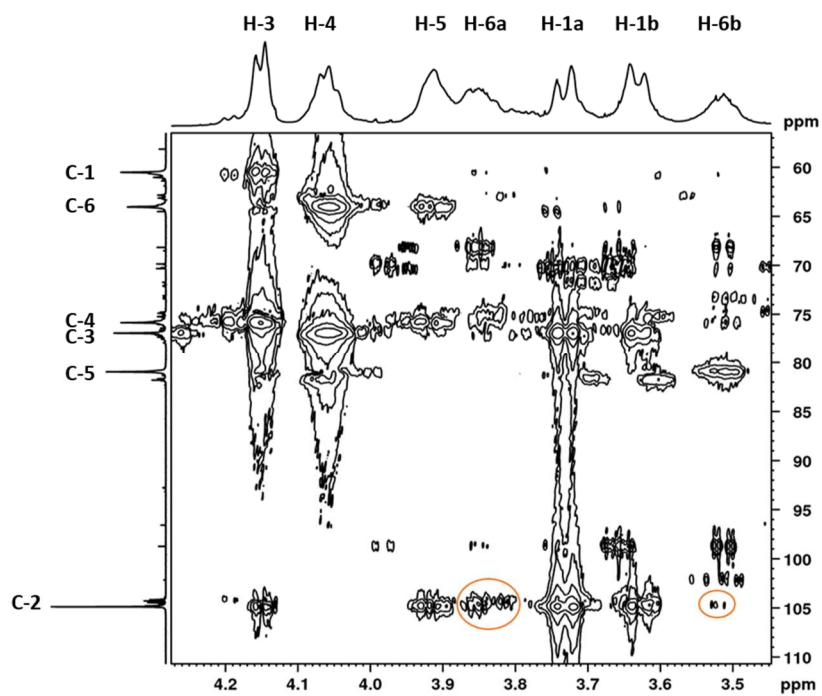


Abbildung 55: HMBC-Spektrum (600 MHz, D₂O/MeOD) von Levan synthetisiert von Y247F-1-AzGlc.

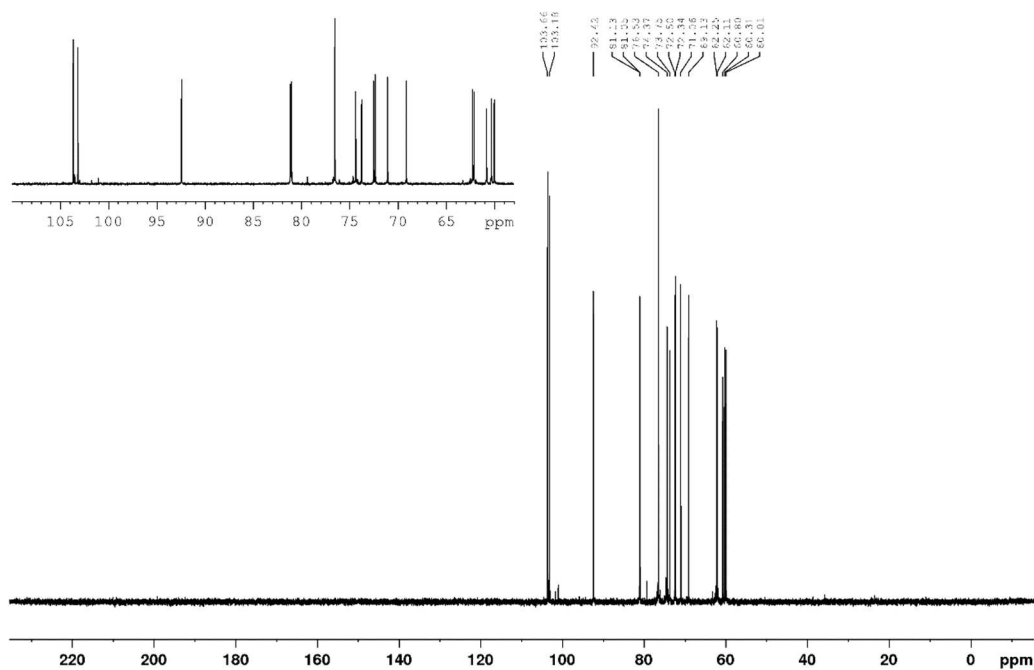


Abbildung 56: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von 1-Kestose.^[159]

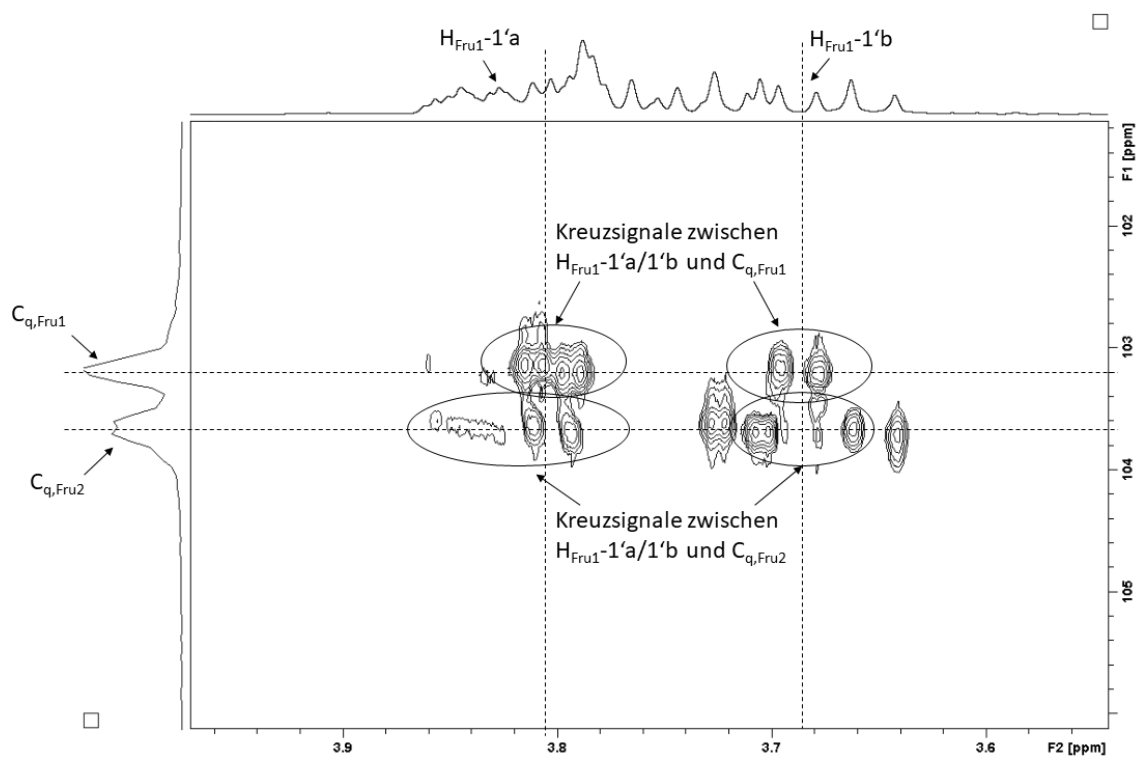


Abbildung 57: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der 1-Kestose.^[159]

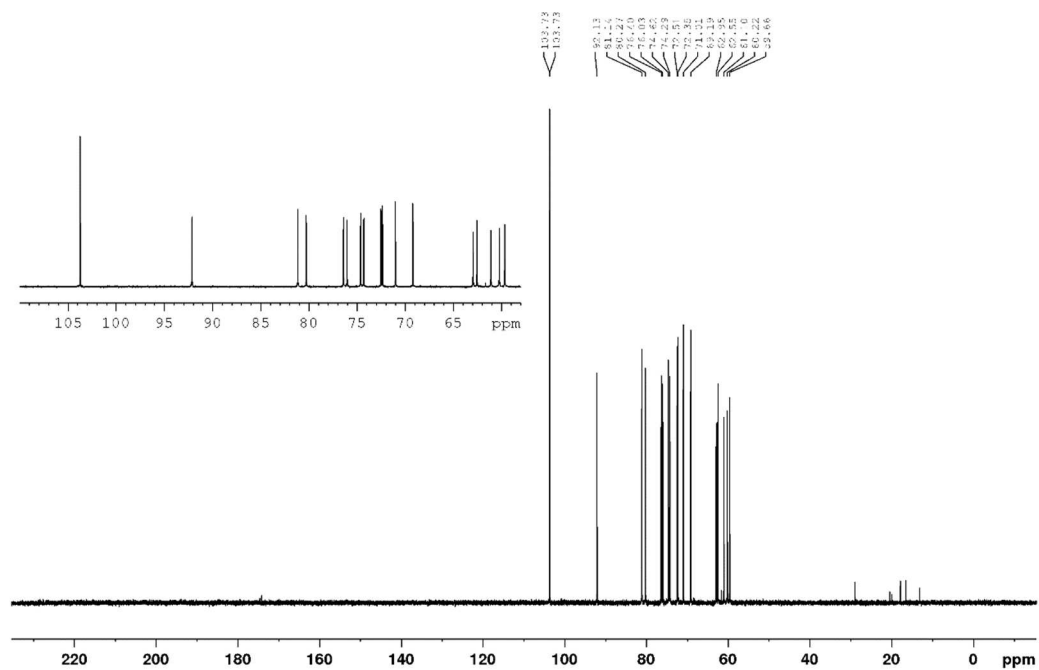


Abbildung 58: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von 6-Kestose.^[159]

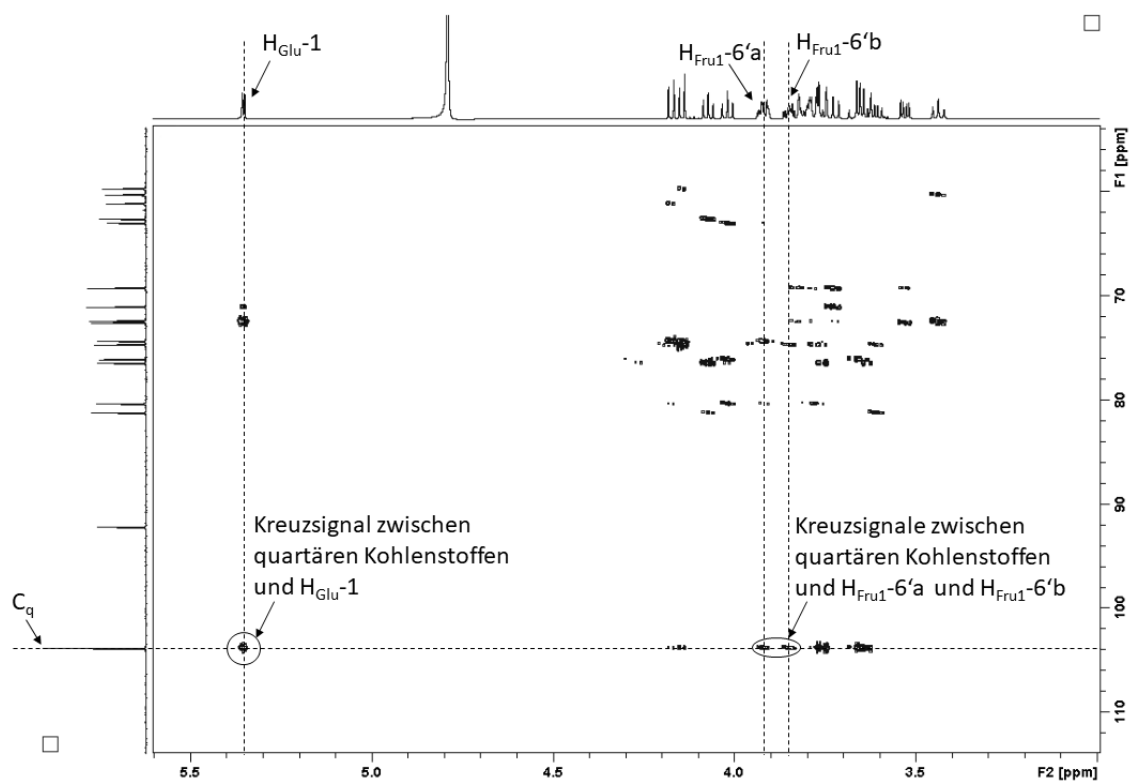


Abbildung 59: HMBC-Spektrum der 6-Kestose.^[159]

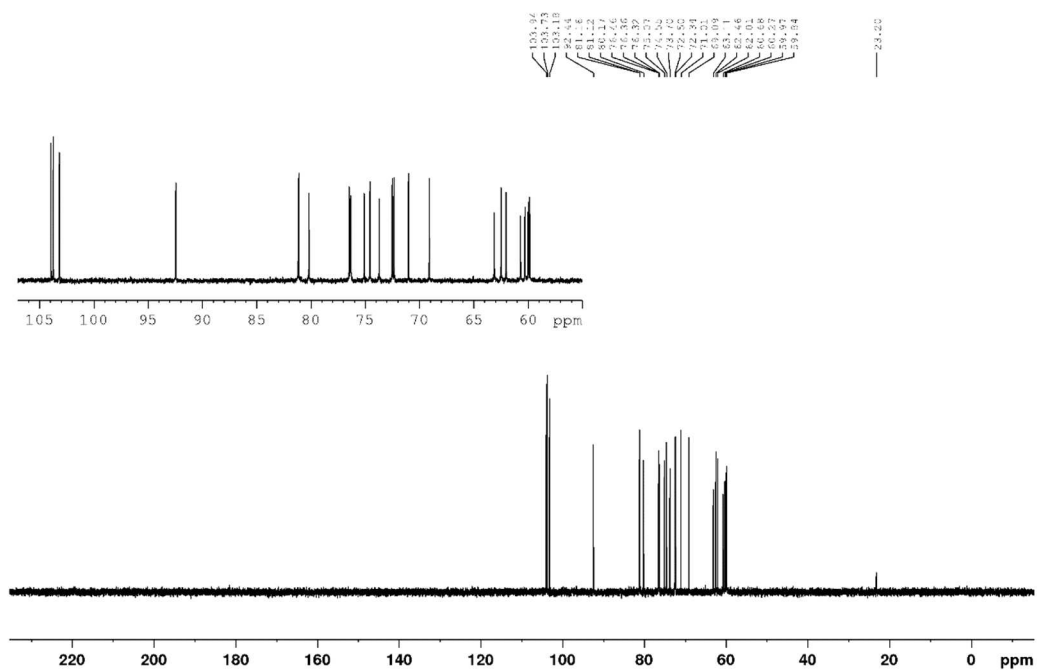


Abbildung 60: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von 6-Nystose.^[159]

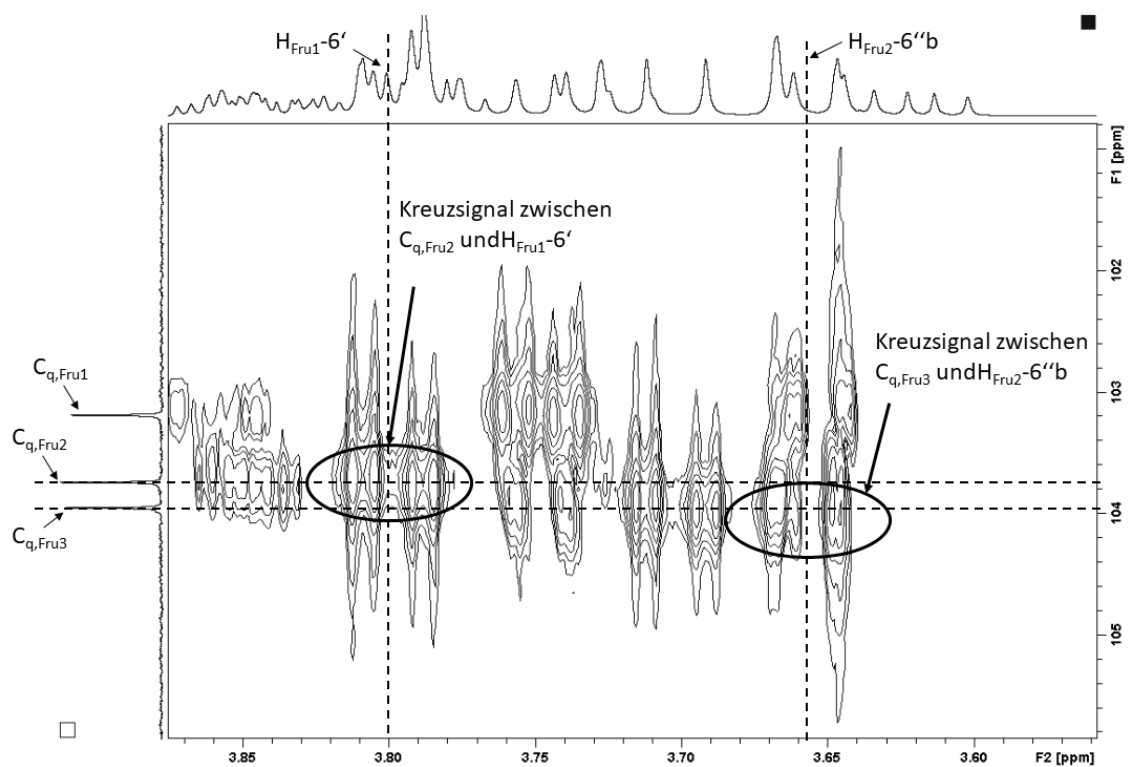


Abbildung 61: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der 6-Nystose.^[159]

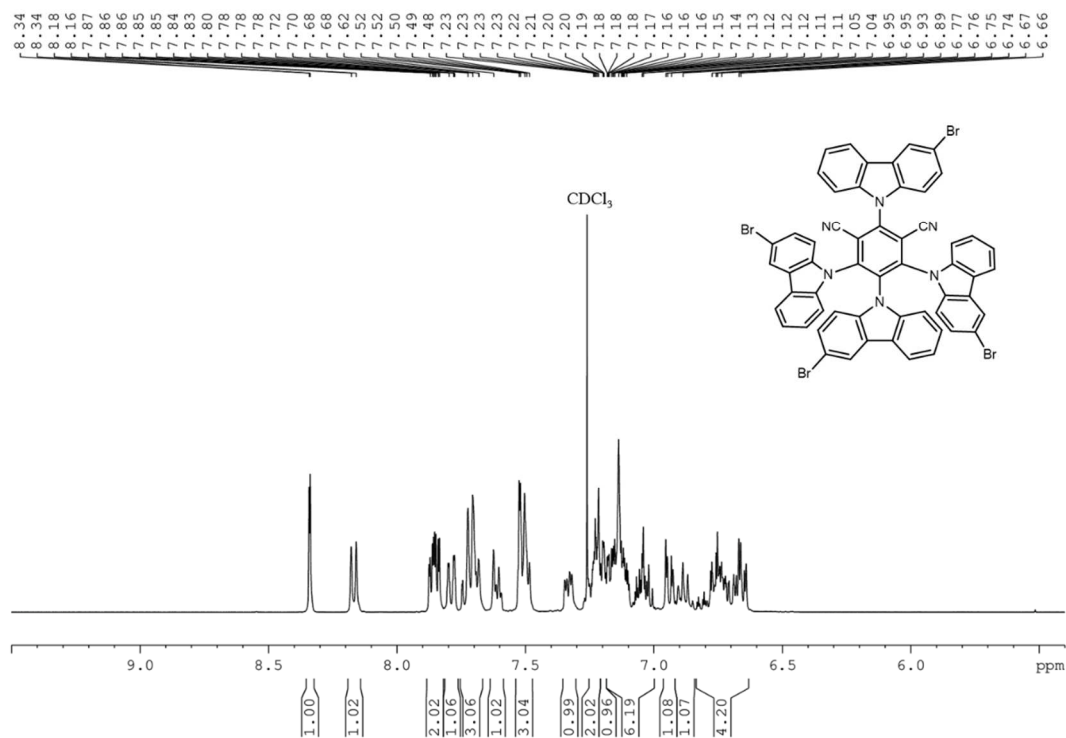


Abbildung 62: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung 7.

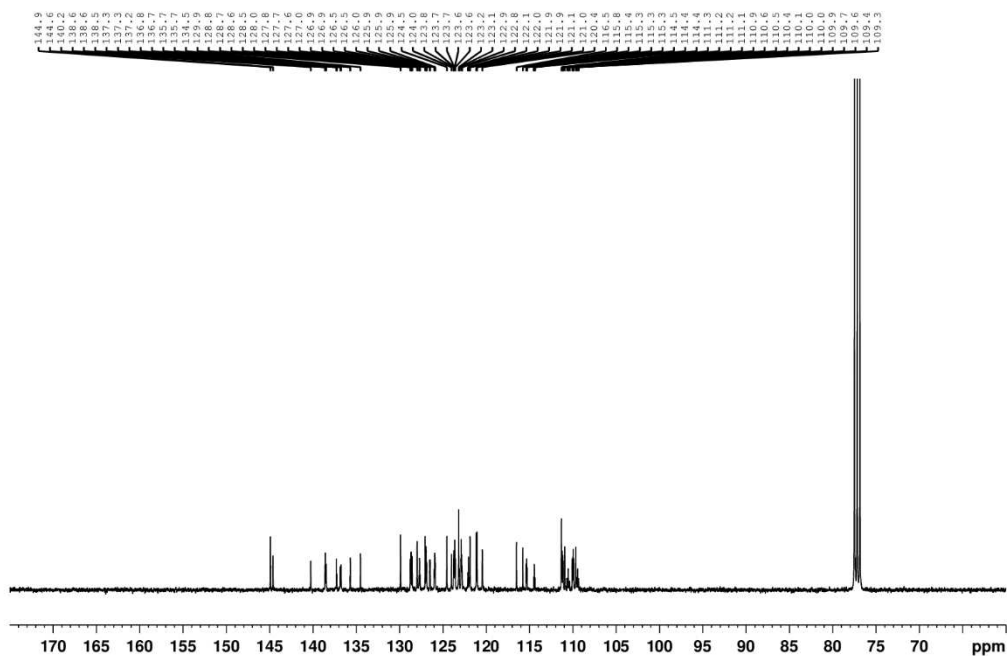
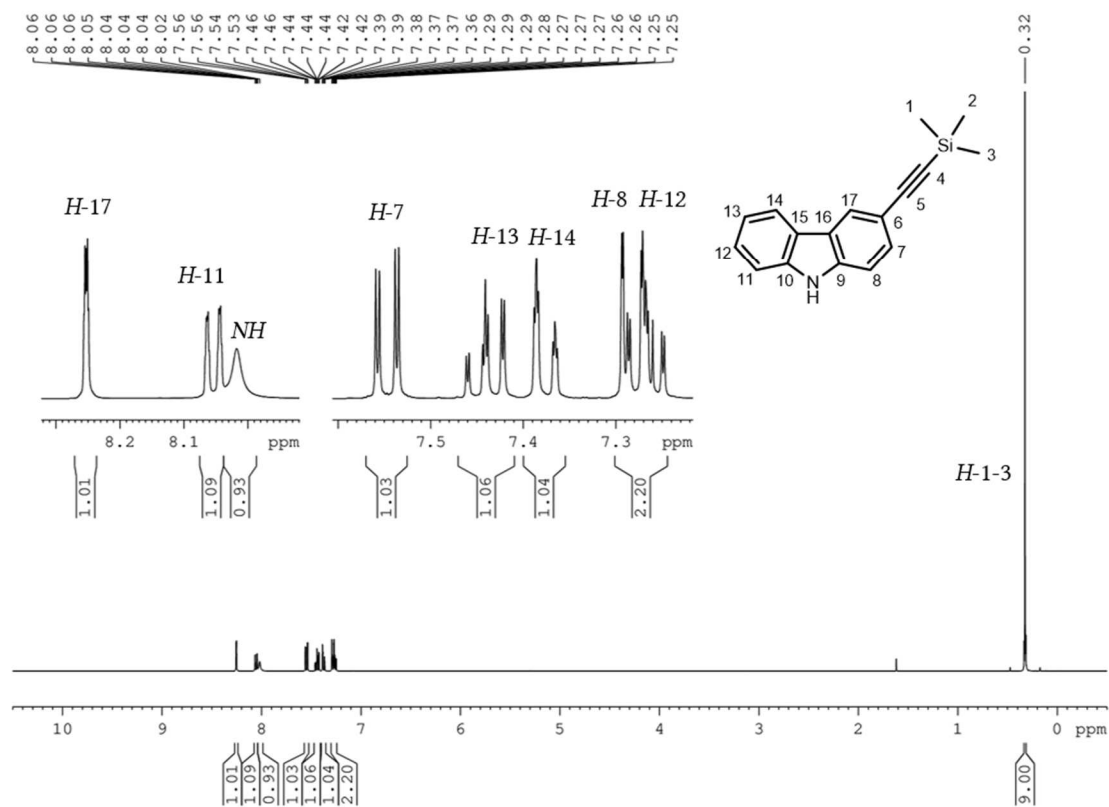
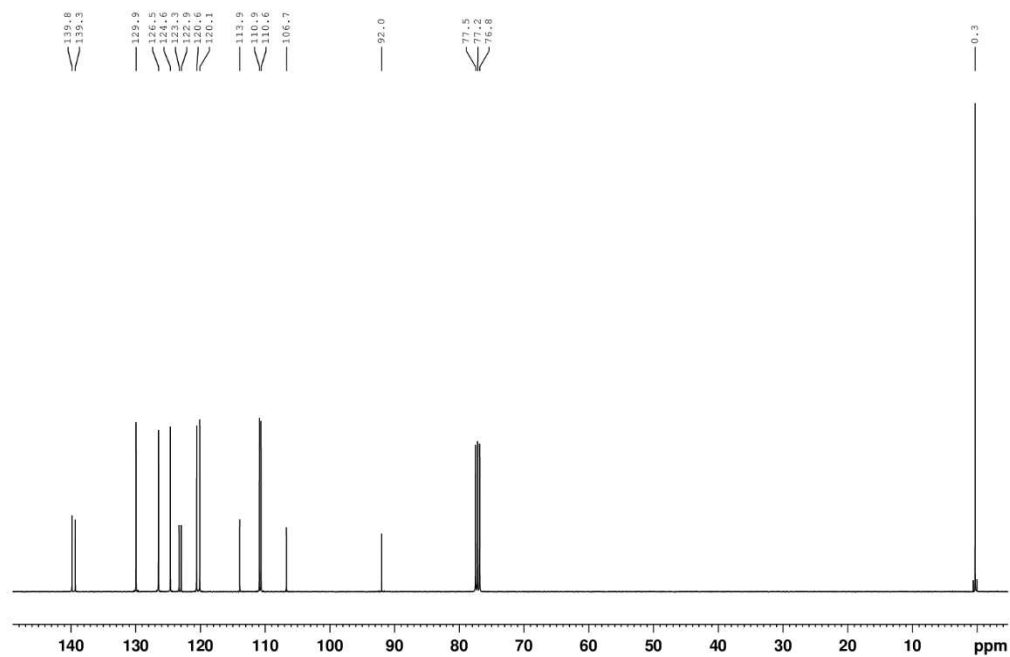


Abbildung 63: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von Verbindung 7.

Abbildung 64: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung **8**.Abbildung 65: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl₃) von Verbindung **8**.

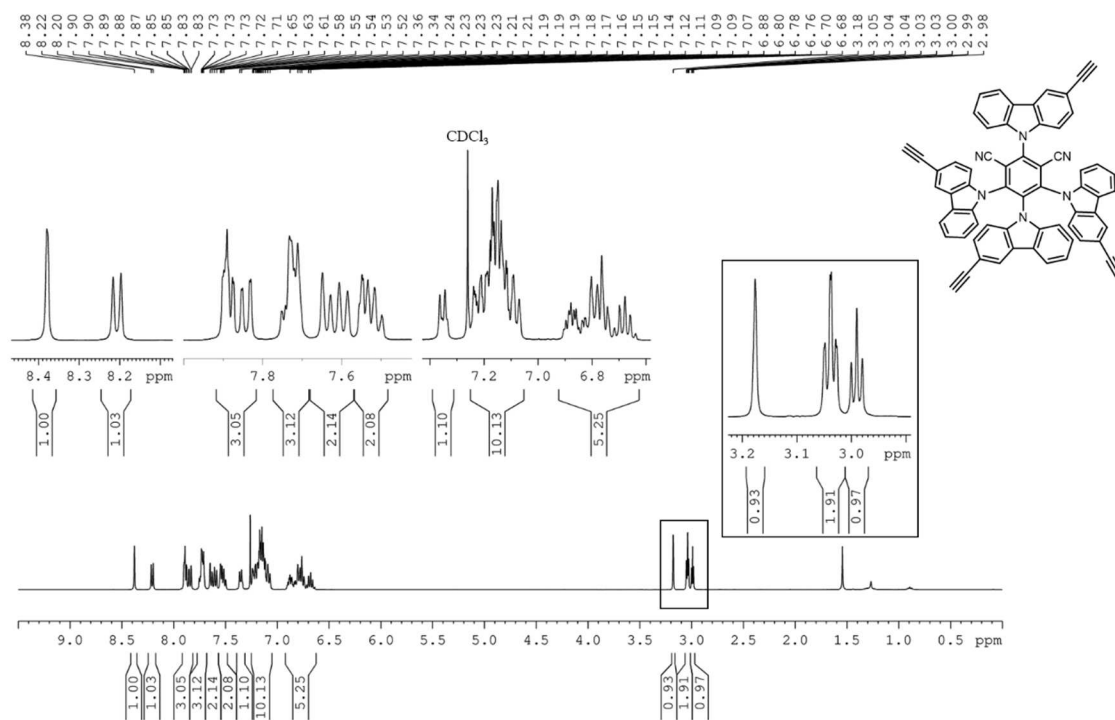


Abbildung 66: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung 9.

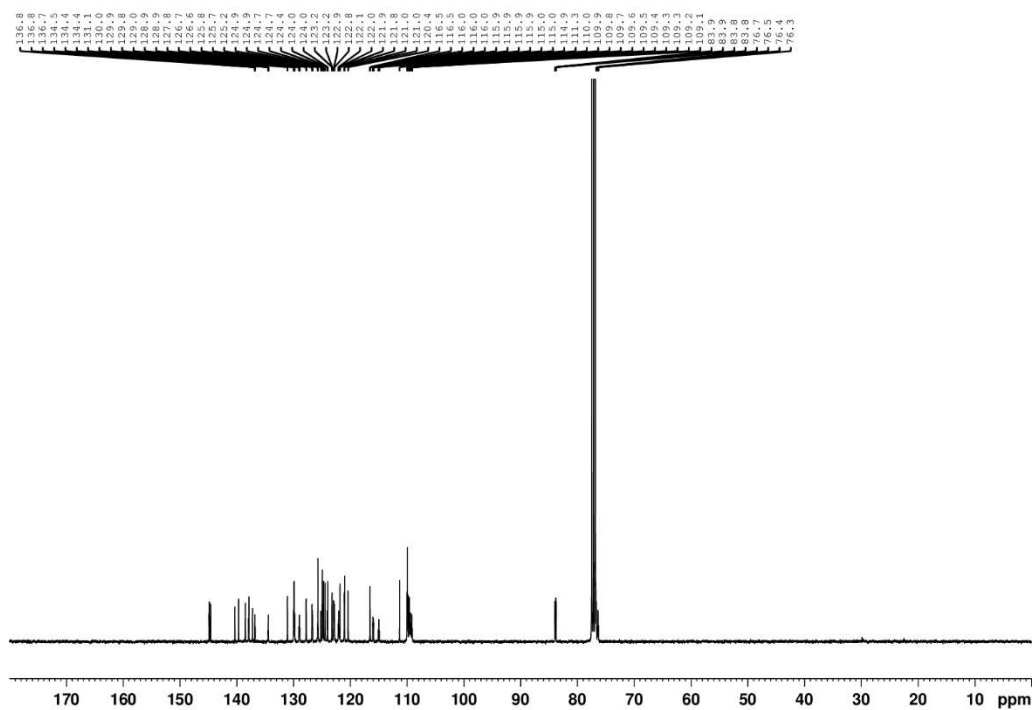
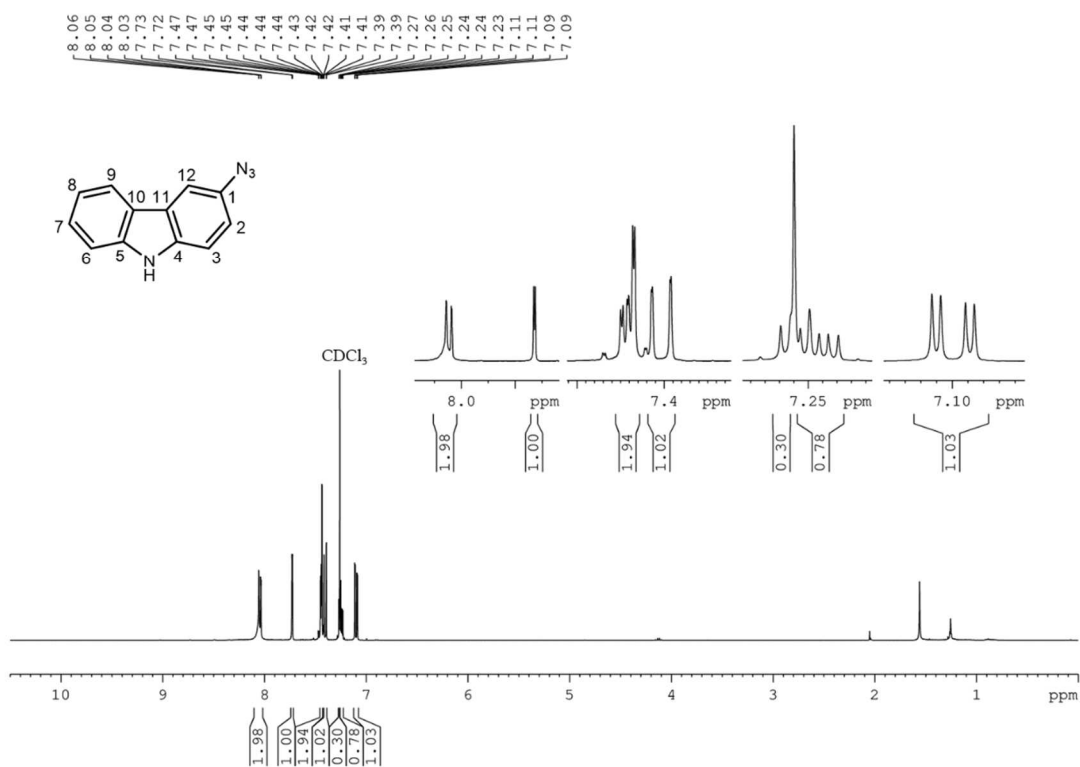
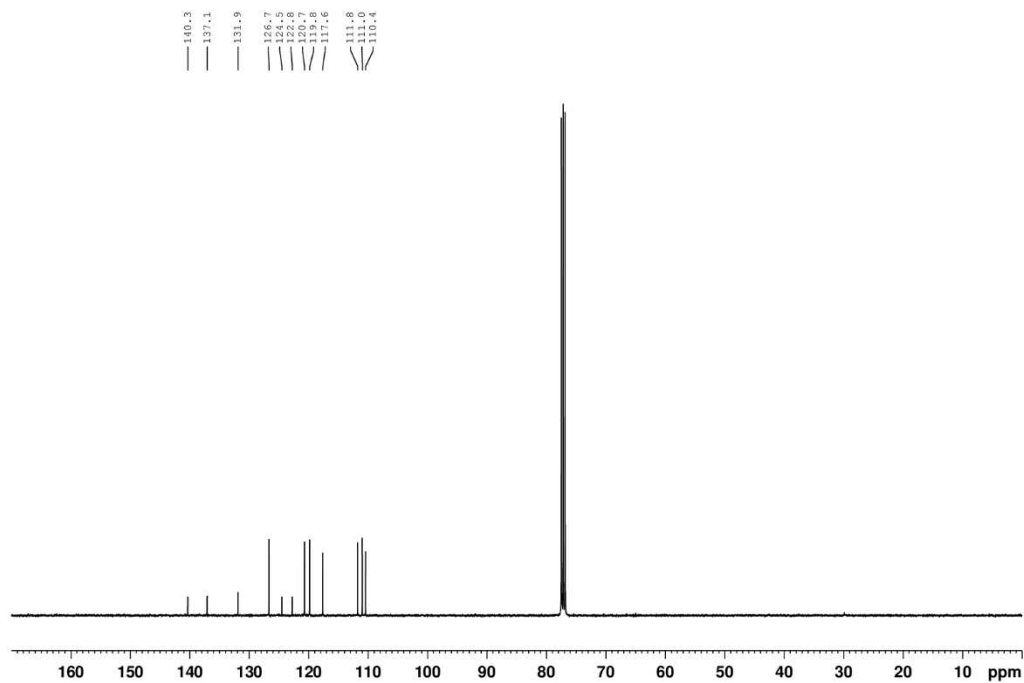


Abbildung 67: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl₃) von Verbindung 9.

Abbildung 68: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung **10**.Abbildung 69: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl₃) von Verbindung **10**.

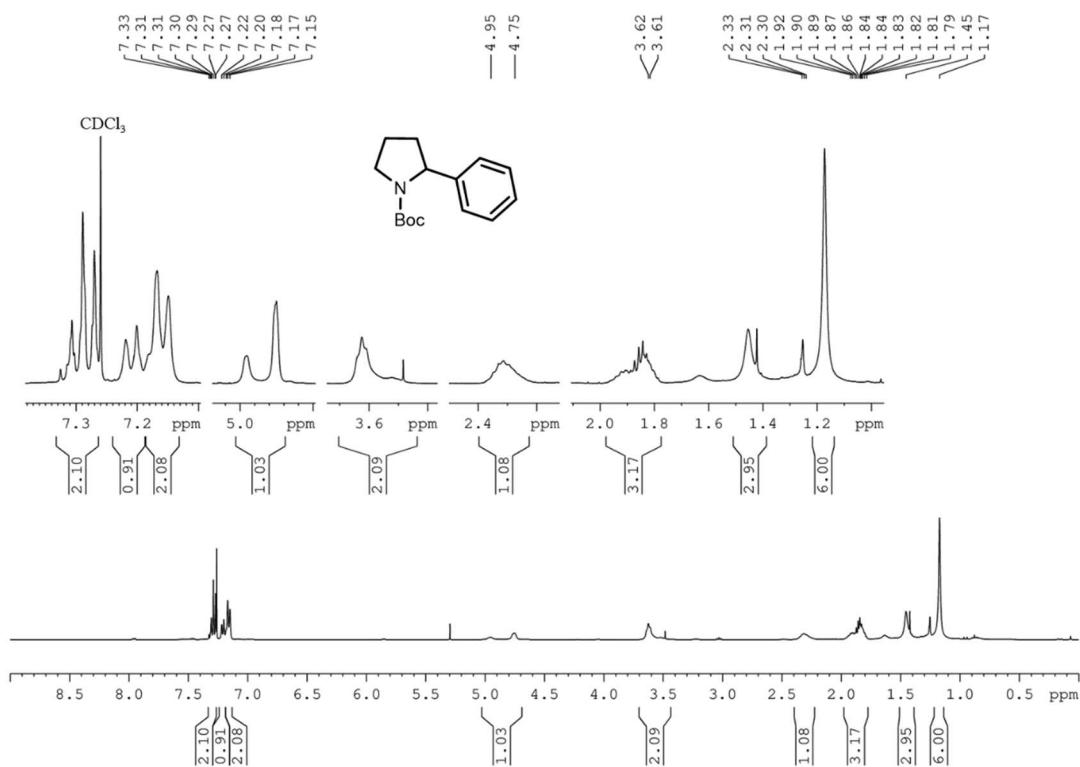


Abbildung 70: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung **21**.

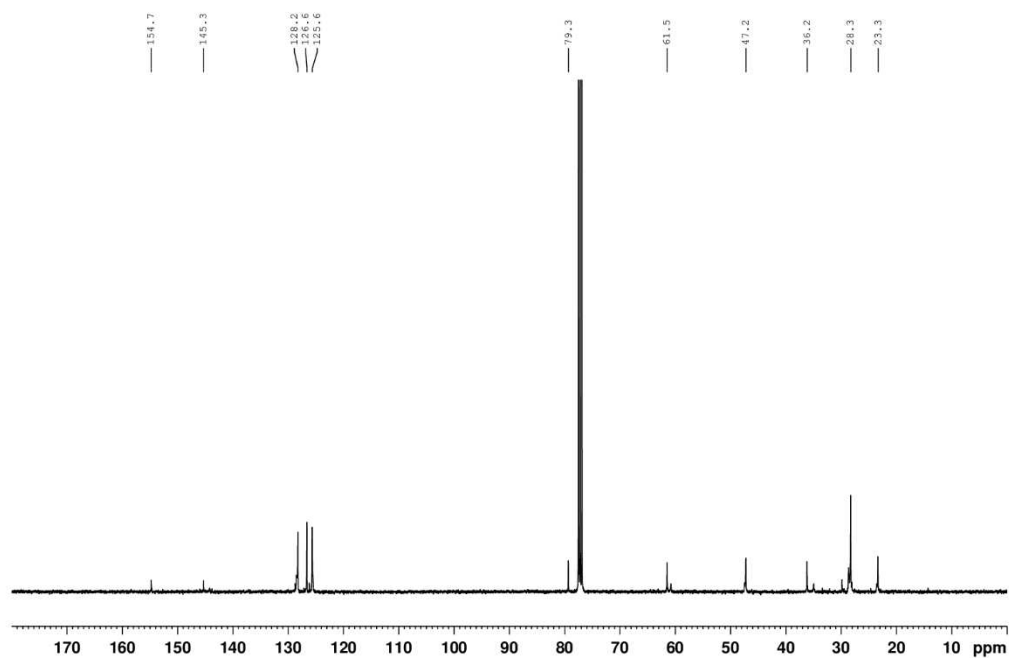


Abbildung 71: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl₃) von Verbindung **21**.

Massenspektrometrie

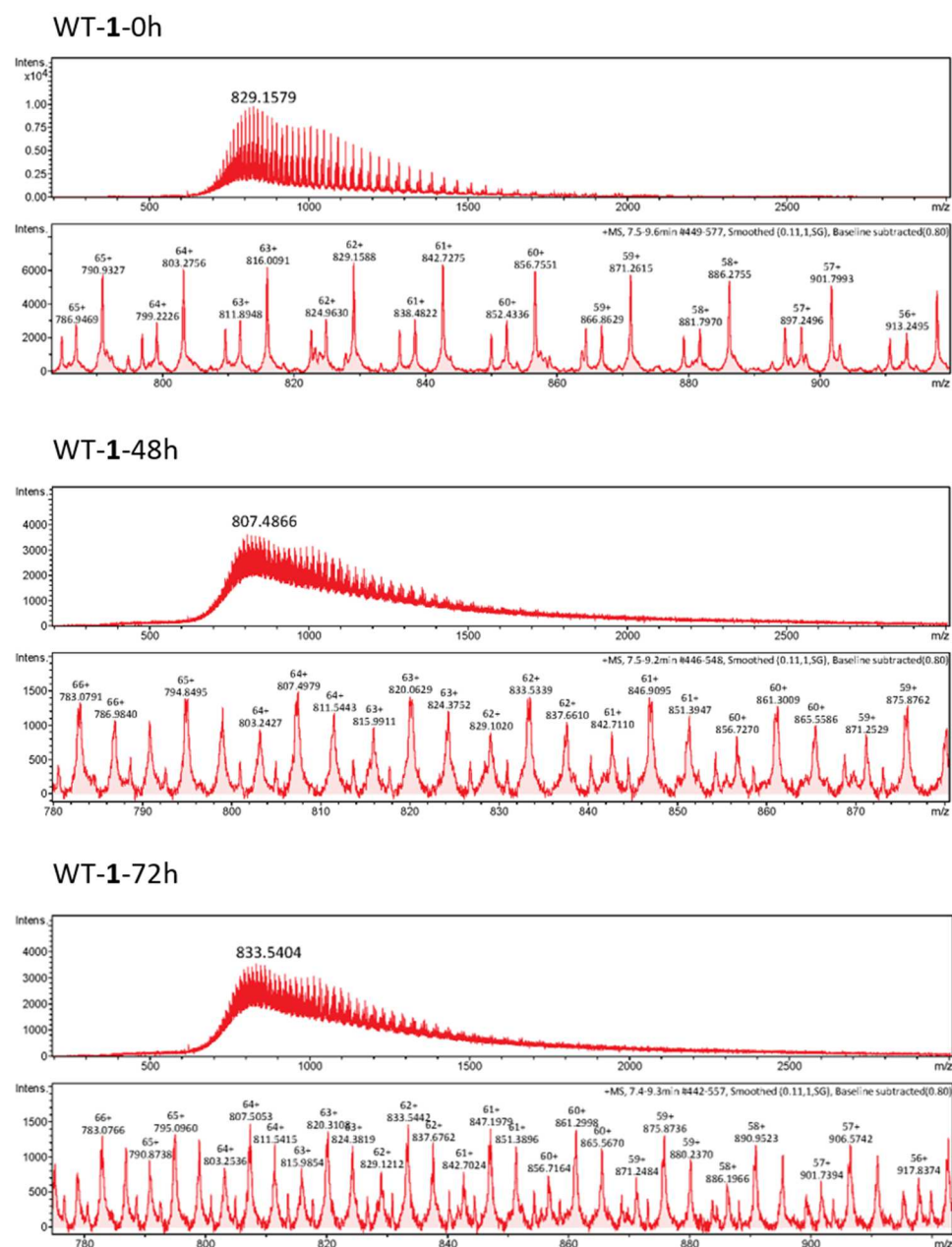


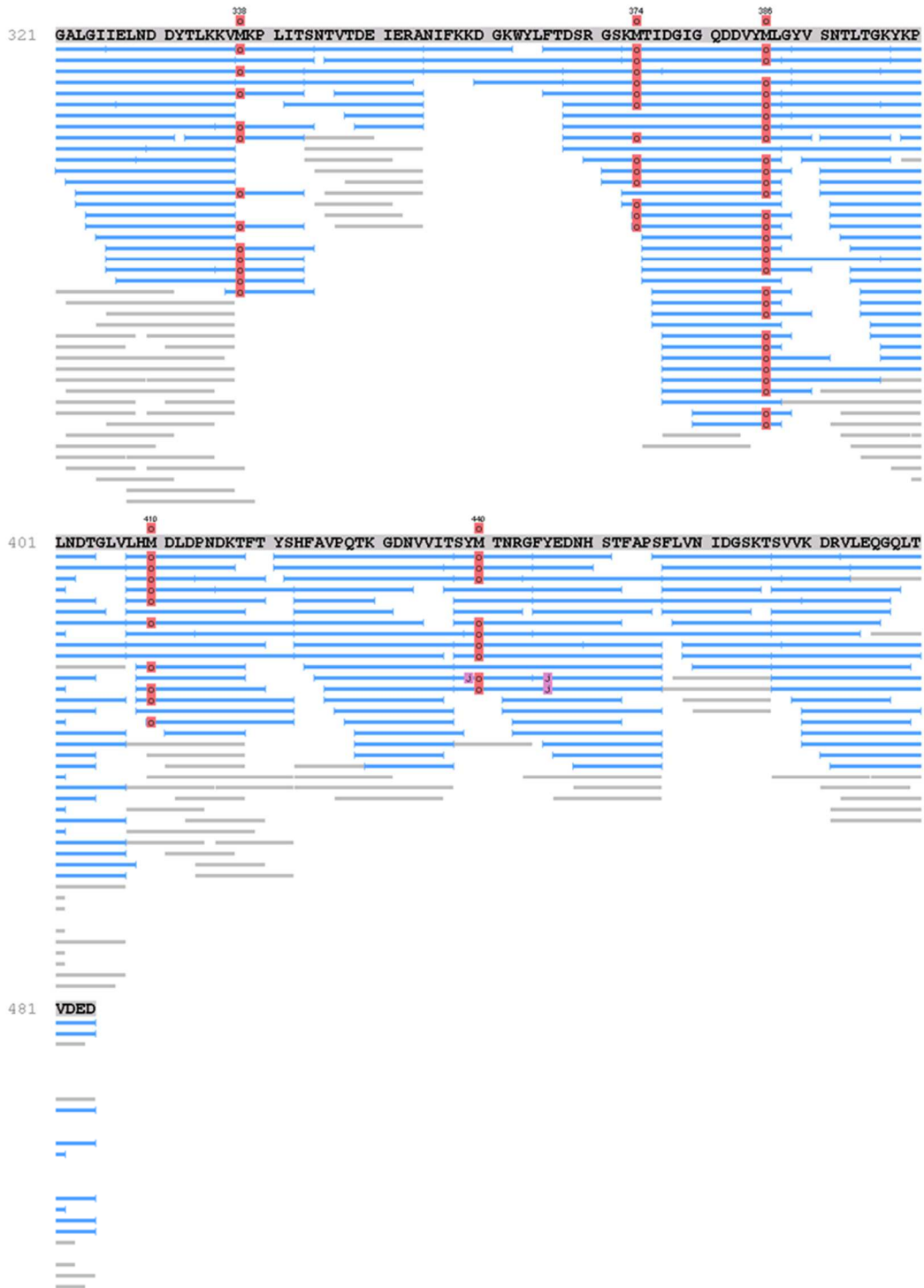
Abbildung 72: Massenspektren der Tyrosin-Modifikations-Reaktion der WT *Bm*-Levansucrase und der Luminol-Verbindung **1** nach 0, 48 und 72 Stunden.



Abbildung 73: NanoLC-MS/MS Analyse des Elastase verdauten Wildtyps der *Bm*-Levansucrase. Das Enzym wurde mit dem Luminol-Derivat **1** modifiziert, das in dieser Darstellung als J2 bezeichnet wird. (Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite)



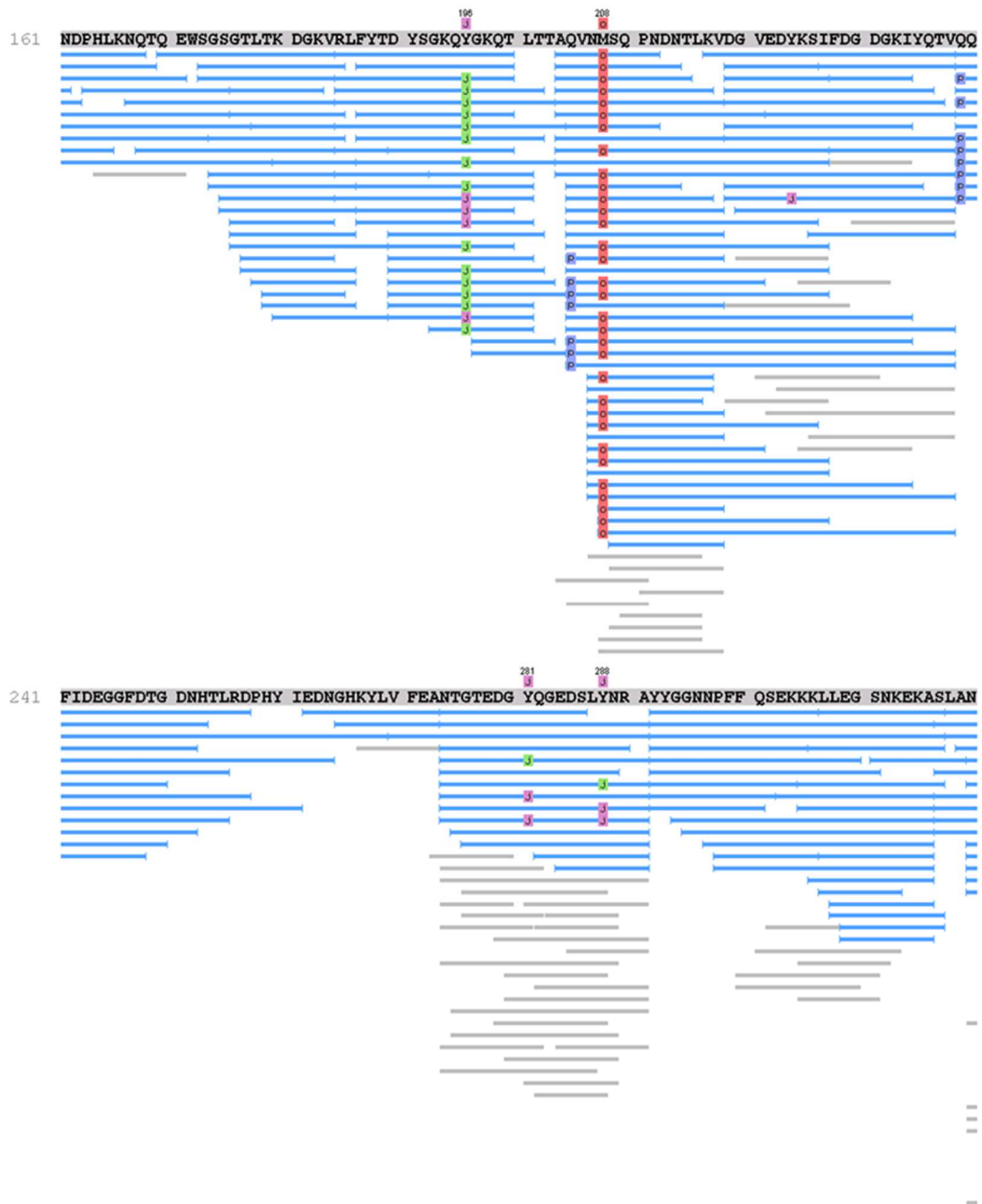
NanoLC-MS/MS Analyse des Elastase verdauten Wildtyps der *Bm*-Levansucrase. Das Enzym wurde mit dem Luminol-Derivat **1** modifiziert, das in dieser Darstellung als J2 bezeichnet wird. (Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite)



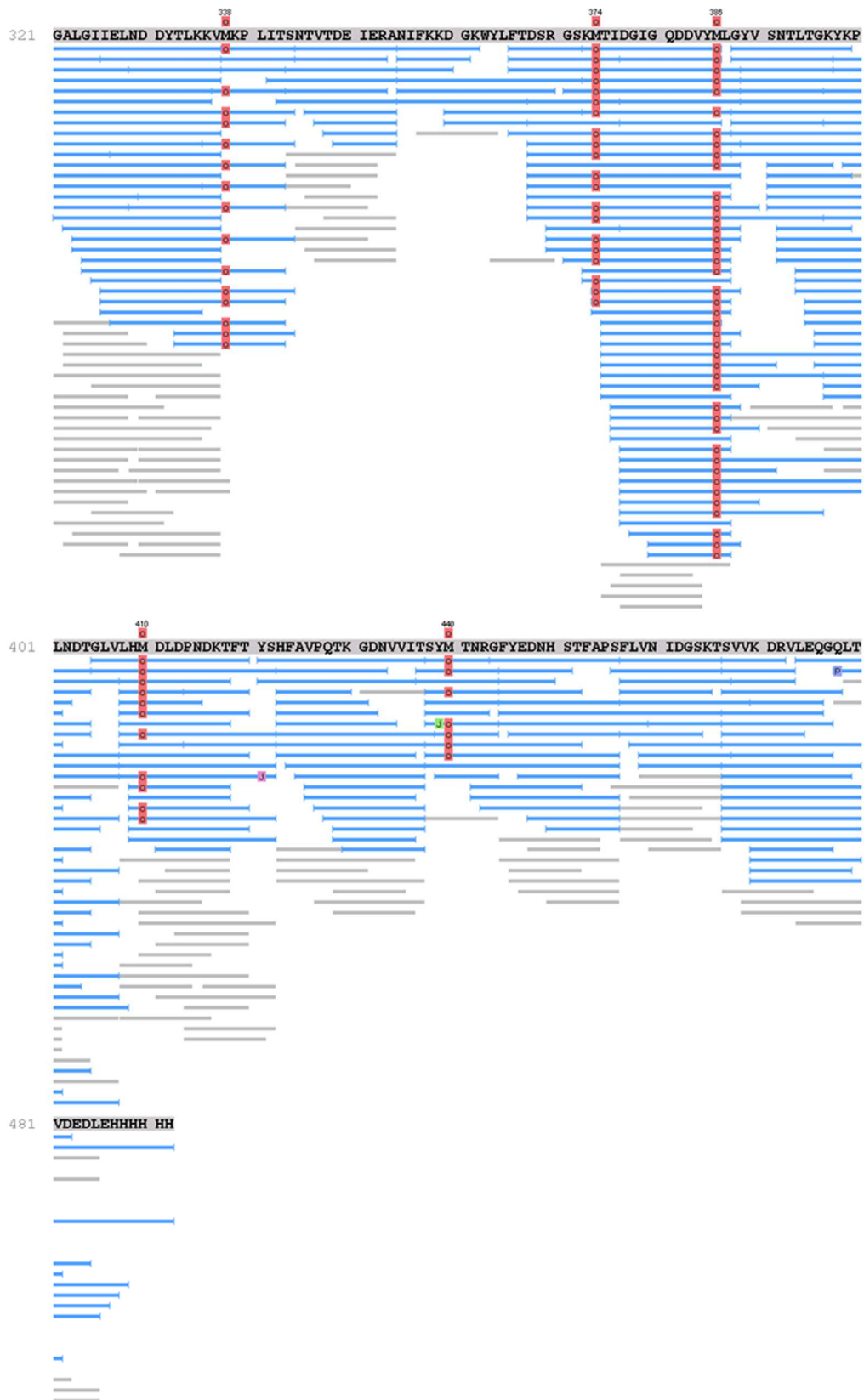
NanoLC-MS/MS Analyse des Elastase verdauten Wildtyps der *Bm*-Levansucrase. Das Enzym wurde mit dem Luminol-Derivat **1** modifiziert, das in dieser Darstellung als **J2** bezeichnet wird.



Abbildung 74: NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante Y247F-1-AzGlc. Die erste Modifikation mit Luminol-Derivat **1** ist in der Abbildung als pinkes „J“ markiert und die zweite Modifikation mit AzGlc als grünes „J“. (Fortsetzung folgt auf nächster Seite)



NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante Y247F-1-AzGlc. Die erste Modifikation mit Luminol-Derivat **1** ist in der Abbildung als pinkes „1“ markiert und die zweite Modifikation mit AzGlc als grünes „J“. (Fortsetzung folgt auf nächster Seite)



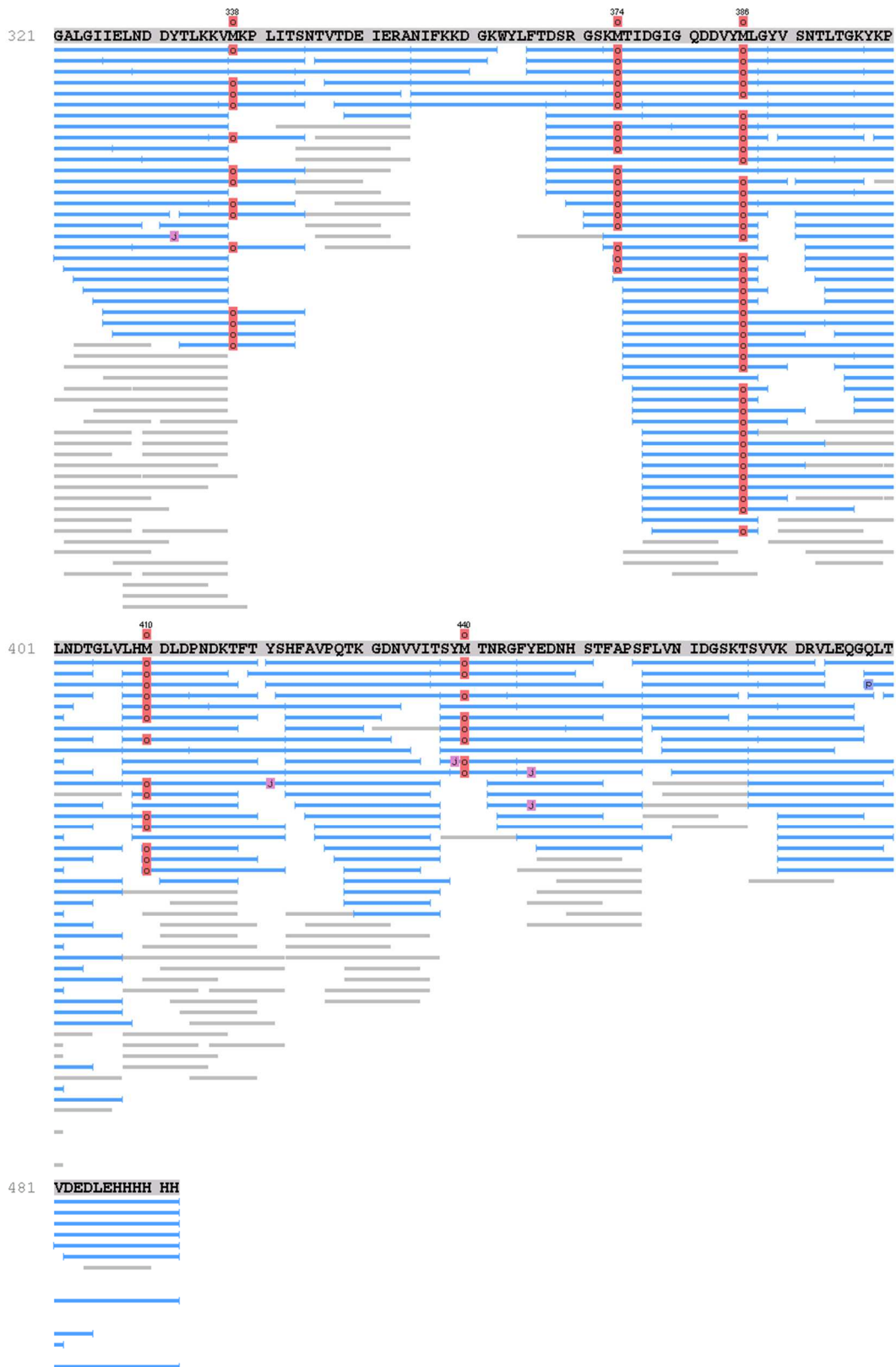
NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante Y247F-1-AzGlc. Die erste Modifikation mit Luminol-Derivat **1** ist in der Abbildung als pinkes „J“ markiert und die zweite Modifikation mit AzGlc als grünes „J“.



Abbildung 75: NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante N126Y-1. Die Modifikationen mit Luminol-Derivat **1** sind in der Abbildung als „J“ markiert. (Fortsetzung folgt auf nächster Seite)



NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante N126Y-1. Die Modifikationen mit Luminol-Derivat **1** sind in der Abbildung als pinkes „J“ markiert. (Fortsetzung folgt auf nächster Seite)



NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante N126Y-1. Die Modifikationen mit Luminol-Derivat **1** sind in der Abbildung als „J“ markiert.

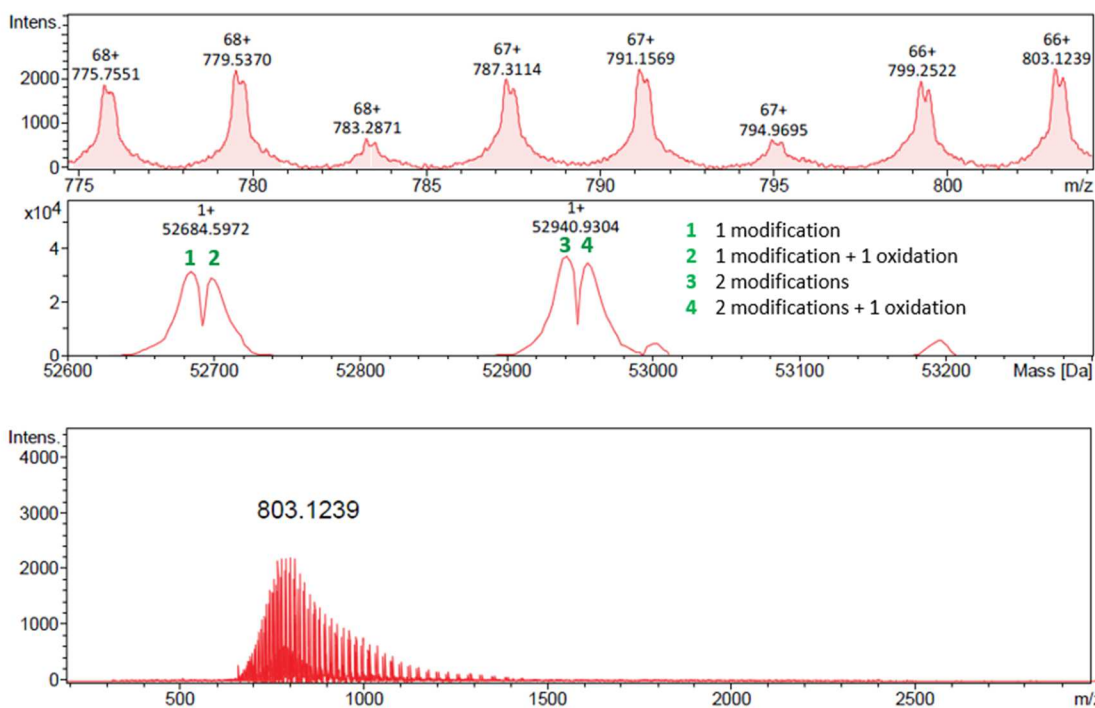


Abbildung 76: Massenspektrum der Tyrosin-Modifikation der Variante N126Y (M=52426.75) mit Luminol-Derivat **1** (M= 258.10).

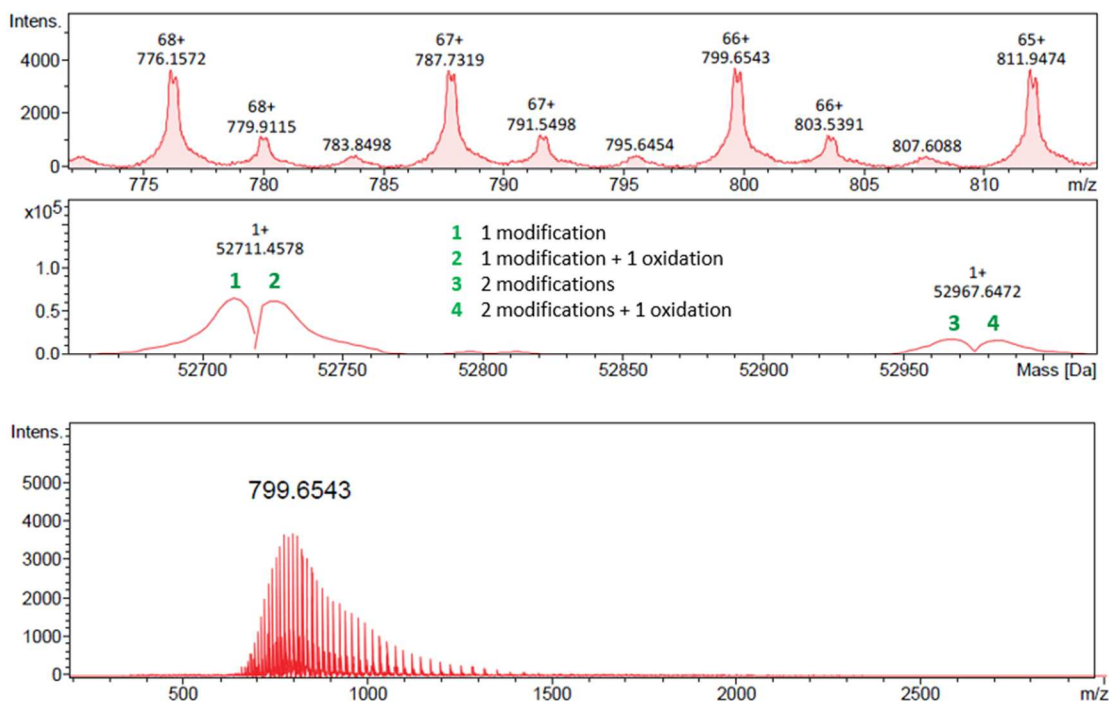


Abbildung 77: Massenspektrum der Tyrosin-Modifikation der Variante S125Y (M=52453.78) mit Luminol-Derivat **1** (M= 258.10).

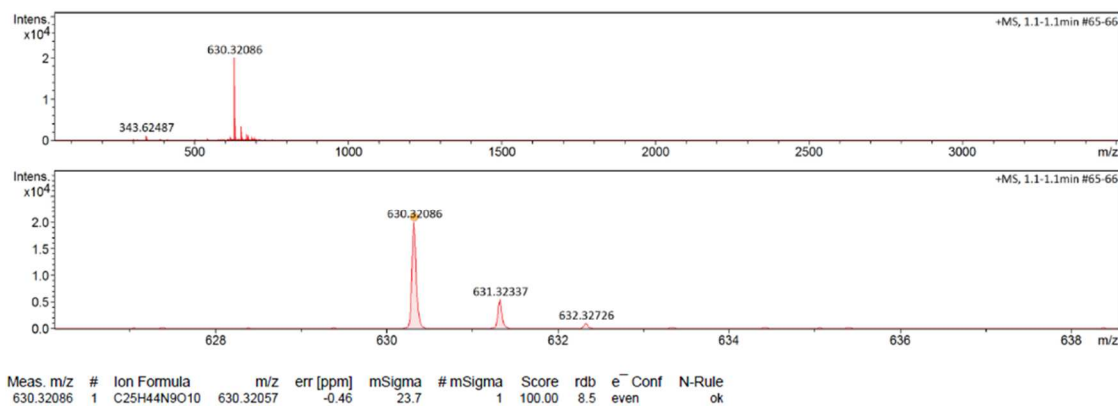


Abbildung 78: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 15.

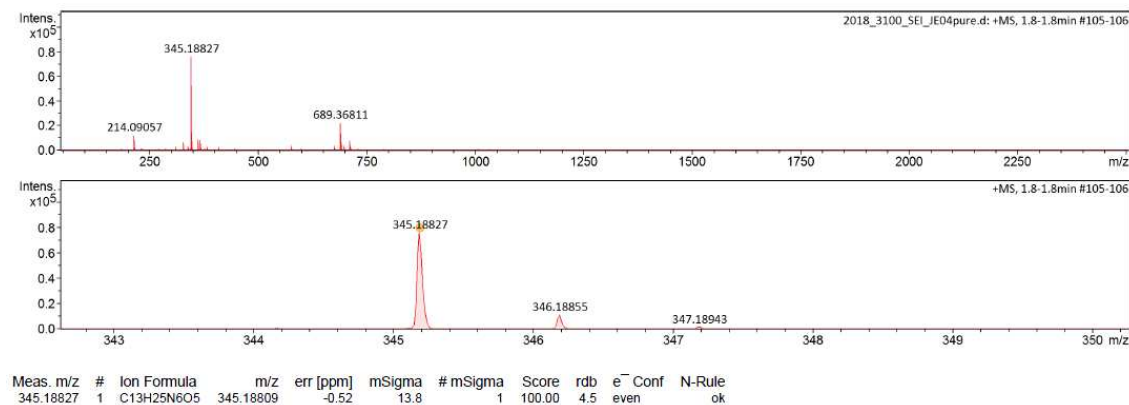


Abbildung 79: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 2.

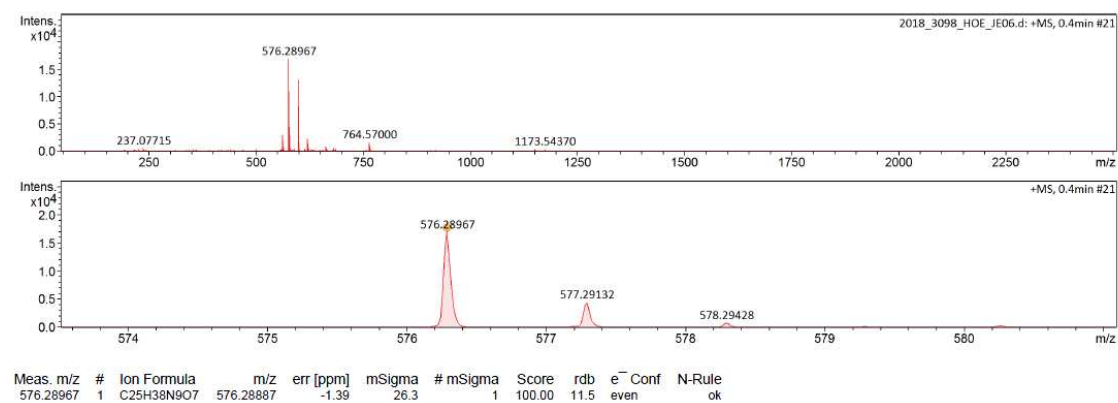


Abbildung 80: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 3.

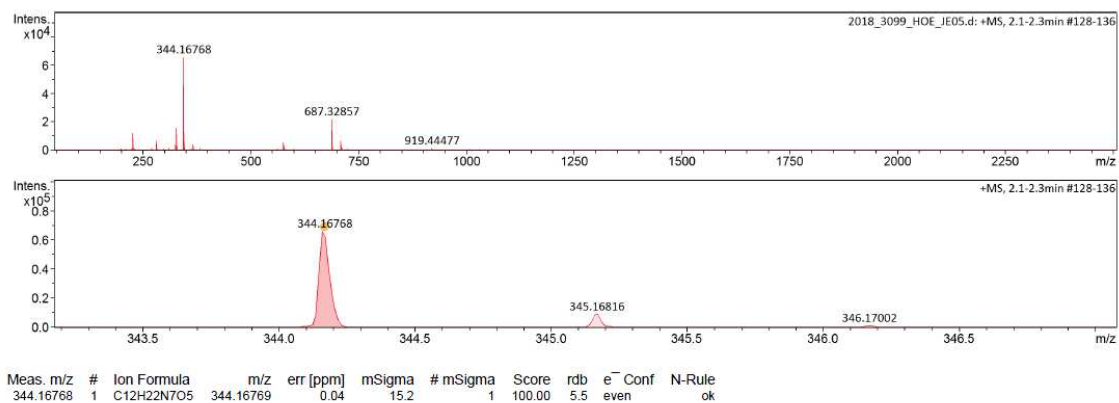


Abbildung 81: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 4.

+MS, 0.2-2.5min #13-155

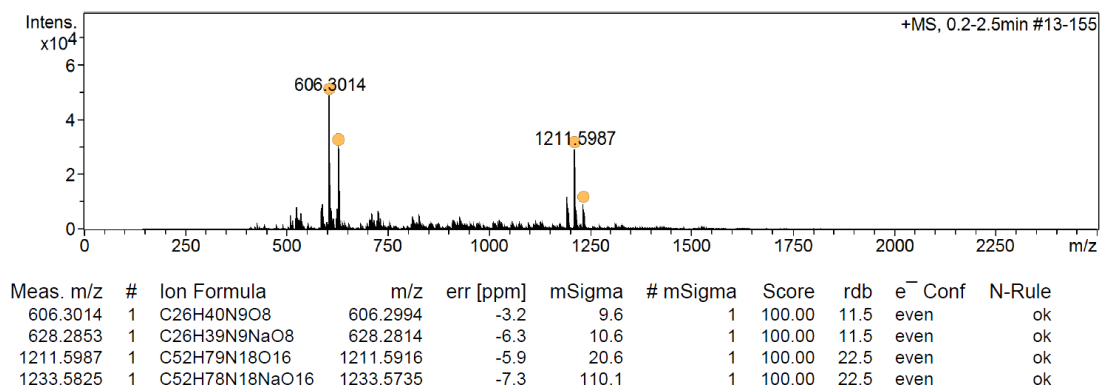


Abbildung 82: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 5.

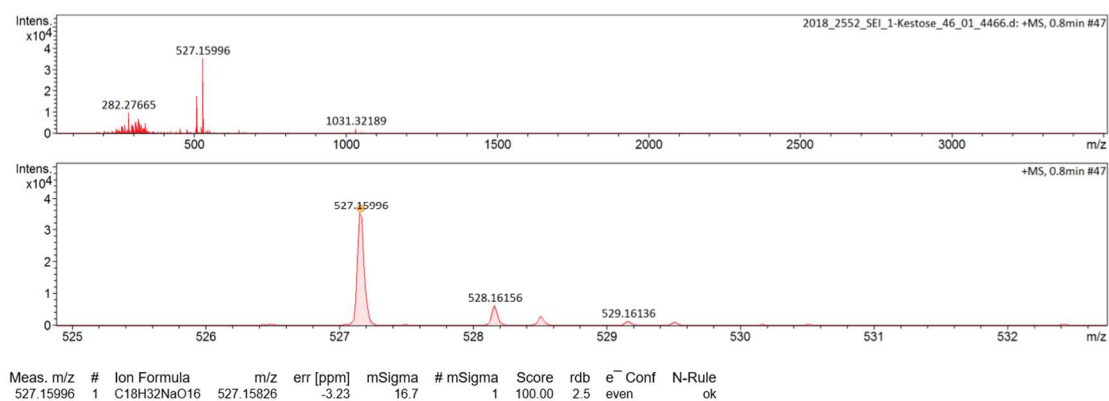


Abbildung 83: Massenspektrum (ESI positiv) von 1-Kestose.

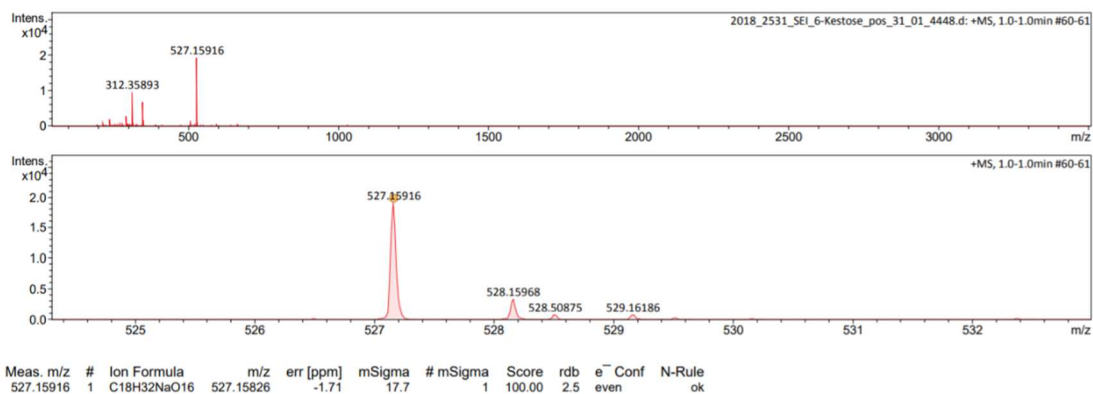


Abbildung 84: Massenspektrum (ESI positiv) von 6-Kestose.

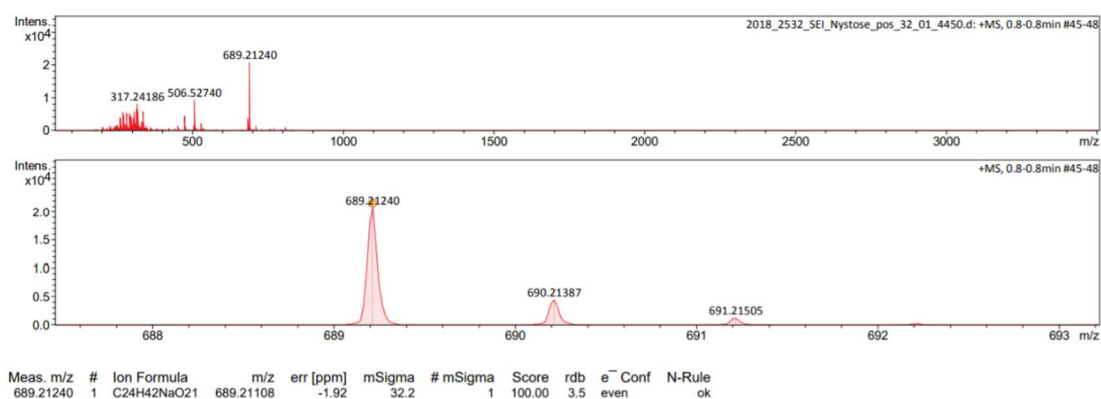


Abbildung 85: Massenspektrum (ESI positiv) von 6-Nystose.

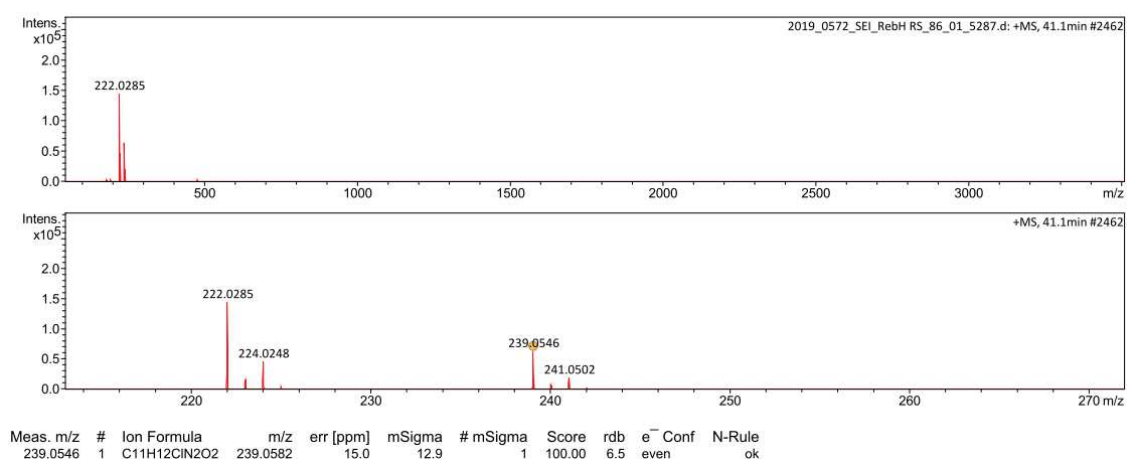


Abbildung 86: Massenspektrum (ESI negativ) von 7-Chloro-Tryptophan.

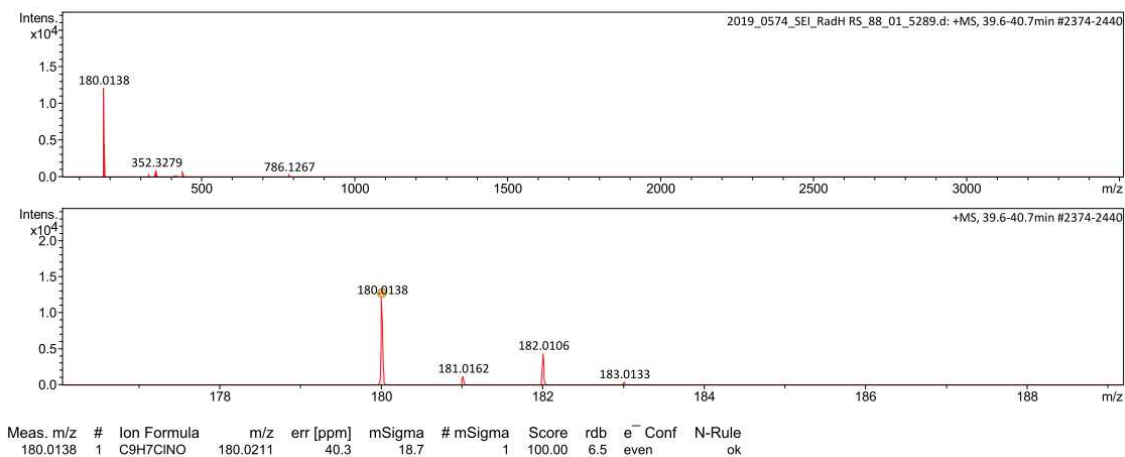


Abbildung 87: Massenspektrum (ESI positiv) von 5-Chloro-6-Hydroxyisochinolin.

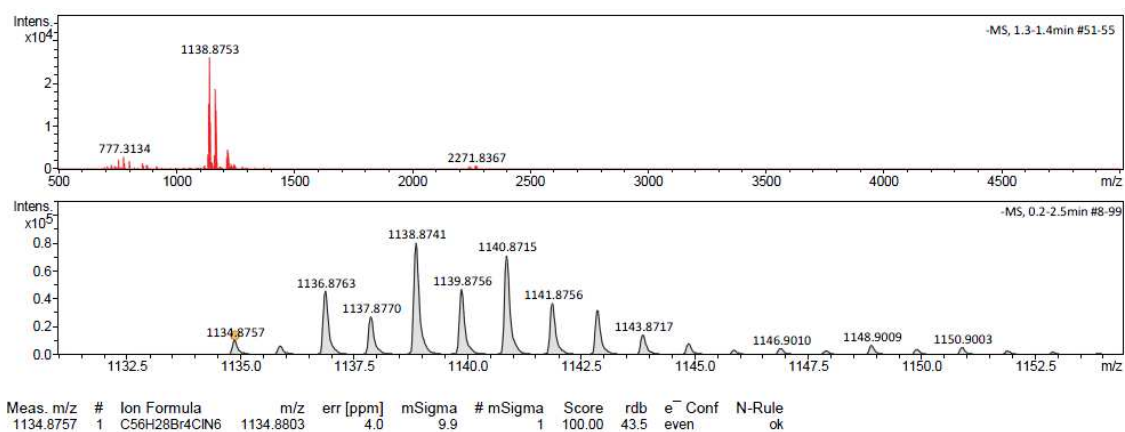


Abbildung 88: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 7.

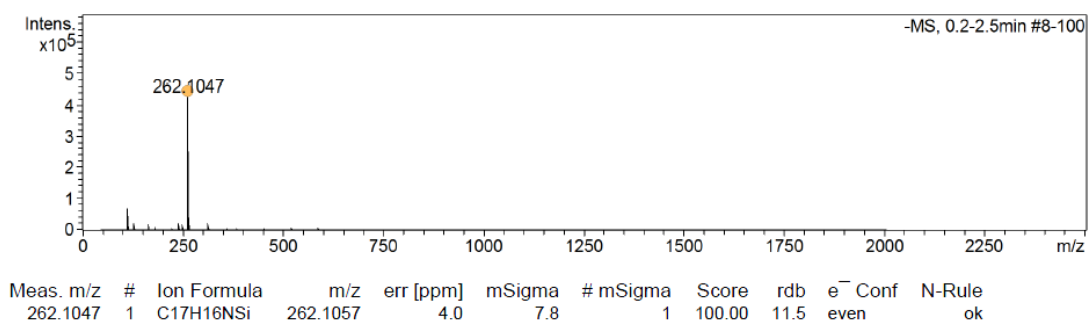


Abbildung 89: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 8.

+MS, 0.2-2.5min #7-77

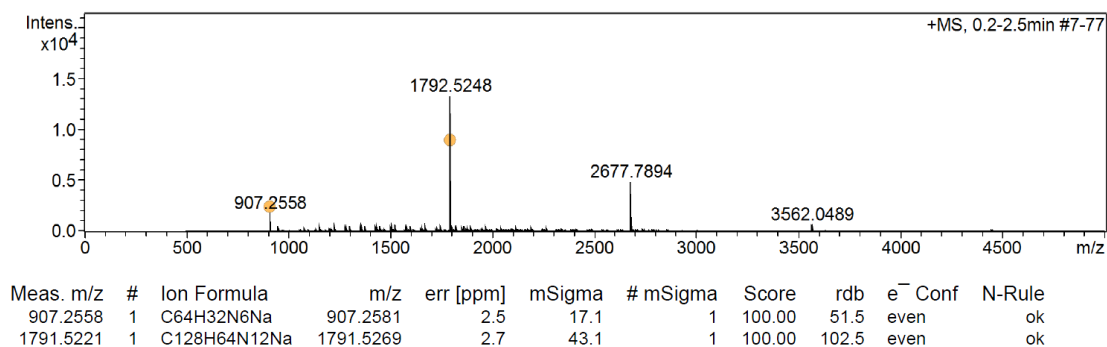


Abbildung 90: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung **9**.

-MS, 0.2-2.5min #8-100

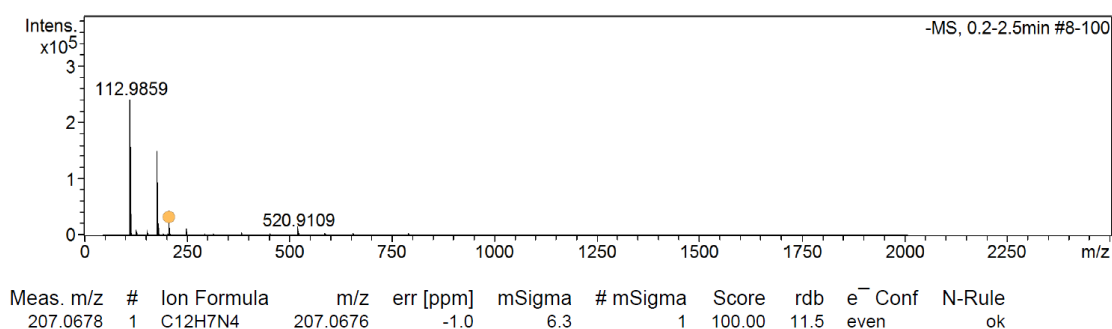


Abbildung 91: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung **10**.

-MS, 0.2-2.5min #8-99

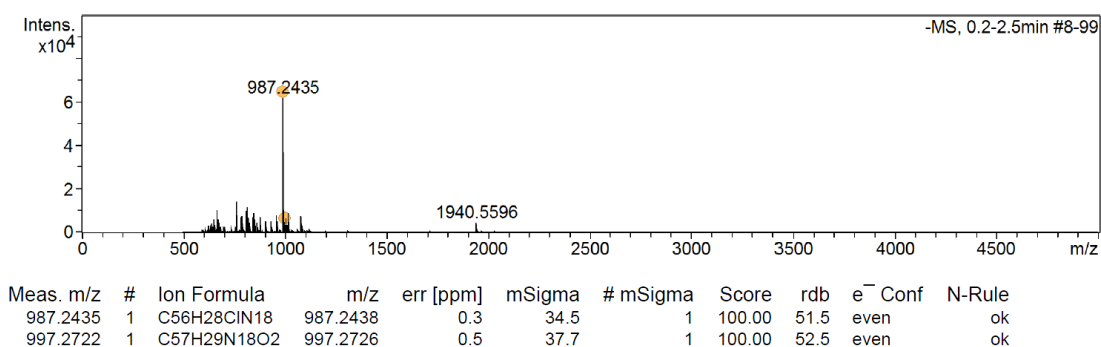


Abbildung 92: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung **11**.

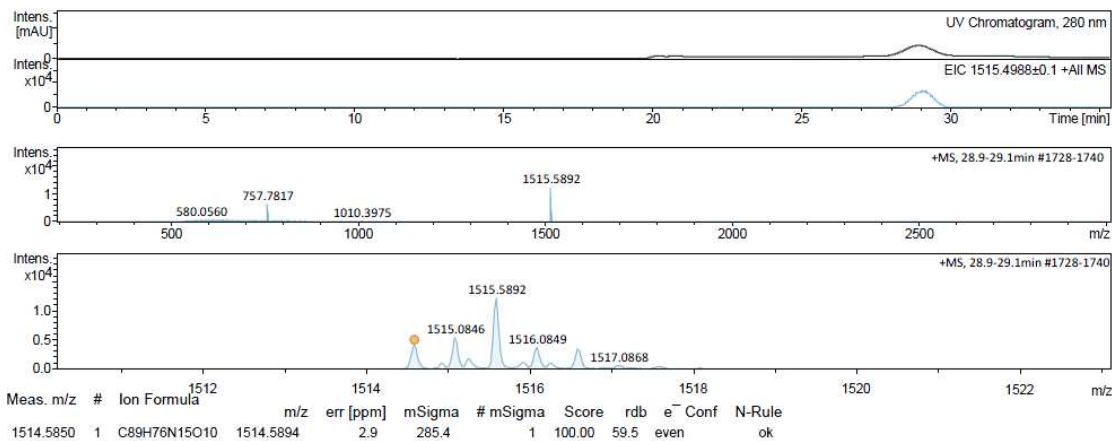


Abbildung 93: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 16.

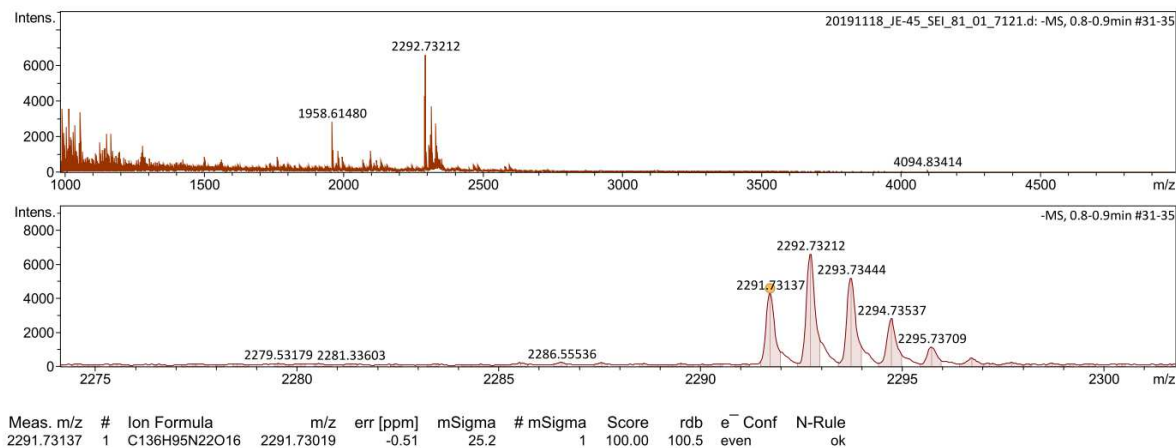


Abbildung 94: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 18.

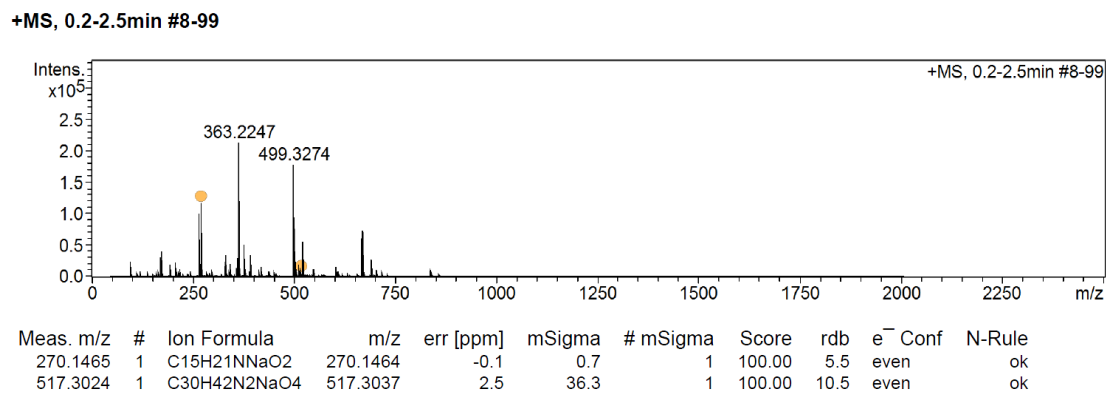


Abbildung 95: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 21.

Biochemische Trennungs-Verfahren (GPC, Dionex HPAEC-PAC)

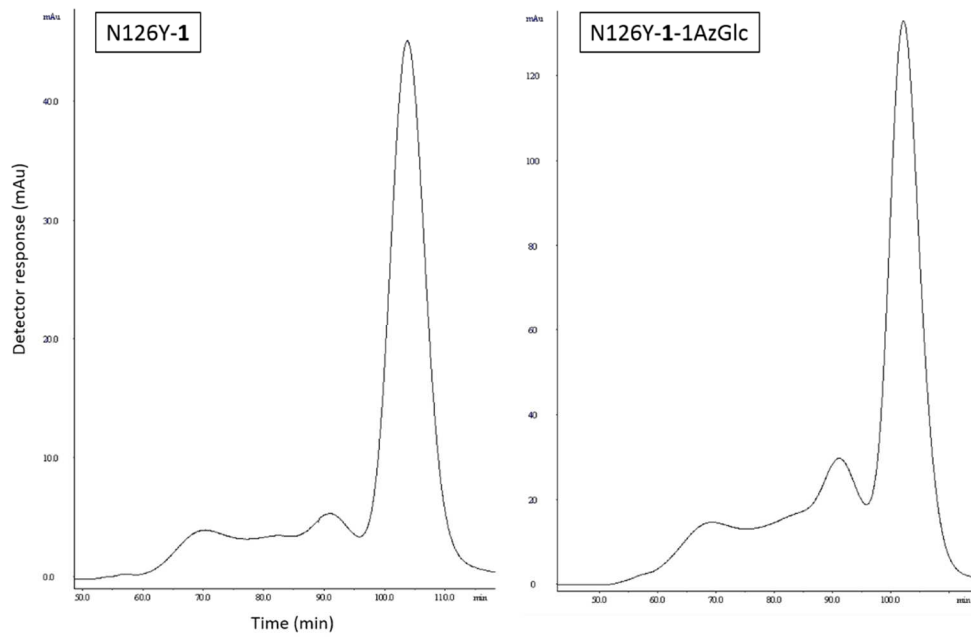


Abbildung 96: Größenausschluss-Chromatographie mit Varianten N126Y-1 und N126Y-1-AzGlc. Protein-Aggregate eluieren von Minute 60-97 und das Protein-Monomer von Minute 98-100.

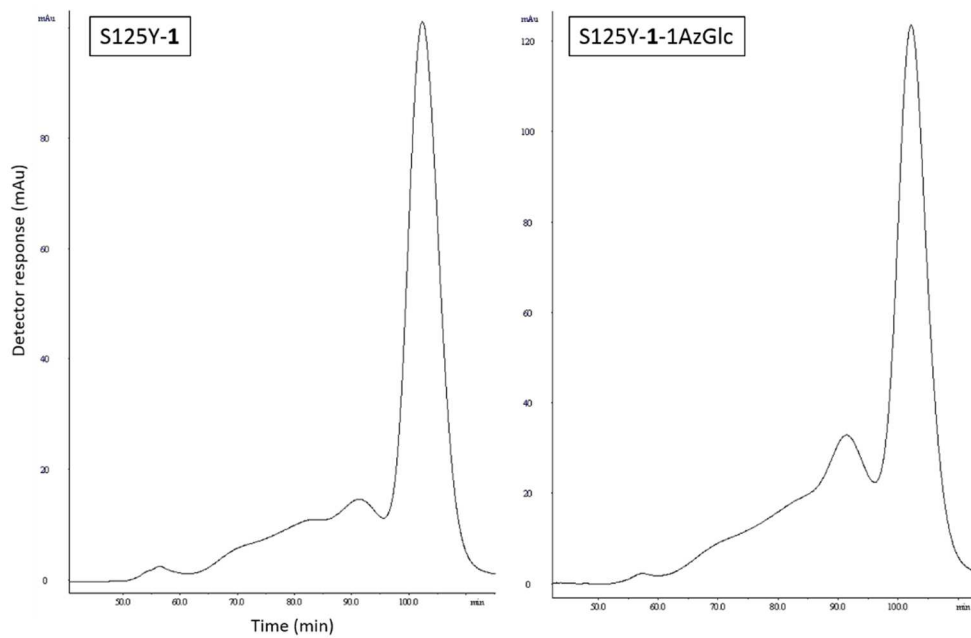


Abbildung 97: Größenausschluss-Chromatographie mit Varianten S125Y-1 und S125Y-1-AzGlc. Protein-Aggregate eluieren von Minute 60-97 und das Protein-Monomer von Minute 98-100.

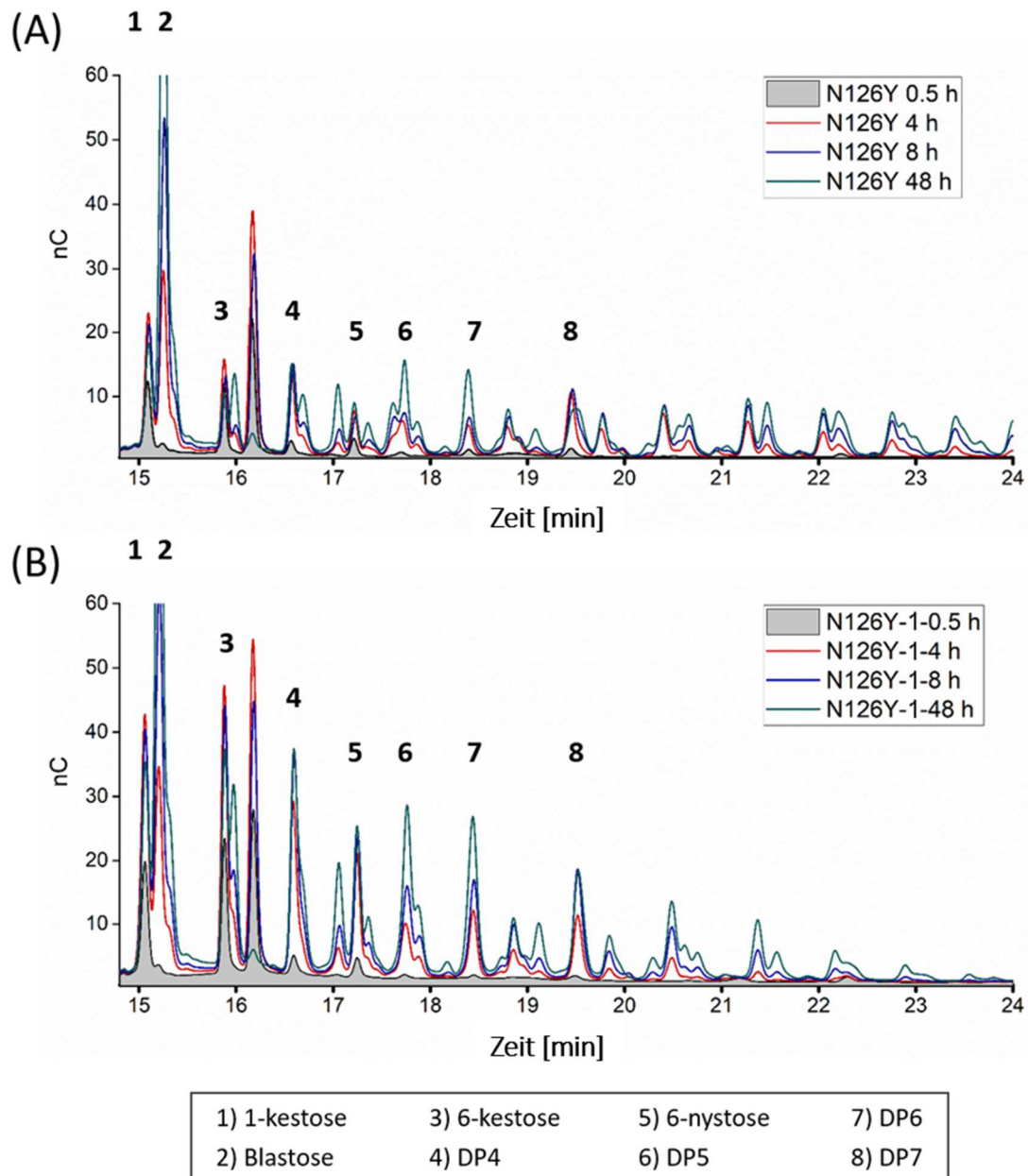


Abbildung 98: HPAEC-PAC-Analyse von Oligosacchariden, die durch die unmodifizierte und modifizierte Variante A) N126Y und B) N126Y-1 über eine Reaktionszeit von 0-48h synthetisiert wurden. Die Reaktionen wurden in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 3 U mL^{-1} enzymatischer Aktivität und 0,5 M Saccharose durchgeführt.

Tabelle 6: Rohdaten der Integrale (nC) nach der HPAEC-PAC-Analyse von Oligosacchariden, die von den unmodifizierten und modifizierten Varianten N126Y und N126Y-1 bei 20 °C und 37 °C und einer Reaktionszeit von 48 h synthetisiert wurden. Die Werte in Klammern zeigen die Zunahme/Abnahme (in Prozent) der Oligosaccharide, die von der chemisch modifizierten Variante synthetisiert wurden. Die integrierte Fläche jedes Oligosaccharid-Peaks der unmodifizierten Variante, wurde auf 100 % gesetzt. Dieser Wert wurde von der relativen Fläche desselben Produkts, das von der modifizierten Mutante synthetisiert wurde, abgezogen.

	37 °C		20 °C	
	N126Y (nC)	N126Y-1 (nC)	N126Y (nC)	N126Y-1 (nC)
1. 1-Kestose	1,38	2,32 (89 %)	0,64	1,26 (89 %)
2. Blastose	19,75	15,55 (-21 %)	18,51	17,76 (- 4 %)
3. 6-Kestose	0,74	2,14 (189 %)	0,17	1,16 (566 %)
4. DP4	1,00	2,73 (171 %)	0,43	1,62 (274 %)
5. 6-Nystose	0,63	1,66 (164 %)	0,13	1,26 (879 %)
6. DP5	1,33	2,52 (90 %)	0,66	1,50 (127 %)
7. DP6	0,97	1,88 (94 %)	0,72	2,43 (240 %)
8. DP7	1,04	2,04 (97 %)	0,69	2,33 (237 %)

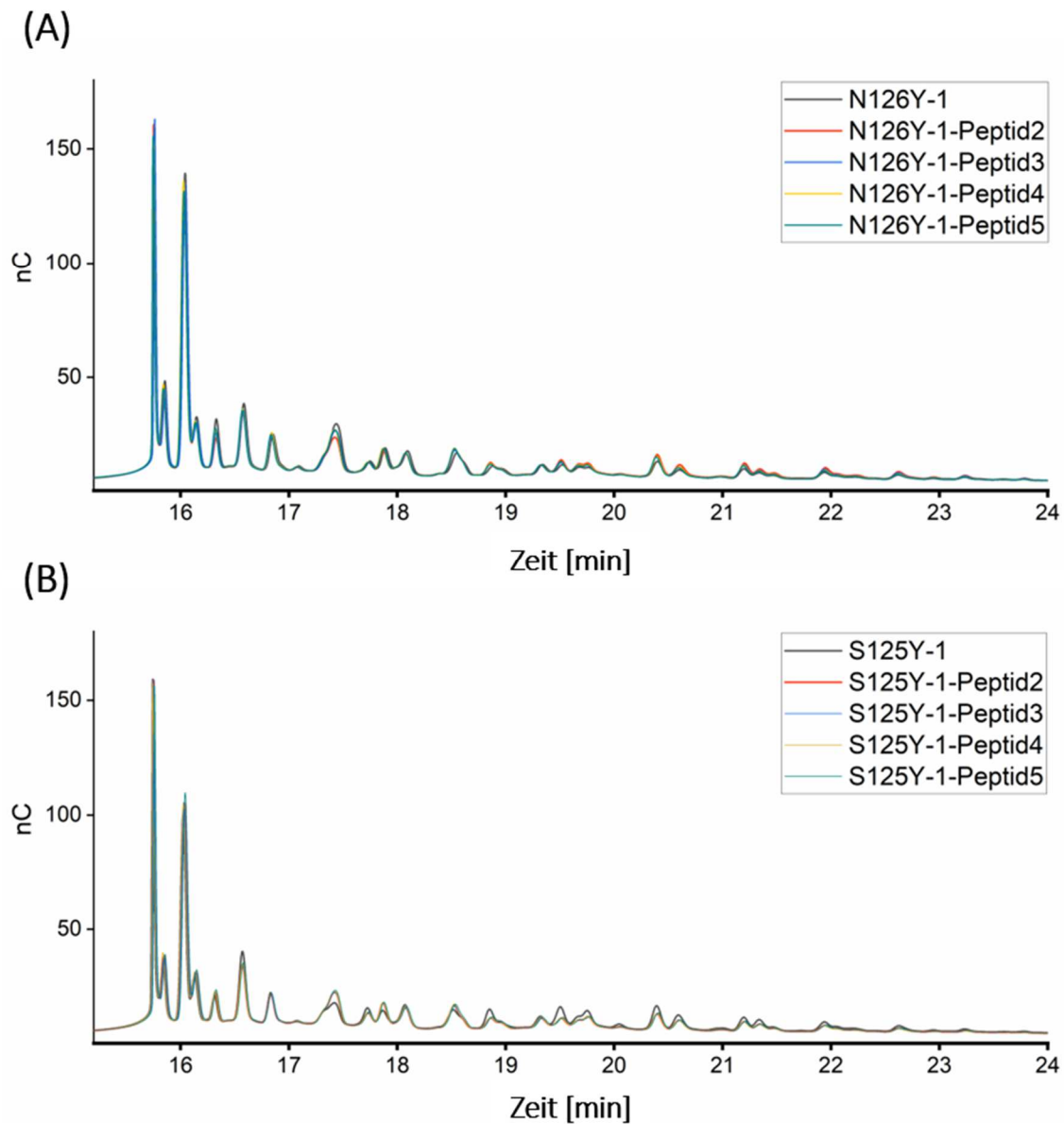


Abbildung 99: HPAEC-PAC-Analyse von Oligosacchariden der chemisch modifizierten Varianten A) N126Y-1 und unterschiedlich geklickten Peptiden 2-5, sowie B) S125Y-1 und unterschiedlich geklickten Peptiden 2-5.

DNA-Sequenzen

```
>ENA|ADF38395|ADF38395.1 Bacillus megaterium DSM 319 levansucrase
ATGAAAATGAAACGAGTTGCTAAGCATAACAACCTGCTGCTACATTGGCTGCAGCCCTACTA
GTAGGCGGGGGATATCAAACATTTTGCTAAAGGAAACGACAGCAAAGACTTTAATAATAGC
TACGGAATTTTCGCATATTACTCGCGATAATATGGTGAAAATTCCACAGCAGCAAAACAGT
GATCAGTTTAAAGTTTCTGCTTTTGTATGAATCAACTATTAAAAACATTGCTTCTGCTAAA
GGAAAAATGCATCAGGAAATACAATTGACTTAGATGTATGGGACAGCTGGCCATTACAA
AATGCTGATGGAACAGTAGCGACTTATCATGGATATCAAATTGTGTTTGCCC TAGCAGGT
GATCCAAAAGATTTCGAATGACACGCTCTGTTTATCTTTTTCTATAAAAAAGCTGGAGACAAA
TCAATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGAAGAGTGTTTTAAAGACAGCGATAAAATTCGTTCGG
AATGACCCGCATCTTAAAAATCAAACACAAGAATGGTCTGGTTCTGGCACGTTAACAAAA
GATGGTAAAGTTTCGTTTGTCTACACGGATTATTTCAGGTAAACAATACGGAAAAACAACG
TTAACGACAGCTCAAGTGAACATGTCTCAGCCAAACGATAATACGTTAAAAAGTTGATGGA
GTAGAAGATTACAAGTCAATTTTTCGCGGTGACGGAAAGATTTATCAAACGGTTCAGCAG
TTTATTGATGAAGCGGTTATGACACAGGGGATAACCATAACGCTAAGAGATCCTCACTAC
ATAGAAGACAACGGACATAAGTACCTTGTTTTTCGAAGCTAACACAGGAACAGAAGATGGC
TATCAAGGTGAAGACTCTCTATATAACAGAGCATACTACGGAGGAAACAATCCTTTCTTC
CAATCTGAAAAGAAAAGCTTCTTGAAGGATCTAATAAAAGAAAAAGCTTCTTTAGCAAAAC
GGGGCTTTGGGCATTATTGAGTTAAATGATGACTATACGCTCAAAAAAGTAATGAAGCCA
CTTATTACATCAAACACAGTTACAGACGAAATTGAACGTGCAAAACATTTTCAAAAAAGAT
GGAAAATGGTACTTGTTCACCGATTCTCGCGGATCTAAAATGACGATTGATGGAATCGGA
CAAGATGATGTGTATATGC TAGGCTATGTTTCAAATACGTTAACAGGAAAAATATAAGCCT
TTAAATGATACAGGAT TAGTTCTTCATATGGATT TAGATCCTAATGATAAAACATTTACG
TATTCTCACTTTGCTGTACCTCAAACAAAAGGCGATAATGTCGTTATTACAAGCTACATG
ACAAA TAGAGGCTTTTATGAAGACAACCACTCTACATTTGCACCAAGCTTCT TAGTGAAC
ATTGACGGTTCAAAAACATCTGTTGTAAAAGATCGTGTTCTTTGAGCAAGGTCAGTTAACA
GTAGACGAAGACTGA
```

```
>ENA|AAN01216|AAN01216.1 Lechevalieria aerocolonigenes tryptophan
halogenase
ATGTCCGGCAAGATTGACAAGATCCTCATCGTCGGCGGGCGGCACCGCCGGATGGATGGCC
GCGTCCATCTCGGCAAGGCCCTGCAGGGCACCGCGGACATCACACTGCTGCAGGCACCC
GACATCCCAGCCTCGGGGTCGGCGAGGCCACGATCCCCAATCTGCAGACGGCGTTCTTC
GACTTCCCTCGGAATCCCCGAGGACGAGTGGATGCGGGAGTGCAACGCGAGCTACAAGGTC
GCCATCAAGTTCATCAACTGGCGCACCGCGGGCGAGGGACGTCCGAGGCCCGCGAGCTC
GACGGAGGGCCCGACCACTTCTACCACTCCTTCGGTCTGCTCAAGTACCACGAGCAGATT
CCGCTGTGCGACTACTGGTTTCGACCGTTTCGTACCGGGGGAAGACCGTTCGAGCCGTTTCGAC
TACGCTGTGCTACAAGGAACCCGTCATCCTCGACGCCAACAGGTCACCGCGCAGGCTCGAC
GGTTCCAAGGTGACGAACCTACGCGTGGCACTTCGACGCGCACCTCGTCGCCGACTTCCTG
CGCCGGTTCGCCACCGAGAAGCTCGGGCGTGCGCCACGTCGAGGACCGCGTCGAGCACGTC
CAGCGCGACGCCAACGGCAACATCGAGTCGGTTTCGCACGGCAACGGGGCGTGTCTTCGAT
GCCGACCTCTTCGTCGACTGCTCGGGCTTCCGCGGGCTGCTGATCAACAAGGCGATGGAG
GAGCCCTTCTTCGACATGAGCGATCACCTGCTCAACGACAGCGCCGTCGCCACCCAGGTG
CCGCACGACGACGACGCGAACGGTGTGGAACCGTTACCTCGGGCATCGCCATGAAAGTCG
GGCTGGACGTGGAAGATCCCAGTGTCTCGGCAGGTTTCGGCACCGGGTACGTCTACTCGAGC
CGGTTTCGCCACCGAGGACGAGGCGGTGCGCGAGTTCTGCGAGATGTGGCACCTCGACCCG
GAGACCCAGCCCTCAACAGGATCCGGTTCGGGTTCGGCCGAACCGGCGCGGTGGGTC
GGCAACTGCGTCAGCATCGGCACGTCGTCGTTTCGTGGAACCACTGGAGTCGACGGGC
ATCTACTTTCGTCACGCCGCGTGTACCAGTGGTGAAGCACTTCCCCGACAAGAGCCTC
AACCCCGTGTGACCGCCAGGTTCAACCGCGAGATCGAGACGATGTTTCGACGACACGCGC
GACTTTCATCCAGGCGCACTTCTACTTCTCGCCGCGCACGGACACCCCGTTCTGGAGGGCC
AACAAGGAGCTGCGCCTGGCGGACGGCATGCAGGAGAAGATCGACATGTACCGCGCGGGC
ATGGCGATCAACGCGCCCGCGTCCGACGACGCCAGCTCTACTACGGCAACTTCGAGGAG
GAGTTCCGCAACTTCTGGAACAACAGCAACTACTACTGCGTGCTGGCCGGCTCGGTCTG
GTGCCGACGCACCCTCACACGCCTGGCGCATGCCACAGGCGACGGAGTCGGTGGAC
GAGGTCTTCGGCGCCGTCAAGGACCGGCAGCGGAACCTGCTCGAGACCTTCCGAGCCTC
CACGAGTTCCTGAGGCAACAGCACGGCCGCTGA
```

>ENA|ACM42402|ACM42402.1 *Chaetomium chiversii* RadH flavin-dependent halogenase

```
ATGTCAATCCCCAAGTCCTGTGAGGTTCTGGTGGCGGGAGGAGGTCTGCCGGATCATAAC
GCAGCATCAGCCTTAGCGAGGGAGGGTGTGATGTTGTGCTGCTTGAGGCGGATAAACAT
CCCCGGTACCATATTGGCGAAAGCATGCTCCCATCCATCAGGCCTTTACTGCGTTTCATC
GACCTCGAGGAAACCTTTGAGAAACACGGCTTCCAGAAAAAGCTCGGGCGAGCCTTCAAA
TTGACCGCAAAGCGTGAAGGCTATACCGATTTTCGTGGCAGCCCATGGTCTAACGGTTAT
TCTTGGAAATGTAGTCAGGTCGAGTCGGACGAGCTGCTCTTCAAGCACGCAGCGAAGAGT
GGTGCTCTAACCTTCCAGGGGGTCAAAGTTGACTCCTTGGAAATTTGAACCTACGACAGC
GACTTCCCCTCGGGTGGCAAAGTGGCCAACCCAGGACGCCCGTCGCCGCACGGTGGTCG
GCCAAGGACGGCCGTTCCGGCACGATCTCCTTCCAGTATCTGGTGGATGCGACGGGCGG
GCGGGAATCACGTGACCAAGTACCTCAAGAACCAGGAAATTCAACGAAGGGCTGAAGAAC
CTTGCAATCTGGGGCTACTACAAGGGGGCGCGACCCTGGGCCGAGGGCACACCCAGAGAG
AATCAGCCTTACTTTGAGGGCATGCGCGATGGTGCCGGTTGGTGCTGGACTATTCCGCTT
CACAACGGCACGGTATCCGTGGGAGCTGTTCTGCGAAGCGACTTGTCTTCGCAAAGAAG
AAGAGCCTCGGAGAAGATGTCACCAACGCAATGATCATGGCTGAGTGCATGAAGCTCTGT
CCGACAATCAAAGAGCTGCTCGAGCCCGCCGAGCTCGTTTCCGATATCAAGCAAGCGACC
GACTACTCGTACAGCGCATCTGCGTACGCGGGCCCGTATTTCCGCATCGTCGGGGACGCT
GGCTGTTTTCATCGACCCCTTTCTTCTCCTCCGGACATCATCTGGCCATGGCGGGTGCACCTC
GCGGCGGCTGTTTTGATACGTGCGTGCATGAAAGGAGACTGCAGCGAGTATGAGGCGTCG
AACTGGCACGCAAGAAAGGTCGACGAGGGGTATACACTTTTCTTGCTGGTTCGTAATGGCG
GCCCTCAAGCAGATCAGAATGCAGGAGGAGCCGGTGTGAGCGACATTGACGACGATGGT
TTTGATCGAGCCTTTCAGTTCCTCAAGCCGGTTATCCAAGGCTCAGGCTCGGCGGAAAT
GTGAAGCGGTTTACCAAGAAGGAAGTGTGCGAAGCGATAGACTTTGCCGTCTTGCACTT
GACAACATGGCGGGTGTGTTGAGCATGCCAATGAAACCAACGGAAGCAACGGAAGTGGC
GAGACCAACGGTGTGTCGAAAACCCCTCGAACAACATCACCGTGAAGATGAGAAAGTCTTA
AGCGGCATTTCGATTCTTGCCAAAGTGGCGCCAGCGCCGATATGAAGGACCTTGAAGGC
ACCGCCATCGATGGTTTTATGCCTCGGCTGGAGCATGGGCATTTGGGACTGAACAGGGTC
TAG
```

>ENA|BAA14100|BAA14100.1 *Bacillus megaterium* glucose dehydrogenase

```
ATGTATACAGATTTAAAAGATAAAGTAGTAGTTGTAACAGGTGGATCAAAAAGGTTGGGT
CGCGCCATGGCCGTTTCGTTTTGGTCAAGAGCAGTCAAAAAGTAGTTGTAAACTACCGCAGC
AATGAAGAGGAAGCGCTAGAAGTGAAAAAAGAAATTGAAGAAGCTGGCGGTCAAGCTATT
ATTGTTTCGAGGCGACGTTACAAAAGAAGAAGACGTTGTGAACCTTG TAGAGACAGCTGTT
AAAGAATTTGGTTCAT TAGACGTTATGATTAATAATGCAGGTGTTGAAAACCCGGTTCTT
TCTCATGAATTATCAT TAGAAAACCTGGAACCAAGTGATTGATACAAAACCTTAACAGGGGCA
TTTT TAGGAAGCCGTGAAGCAATTAATATTTTCGTCGAAAATGACATTAAGGAAAACGTT
ATTAACATGTCCAGCGTTCACGAAATGATTCTTGGCCATTATTTGTTCACTATGCAGCA
AGTAAAGGCGGTATGAAATTAATGACGGAAACATTGGCTCTTGAATATGCGCCAAAAGGT
ATCCGCGTAAATAACATTGGACCAGGTGCAATCGATACGCAATCAACGCTGAAAAATTC
GCAGATCCGGAACAGCGTGCAGACG TAGAAAGCATGATTCCAATGGGCTATATCGGCAAA
CCGGAAGAAATCGCATCAGTTGCAGCATTCT TAGCATCATCACAAGCAAGCTATGTAACA
GGTATTACATTTTGTGCTGATGGCGGTATGACAAAATATCCTTCTTTCCAAGCGGGAAGA
GGTTAA
```

>ENA|AAA23806|AAA23806.1 *Escherichia coli* flavin oxidoreductase

```
ATGACAACCTTAAGCTGTAAAGTGACCTCGGTAGAAGCTATCACGGATACCGTATATCGT
GTCCGCATCGTGCCAGACGCGGCCCTTTTCTTTTCGTGCTGGTCAGTATTTGATGGTAGTG
ATGGATGAGCGCGACAAACGTCCGTTCTCAATGGCTTCGACGCCGGATGAAAAAGGGTTT
ATCGAGCTGCATATTGGCGCTTCTGAAATCAACCTTTACGCGAAAGCAGTCATGGACCGC
ATCCTCAAAGATCATCAAATCGTGGTCGACATTCCCCACGGAGAAGCGTGGCTGCGCGAT
GATGAAGAGCGTCCGATGATTTTGATTGCGGGCGGCACCGGGTCTCTTATGCCCGCTCG
ATTTTGCTGACAGCGTTGGCGCGTAACCCAAACCGTGATATCACCATTTACTGGGGCGGG
CGTGAAGAGCAGCATCTGTATGATCTCTGCGAGCTTGAGGCGCTTTTCGTTGAAGCATCCT
GGTCTGCAAGTGGTGCCGGTGGTTGAACAACCGGAAGCGGGCTGGCGTGGGCGTACTGGC
ACCGTGTAAACGGCGGTATTGCAGGATCACGGTACGCTGGCAGAGCATGATATCTATATT
GCCGGACGTTTTGAGATGGCGAAAATTGCCCGCATCTGTTTTGCAGTGAGCGTAATGCG
CGGAAGATCGCCTGTTTGGCGATGCGTTTGCATTTATCTGA
```

7.9 Vektorkarten

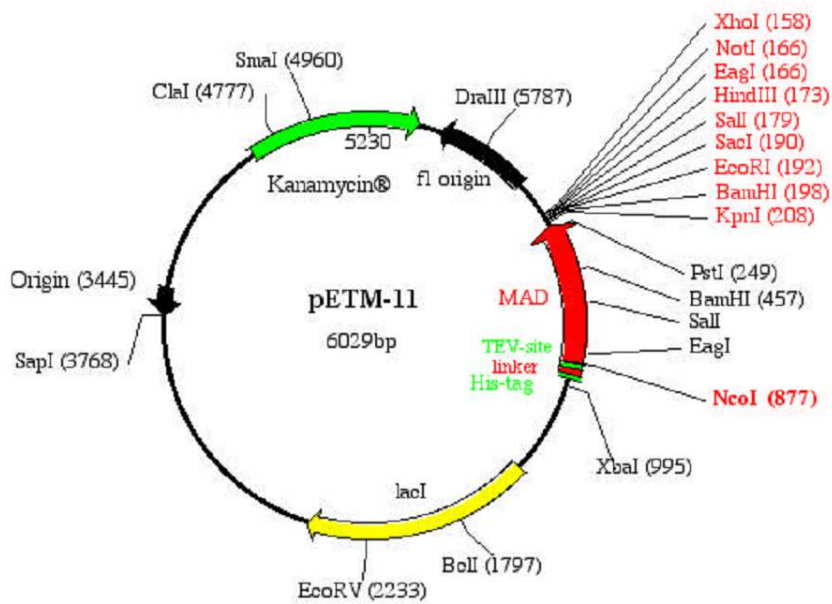


Abbildung 100: Vektorkarte von pETM11.^[160]



Vector ID

Vector	Resistance	ID	Origin
pMA	Amp	GCGGAA	colE1
pMK	Kan	AAGGAA	colE1
pMS (rare)	Spc	AGTGAA	colE1

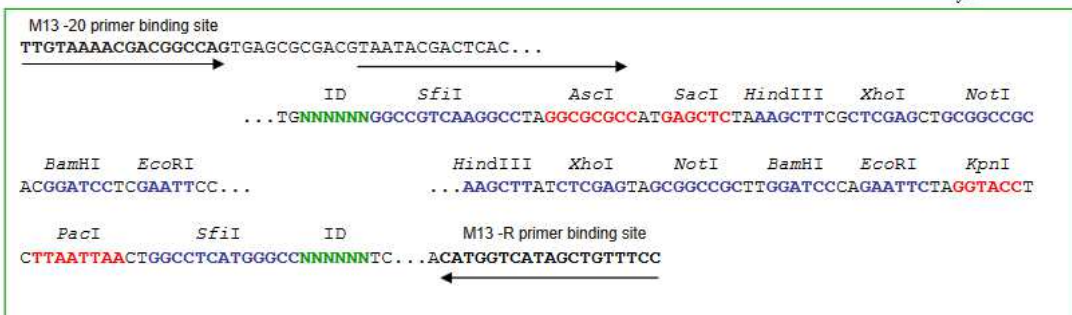
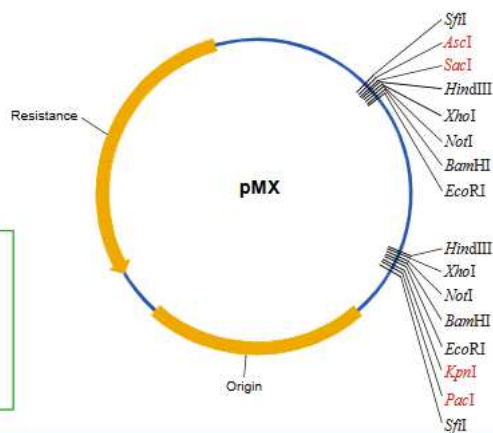


Abbildung 101: Vektorkarte von pMA.^[161]

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro		
μg	Mikrogramm		
μL	Mikroliter		
4CzIPN	1,2,3,5-Tetrakis(carbazol-9-yl)-4,6-dicyanbenzol		
<i>Bm</i>	<i>Bacillus megaterium</i>		
<i>Bs</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition		
Cy	Cyclohexan		
DCM	Dichlormethan		
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser		
DIPEA	Diisopropylethylamin		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> , und andere		
EtOAc	Ethylacetat		
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid		
Fre	Flavin-Reduktase		
GDH	Glucose-Dehydrogenase		
h	Stunde		
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat		
in situ	am Ort		
in vitro	im Reaktionsgefäß		
in vivo	im lebendigen Organismus		
		IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
		k_{cat}	Wechselzahl
		$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	katalytische Effizienz
		K_{d}	Dissoziationskonstante
		kDa	Kilo Dalton
		K_{M}	Michaelis-Konstante
		LB	Lysogeny broth
		M	Molar
		MeOH	Methanol
		mg	Milligramm
		min	Minute
		mM	Millimolar
		MSNT	1-(Mesitylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole
		NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
		nm	Nanometer
		NMR	Kernspinresonanz
		OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Extinktion
		PCR	Polymerasekettenreaktion
		PDB	Protein Data Base
		PEG	Polyethylenglycol
		ppm	parts per million
		RadH	Radical Halogenase
		RebH	Rebeccamycin Halogenase
		rpm	Umdrehungen pro Minute
		SDS	Natriumdodecylsulfat

SiO ₂	Silicagel	Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition	U	Unit
TAE	Tris-Acetat-EDTA	usw.	und so weiter
TB	terrific broth	UV	Ultraviolett
THPTA	Tris(3-hydroxy-propyltriazolylmethyl)amin	WT	Wildtyp
T _m	Schmelztemperatur	YM	Yeast and Mold
		z. B.	zum Beispiel
		δ	chemische Verschiebung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Reaktionsgleichung der Transfructosylierung durch die <i>Bm</i> -Levansucrase.	2
Abbildung 2: Postulierter Retentions-Mechanismus von GH68-Enzymen. A) Saccharose wird im aktiven Zentrum von der katalytischen Triade stabilisiert. B) D-Glucose wird freigesetzt und ein Oxocarbenium-Ion-ähnlicher Übergangszustand (ÜZ1) des Fructosyl-Rests gebildet. Zeitgleich findet ein nukleophiler Angriff von Asp ⁹⁵ statt. C) Ein kovalentes Glycosyl-Enzym-Intermediat entsteht unter Abspaltung von Glucose. D) Der Akzeptor-Angriff führt über den zweiten Übergangszustand (ÜZ2) zum fructosylierten Produkt E). ^[25-26]	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des prozessiven und nicht-prozessiven Elongationsmechanismus der Levansucrasen. Das Enzym ist vereinfacht als blauer Zylinder abgebildet, das orangene Quadrat steht für Glucose und die Quadrate in cyan für Fructose.	4
Abbildung 4: Einteilung der Aminosäuren um das aktive Zentrum in drei Zonen; Detailausschnitt: Zoom in die erste Zone und das aktive Zentrum der <i>Bm</i> -Levansucrase.	6
Abbildung 5: Oberflächendarstellung der <i>Bm</i> -Levansucrase (PDB 3om2) mit Frontansicht auf das aktive Zentrum. Die violett hervorgehobenen Aminosäuren gehören zur Zone 2 und liegen im vermuteten Wachstumsverlauf der Oligosaccharide. Das Substrat ist grün markiert und der grüne Pfeil zeigt den Elongationsweg. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	8
Abbildung 6: Protein-Modifikation nach dem Prinzip „ <i>Tag and Modify</i> “. Zuerst wird ein <i>Tag</i> selektiv an eine spezifische Aminosäure gebunden und im zweiten Schritt mit der erwünschten Funktionalität modifiziert. Darstellung modifiziert nach Spicer <i>et al.</i> ^[61]	11
Abbildung 7: Die funktionellen Gruppen der Aminosäuren Lysin, Serin, Glutamin, Tyrosin, Cystein und Tryptophan sind gut geeignet für Protein-Modifikationen und werden deshalb oft dafür verwendet.	12
Abbildung 8: Auswahl klassischer (links) und moderner (rechts) Methoden für die Protein-Modifikation an Cystein (Cys) und Dehydroalanin (Dha): (a) Disulfid-Austausch, (b) Alkylierung, (c) Reaktion mit Maleimid Michael-Akzeptor, (d) Elektrophile Disulfid-Bildung, (e) Thioether Bildung. Darstellung modifiziert nach Boutureira <i>et al.</i> ^[9]	13
Abbildung 9: Auswahl unterschiedlicher Modifikationsmethoden für Lysin: (a) Urea und Thiourea Bildung, (b) Reduktive Aminierungs-Reaktion, (c) Reaktion mit 2-Imino-2-methoxyethyl, (d) Reaktion mit Diazonium-Salzen. Darstellung modifiziert nach Boutureira <i>et al.</i> ^[9]	14
Abbildung 10: Auswahl unterschiedlicher Modifikationsmethoden für Tyrosin: (a) Reaktion mit Diazonium-Salzen, (b) Dreikomponenten Mannich-Reaktion, (c) Reaktion mit Iminen, (d) En-artige Reaktion mit Diazodicarboxylaten. Darstellung modifiziert nach Boutureira <i>et al.</i> ^[9]	15
Abbildung 11: Reaktionsbedingungen der Tyrosin-Modifikation nach Sato <i>et al.</i> ^[90] Mit dem Modellprotein Angiotensin II wurden mit einigen Luminol-Derivaten Modifikationsraten > 95 % erhalten.	16
Abbildung 12: Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC). Basierend auf DFT Rechnungen und Kinetik-Studien werden zwei plausible Katalyse-Zyklen vorgeschlagen. Darstellung modifiziert nach Tiwari <i>et al.</i> ^[101]	17
Abbildung 13: Auswahl gängiger Click-Reaktionen. A) Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC), B) durch Ringspannung getriebene Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC), C) Tetrazin-Alken Cycloaddition über Diels-Alder Mechanismus, D) Thiol-En-Reaktion.	18

Abbildung 14: Konzept der Photo-Biokatalyse, bei der eine photokatalysierte Reaktion mit einer Biotransformation in einer Kaskade kombiniert wird.	20
Abbildung 15: Tyrosin-spezifische Biokonjugationsstrategie in zwei Modifikationsschritten. Der erste Schritt verläuft über eine En-Reaktion, während der zweite Schritt durch eine Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) erfolgt.	24
Abbildung 16: Darstellungen der <i>Bm</i> -Levansucrase (PDB 3om2). A) In der Cartoon-Darstellung wurden alle Tyrosine als gelbe Sticks markiert. B) Die Oberflächendarstellung zeigt die Einteilung der Levansucrase in 3 Zonen und den Wachstumsverlauf der Oligosaccharide als gelben Pfeil. C, D) Veranschaulichung der Exponiertheit aller Tyrosine (gelb) in der Front- und Rückansicht.	24
Abbildung 17: Analyse der Tyrosin-Modifikations-Reaktion mit der Wildtyp-Variante (WT) der <i>Bm</i> -Levansucrase im Verlauf der Reaktionszeit von 0-72 h. A) Entwicklung der Modifikationsrate des WT-Enzyms mit der Luminol-Verbindung 1 nach unterschiedlichen Zeitpunkten. B) Auswirkung der Tyrosin-Modifikation auf die Aktivität des Enzyms. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto <i>et al.</i> ^[41]	25
Abbildung 18: Ausschnitt aus NanoLC-MS/MS Analyse der chemischen Tyrosin-Modifikation der WT-Levansucrase mit Luminol-Verbindung 1 nach dem Elastaseverdau. Eine erfolgreiche Modifikation mit 1 ist in der Abbildung als pink markiertes „J“ dargestellt. Oxidationsreaktionen wurden als rot markiertes „O“ hervorgehoben. In der Oberflächendarstellung der <i>Bm</i> -Levansucrase wurden die Positionen der Aminosäure Y247 und Y196 mit einem türkisen Kreis gekennzeichnet.....	26
Abbildung 19: Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung 1 auf das Produktprofil des <i>Bm</i> -LS-WT. A) HPAEC-PAD-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch das unmodifizierte oder modifizierte Enzym synthetisiert wurden. B) Oligosaccharid/Levan-Trennung durch GPC-Messungen. Die Reaktionen wurden mit der gleichen enzymatischen Aktivität (3 U·mL ⁻¹) durchgeführt und bei äquivalenter Saccharose-Konzentration gestoppt. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto <i>et al.</i> ^[41]	27
Abbildung 20: HPAEC-PAC-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch modifizierte (<i>Tag 1</i>) und unmodifizierte Varianten A) Y196F, B) Y247F und C) Y196F/Y247F synthetisiert wurden und D) GPC-Analyse der Produktverteilung von Variante Y247F und Y247F- 1 . Die Reaktionen wurden mit der gleichen enzymatischen Aktivität (3 U·mL ⁻¹) durchgeführt und bei äquivalenter Saccharose-Konzentration gestoppt. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto <i>et al.</i> ^[41]	28
Abbildung 21: Auswirkung der zweistufigen Tyrosin-spezifischen Modifikation auf das Produktspektrum der Variante Y247F. A) unmodifizierte Variante Y247F; B) nach der Modifikation mit 1 produziert Y247F- 1 geringe Mengen hochmolekularen Levans (HML); C) die Click-Reaktion mit Azidoglucose (AzGlc) induziert bei Variante Y247F- 1 -AzGlc eine drastische Produktverschiebung von Oligosacchariden hin zu Levan-Polymer. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto <i>et al.</i> ^[41]	30
Abbildung 22: Ausschnitt aus NanoLC-MS/MS Analyse der chemischen Tyrosin-Modifikation der Variante Y247F mit Luminol- <i>Tag 1</i> und AzGlc nach dem Elastaseverdau. Die Modifikation mit 1 ist in der Abbildung als pink markiertes „J“ dargestellt und die erfolgreiche Derivatisierung nach der Click-Reaktion mit AzGlc ist mit einem grün markierten „J“ hervorgehoben.....	31
Abbildung 23: Weiterführende GPC-Analysen unterschiedlicher Levansucrase Produktspektren. A) Produktverteilung der Doppelmutante Y247F/Y196F- 1 -AzGlc nach zweifacher Modifikation.	

- B) Vergleich der Produktspektren von *B. megaterium* WT, *B. subtilis* WT und Y247F-1-AzGlc.
 C) Produktspektren der Variante Y247F bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM . D) Produktspektren der Variante Y247F-1-AzGlc bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM . Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 33
- Abbildung 24: A) Vergleich der Produktspektren von heterogener Proteinprobe mit Protein-Aggregaten und monomerer Protein Probe. B) pH-Optimum der Varianten WT, Y247-Blindprobe, Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 35
- Abbildung 25: A) Schmelztemperaturen T_m von WT-*Bm*-LS, Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc, erhalten durch Differential Scanning Fluorimetry (DSF) bei verschiedenen Levankonzentrationen. Modellierung der Schmelztemperaturen für die *single site* Ligandenbindung mit Hilfe der Software GraphPad Prism.^[122]; B) WT-*Bm*-LS , C) Y247F-1 und D)Y247F-1-AzGlc. Die berechneten K_d -Werte für Levan betragen 4,1 mM für WT-*Bm*-LS und 7,8 mM für Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 36
- Abbildung 26: Mögliche Isomere nach der Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Tag 1 an C3 oder C5 des aromatischen Rings. Es ergeben sich Isomere 1A, 2A und Isomere 1B, 2B. 38
- Abbildung 27: Molekulardynamische Simulationen der Variante Y247F-1-AzGlc. Die Abbildung zeigt zwei *Frames* der Isomere 1A (*links*) und 2A (*rechts*), in denen die polaren Wechselwirkungen des *Tags* -1-AzGlc mit den Aminosäuren D248 (Isomer 1A) und E244, I242 und D243 (Isomer 2A) veranschaulicht werden. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 38
- Abbildung 28: Oberflächendarstellung der Variante Y247F vor und nach der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Tag 1 und AzGlc. *oben*: Das unmodifizierte Enzym Y247F synthetisiert kurze Oligosaccharide. Die Oberfläche des Tyrosins Y196, an dem die Biokonjugation durchgeführt wird, ist gelb markiert. *unten*: Das modifizierte Enzym Y247F-1-AzGlc katalysiert die Synthese von Levan-Polymer. Der sterische Einfluss und die räumliche Bewegung der eingeführten Seitenkette wird durch die Oberflächendarstellung von -1-AzGlc und durch die Projektion zwei weiterer *Frames* der MD-Simulationen veranschaulicht. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 40
- Abbildung 29: GPC-Analysen der Produktprofile von Varianten Y247F-1-AzGlc, Y247F-1-Aromat, Y247F-1-FAM, Y247F-1-PEG und Y247F-1-NaN₃ mit den dazugehörigen Strukturen der eingesetzten Azide für die Untersuchungen. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 41
- Abbildung 30: GPC-Analysen der Produktprofile von Varianten E314Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc, D248Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc und F445Y/Y247F/Y196F-1-AzGlc mit entsprechender Oberflächendarstellung der ausgewählten Aminosäuren für die gentechnische Substitution durch Tyrosin und anschließender chemischer Modifizierung. Darstellung modifiziert nach Ortiz-Soto *et al.*^[41] 43
- Abbildung 31: *links*: Ausschnitt aus NanoLC-MS/MS Analyse der chemischen Tyrosin-Modifikation der Variante N126Y mit Luminol-Tag 1 nach dem Elastaseverdau. Die Modifikation mit 1 ist in der Abbildung als pinkes „J“ markiert. *rechts*: Darstellung der bereits modifizierten und analysierten Aminosäuren in blauem Halbkreis. Die zwei zu untersuchenden Varianten N126Y und S126Y wurden gelb hervorgehoben. Darstellung modifiziert nach Ertl *et al.*^[46] 44
- Abbildung 32: Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung 1 und AzGlc auf das Produktprofil der Variante S125Y. A) Gel-Permeations-Chromatographie der Produkte von S125Y, S125Y-1, S125Y-1-AzGlc. B) HPAEC-PAD-Chromatogramme von Oligosacchariden, die

durch das unmodifizierte oder die modifizierten Varianten S125Y synthetisiert wurden. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	47
Abbildung 33: Analyse des Oligosaccharidprofils von N126Y und N126Y-1 bei (A) 37 °C und (B) 20 °C. Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale Zunahme/Abnahme der Oligosaccharide nach der Modifikation. Die integrierte Fläche jedes Oligosaccharid-Peaks der unmodifizierten Variante wurde auf 100 % gesetzt. Die Rohdaten der Integrale wurden im Anhang in Tabelle 6 beigefügt. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	48
Abbildung 34: Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung 1 und AzGlc auf das Produktprofil der Variante N126Y. (A) Gel-Permeations-Chromatographie der Produkte von N126Y, N126Y-1, N126Y-1-AzGlc. (B) HPAEC-PAD-Chromatogramme von Oligosacchariden, die durch die modifizierten Varianten N126Y synthetisiert wurden. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	49
Abbildung 35: MD-Simulationen des Luminol-Tag 1 gebunden an S125Y und N126Y. Das Substrat 6-Kestose ist in den Farben cyan/orange und der Tag 1 in blau/gelb dargestellt. Für jede Variante werden drei beispielhafte <i>Frames</i> der Simulationen gezeigt, um die Bewegung der Seitenkette 1 zu veranschaulichen. Die <i>Frames</i> von N126Y-1 stellen die Konformationen von Position B Isomer 1/2 und Position A Isomer 1 dar, während die <i>Frames</i> von S125-1 die Konformationen von Position A Isomer 1/2, Position B Isomer 1 simulieren. Der grüne Pfeil zeigt den Elongationspfad der Oligosaccharide. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	51
Abbildung 36: MD-Simulationen der Variante S125Y-1-AzGlc. Das Substrat ist in den Farben cyan/orange und der Tag 1 -AzGlc in blau/gelb dargestellt. Es werden drei exemplarische <i>Frames</i> der Simulationen gezeigt, um die Bewegung der Seitenkette 1 -AzGlc zu veranschaulichen. Der grüne Pfeil zeigt den Elongationspfad der Oligosaccharide. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	52
Abbildung 37: Oberflächendarstellung der Enzym-Variante S125Y-1-AzGlc mit dem aktiven Zentrum und den umgebenden Bindungsmotiven im Wachstumsverlauf der Oligosaccharide. Der grüne Pfeil zeigt die Richtung der entstehenden Fructankette. Die blau dargestellte Seitenkette zeigt die Bewegung des chemischen Tags 1 -AzGlc. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	53
Abbildung 38: GPC-Untersuchungen zur Auswirkung der chemischen Tyrosin-Modifikation mit Luminol-Verbindung 1 und AzGlc auf das Produktprofil der Varianten (A) K373A*, (B) K373R* und (C) Y247A*. Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46]	54
Abbildung 39: Azidofunktionalisierte Peptide, die mittels Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie synthetisiert wurden.....	56
Abbildung 40: HPAEC-PAC Analyse des Produktspektrums der <i>Bm</i> -Levansucrase Variante K373L. Das Chromatogramm zeigt die Verhältnisse zwischen Mono- und Disacchariden zu den Oligosacchariden in dem blauen Kasten. Ein Zoom in das Oligosaccharid-Gemisch verdeutlicht außerdem den Unterschied zwischen dem Wildtyp-Enzym und der Variante K373L, die 6-Kestose und 6-Nystose vergleichsweise im großen Überschuss produziert. ^[127]	58
Abbildung 41: HPAEC-PAC Diagramme der Glucose und Fructose Fermentation mit dem Hefeorganismus <i>Hansenula polymorpha</i> in einem Zeitraum zwischen 0-24 h. Darstellung modifiziert nach Possiel <i>et al.</i> ^[127]	59
Abbildung 42: Reinigungsprozess des enzymatisch synthetisierten Rohprodukts, das sowohl Mono- und Disaccharide als auch Oligosaccharide enthielt. Die Monosaccharide Glucose und Fructose	

wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden abgetrennt: 1) Normalphasen-Säulenchromatographie, 2) Fermentation mit dem Hefestamm <i>Hansenula polymorpha</i> . Nach der Größenausschluss-Chromatographie (Bio-Gel®P2) und der Umkehrphasen-Chromatographie (RP18-HPLC) wurden schließlich die erwünschten Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose in hoher Reinheit (> 95 %) und moderaten Ausbeuten erhalten. Darstellung modifiziert nach Possiel <i>et al.</i> ^[127]	60
Abbildung 43: HPAEC-PAC-Diagramm der isolierten Verbindungen mit Standards (oben) und den dazugehörigen chemischen Strukturen (unten). Der verwendete Standard enthielt die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose, 1-Nystose, 6-Nystose und ein weiteres Tetrasaccharid in der genannten Reihenfolge. Darstellung modifiziert nach Possiel <i>et al.</i> ^[127]	61
Abbildung 44: ¹ H-NMR-Spektrum (600 MHz, D ₂ O) der 6-Kestose. Die wichtigen Positionen für den Nachweis des Verknüpfungsmusters wurden orange markiert. Darstellung modifiziert nach Possiel <i>et al.</i> ^[127]	62
Abbildung 45: ¹ H-NMR-Spektrum (600 MHz, D ₂ O) der 1-Kestose. Die wichtigen Positionen für den Nachweis des Verknüpfungsmusters wurden orange markiert. Darstellung modifiziert nach Possiel <i>et al.</i> ^[127]	63
Abbildung 46: ¹ H-NMR-Spektrum (600 MHz, D ₂ O) der 6-Nystose. Die wichtigen Positionen für den Nachweis des Verknüpfungsmusters wurden orange markiert. Darstellung modifiziert nach Possiel <i>et al.</i> ^[127]	63
Abbildung 47: A) Photo-biokatalysierte Kaskaden-Reaktion: Im ersten Schritt wird durch eine Halogenase ein aromatisches Substrat halogeniert, das im zweiten Schritt durch einen Photokatalysator mit einer Säure-Verbindung in einer decarboxylierenden C-C-Bindungsknüpfung umgesetzt wird. B) Ansatz für eine Photokatalyse in wässrigem Medium durch Immobilisierung des Photokatalysators in Nanomicellen. C) Kombination von Biokatalyse und Photokatalyse durch Entwicklung von Designer-Enzymen.	65
Abbildung 48: Reaktionszyklus der Halogenasen am Beispiel von RebH mit Regenerationssystem aus Flavin-Reduktase (Fre) und Glucose-Dehydrogenase (GDH).....	66
Abbildung 49: A) PCR Reaktionen mit unterschiedlichen Bedingungen zur Amplifizierung des Fre-Gens aus der genomischen DNA von <i>E. coli</i> ATCC 25922. B) Proteinaufreinigung der Flavin-Reduktase (Fre), Glucose-Dehydrogenase (GDH) und den beiden Halogenasen RadH und RebH mittels His-Tag Affinitätschromatographie. „P“ steht für das unaufgereinigte Zellpellet, das noch unlösliche Anteile des Enzyms enthält. Die Abkürzung „His“ bezeichnet die aufgereinigte Enzymprobe. (M = Marker, Größenstandard)	67
Abbildung 50: Struktur des Photokatalysators 4CzIPN und weitere mögliche Kombinationen aus Donatoren und Akzeptoren.	68
Abbildung 51: Syntheserouten zu den Alkin- und Azid-funktionalisierten Photokatalysatoren 9 und 11 , ausgehend von der kommerziell erhältlichen Verbindung 3-Bromocarbazol 6	69
Abbildung 52: Click-Reaktionen des Alkin-funktionalisierten Photokatalysators 9 mit dem Peptid 15 und der Aminosäure 17	70
Abbildung 53: Photokatalysierte decarboxylierende C-C-Bindungsknüpfung zwischen Boc-Prolin und Brombenzol mit den synthetisierten Photokatalysatoren 9 , 11 , 16 und 18 . Der grüne Haken bedeutet, dass Aktivität nachgewiesen wurde, während das rote „X“ für einen inaktiven Katalysator steht.....	71

Abbildung 54: ¹ H-NMR-Spektrum (600 MHz, D ₂ O/MeOD) von Levan synthetisiert von Y247F-1-AzGlc.	132
Abbildung 55: HMBC-Spektrum (600 MHz, D ₂ O/MeOD) von Levan synthetisiert von Y247F-1-AzGlc.	132
Abbildung 56: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von 1-Kestose. ^[159]	133
Abbildung 57: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der 1-Kestose. ^[159]	133
Abbildung 58: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von 6-Kestose. ^[159]	134
Abbildung 59: HMBC-Spektrum der 6-Kestose. ^[159]	134
Abbildung 60: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von 6-Nystose. ^[159]	135
Abbildung 61: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der 6-Nystose. ^[159]	135
Abbildung 62: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 7	136
Abbildung 63: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 7	136
Abbildung 64: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 8	137
Abbildung 65: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 8	137
Abbildung 66: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 9	138
Abbildung 67: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 9	138
Abbildung 68: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 10	139
Abbildung 69: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 10	139
Abbildung 70: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 21	140
Abbildung 71: ¹³ C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl ₃) von Verbindung 21	140
Abbildung 72: Massenspektren der Tyrosin-Modifikations-Reaktion der WT <i>Bm</i> -Levansucrase und der Luminol-Verbindung 1 nach 0, 48 und 72 Stunden.	141
Abbildung 73: NanoLC-MS/MS Analyse des Elastase verdauten Wildtyps der <i>Bm</i> -Levansucrase. Das Enzym wurde mit dem Luminol-Derivat 1 modifiziert, das in dieser Darstellung als J2 bezeichnet wird. (Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite)	142
Abbildung 74: NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante Y247F-1-AzGlc. Die erste Modifikation mit Luminol-Derivat 1 ist in der Abbildung als pinkes „J“ markiert und die zweite Modifikation mit AzGlc als grünes „J“. (Fortsetzung folgt auf nächster Seite)	145
Abbildung 75: NanoLC-MS/MS Analyse der Elastase verdauten Variante N126Y-1. Die Modifikationen mit Luminol-Derivat 1 sind in der Abbildung als pinkes „J“ markiert. (Fortsetzung folgt auf nächster Seite)	148
Abbildung 76: Massenspektrum der Tyrosin-Modifikation der Variante N126Y (M=52426.75) mit Luminol-Derivat 1 (M= 258.10).	151
Abbildung 77: Massenspektrum der Tyrosin-Modifikation der Variante S125Y (M=52453.78) mit Luminol-Derivat 1 (M= 258.10).	151
Abbildung 78: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 15	152
Abbildung 79: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 2	152
Abbildung 80: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 3	152
Abbildung 81: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 4	153
Abbildung 82: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 5	153
Abbildung 83: Massenspektrum (ESI positiv) von 1-Kestose.	153
Abbildung 84: Massenspektrum (ESI positiv) von 6-Kestose.	154
Abbildung 85: Massenspektrum (ESI positiv) von 6-Nystose.	154
Abbildung 86: Massenspektrum (ESI negativ) von 7-Chloro-Tryptophan.	154
Abbildung 87: Massenspektrum (ESI positiv) von 5-Chloro-6-Hydroxyisochinolin.	155

Abbildung 88: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 7	155
Abbildung 89: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 8	155
Abbildung 90: Massenspektrum (ESI negative) von Verbindung 9	156
Abbildung 91: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 10	156
Abbildung 92: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 11	156
Abbildung 93: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 16	157
Abbildung 94: Massenspektrum (ESI negativ) von Verbindung 18	157
Abbildung 95: Massenspektrum (ESI positiv) von Verbindung 21	157
Abbildung 96: Größenausschluss-Chromatographie mit Varianten N126Y-1 und N126Y-1-AzGlc . Protein-Aggregate eluieren von Minute 60-97 und das Protein-Monomer von Minute 98-100.	158
Abbildung 97: Größenausschluss-Chromatographie mit Varianten S125Y-1 und S125Y-1-AzGlc . Protein-Aggregate eluieren von Minute 60-97 und das Protein-Monomer von Minute 98-100.	158
Abbildung 98: HPAEC-PAC-Analyse von Oligosacchariden, die durch die unmodifizierte und modifizierte Variante A) N126Y und B) N126Y-1 über eine Reaktionszeit von 0-48h synthetisiert wurden. Die Reaktionen wurden in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 3 U mL ⁻¹ enzymatischer Aktivität und 0,5 M Saccharose durchgeführt.....	159
Abbildung 99: HPAEC-PAC-Analyse von Oligosacchariden der chemisch modifizierten Varianten A) N126Y-1 und unterschiedlich geclickten Peptiden 2-5 , sowie B) S125Y-1 und unterschiedlich geclickten Peptiden 2-5	161
Abbildung 100: Vektorkarte von pETM11. ^[160]	164
Abbildung 101: Vektorkarte von pMA. ^[161]	164
Übersicht 1: Oberflächendarstellung der <i>Bm</i> -Levansucrase (PDB: 3om2) als Frontansicht mit Saccharose in der Bindungstasche. A) Auswirkung der zweistufigen Tyrosin-Modifikation auf das Produktspektrum von Varianten mit Mutationen in der dritten Zone des Enzyms (blau markierter Bereich). B) Auswirkung der Tyrosin-Modifikation auf das Produktprofil der Variante N126Y-1 . C) Auswirkung der Tyrosin-Modifikation auf das Produktprofil der Variante S125Y-1 . Darstellung modifiziert nach Ertl <i>et al.</i> ^[46] (FOS=Fructooligosaccharide; HML=Hochmolekulares Levan).....	75
Übersicht 2: Dreistufiger Reinigungsprozess des enzymatisch synthetisierten Rohprodukts der Levansucrase-Variante K373L . Das HPAEC-PAC Diagramm zeigt die Zusammensetzung des Rohprodukts, bestehend aus Mono- und Oligosacchariden. 1) Die Monosaccharide Glucose und Fructose wurden entweder fermentativ durch den Hefestamm <i>H. polymorpha</i> oder per Normalphasen-Säulenchromatographie abgetrennt. 2) Anschließend erfolgte eine Trennung der Oligosaccharide mittels Größenausschluss-Chromatographie (Bio-Gel®P2). 3) Durch Umkehrphasen-Chromatographie (RP18-HPLC) wurden schließlich die Oligosaccharide 1-Kestose, 6-Kestose und 6-Nystose erhalten.	76
Übersicht 3: Katalysekonzept der linearen photo-biokatalysierten Kaskaden-Reaktion. Im enzymatisch katalysierten Schritt wird eine aromatische Verbindung durch die Halogenasen RebH und RadH halogeniert. Das halogenierte Substrat wird anschließend photokatalytisch mit einer Carbonsäure-Verbindung in einer decarboxylierenden C-C-Bindungsknüpfung umgesetzt.	77

Overview 1: Surface representation of the *Bm*-levansucrase (PDB: 3om2) as front view with sucrose in the binding pocket. A) Effect of the two-step tyrosine modification on the product spectrum of variants with mutations in the third zone of the enzyme (blue marked area). B) Effect of the tyrosine modification on the product profile of variant N126Y-1. C) Effect of the tyrosine modification on the product profile of variant S125Y-1. Figure modified from Ertl *et al.*^[46] (FOS=fructooligosaccharides; HML=high molecular weight levan) 81

Overview 2: Three-step purification process of the enzymatically synthesized raw product of the levansucrase variant K373L. The HPAEC-PAC diagram shows the composition of the raw product, consisting of mono- and oligosaccharides. 1) The monosaccharides glucose and fructose were separated either fermentatively by the yeast strain *H. polymorpha* or by normal phase column chromatography. 2) The oligosaccharides were then separated by size exclusion chromatography (Bio-Gel®P2). 3) Finally, the oligosaccharides 1-kestose, 6-kestose and 6-nystose were obtained by reversed phase chromatography (RP18-HPLC). 82

Overview 3: Catalysis concept of the linear photo-biocatalysed cascade reaction. In the enzymatic step an aromatic compound is halogenated by the halogenases RebH and RadH. The halogenated substrate will then be photocatalytically reacted with carboxylic acids as coupling partners in a C-C bond formation. 83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hydrolyse/Transfer-Verhältnis der Enzym-Varianten Y247F-1 und Y247F-1-AzGlc. Die Reaktionen wurden in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 3 U mL ⁻¹ enzymatischer Aktivität und 0,5 M Saccharose durchgeführt. Der Monosaccharid-Gehalt der Fructose und Glucose wurde mittels HPAEC-PAD-Analyse nach 24 und 48 Stunden Reaktionszeit gemessen. ^[41]	32
Tabelle 2: Katalytische Parameter von Tyrosin-modifizierten und unmodifizierten Levansucrase-Varianten mit Saccharose als Substrat. Die katalytischen Konstanten spiegeln die globale Aktivität (Hydrolyse und Transfer) wider. ^[41]	32
Tabelle 3: Katalytische Parameter der Tyrosin-modifizierten und unmodifizierten Levansucrase-Varianten N126Y und S125Y mit Saccharose als Substrat. Die katalytischen Konstanten spiegeln die globale Aktivität (Hydrolyse und Transfer) wider. ^[46]	45
Tabelle 4: Hydrolyse/Transfer-Verhältnis der Enzym-Varianten S125Y und N126Y vor und nach der Modifikation mit Luminol-Tag 1 . Die Reaktionen wurden in 50 mM Sørensen-Puffer pH 6,9 mit 3 U mL ⁻¹ enzymatischer Aktivität und 0,5 M Saccharose durchgeführt. Der Monosaccharid-Gehalt der Fructose und Glucose wurde mittels HPAEC-PAD-Analyse nach 48 h Reaktionszeit gemessen. ^[46]	46
Tabelle 5: Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit erfolgreich exprimierten Proteine in <i>E. coli</i>	100
Tabelle 6: Rohdaten der Integrale (nC) nach der HPAEC-PAC-Analyse von Oligosacchariden, die von den unmodifizierten und modifizierten Varianten N126Y und N126Y-1 bei 20 °C und 37 °C und einer Reaktionszeit von 48 h synthetisiert wurden. Die Werte in Klammern zeigen die Zunahme/Abnahme (in Prozent) der Oligosaccharide, die von der chemisch modifizierten Variante synthetisiert wurden. Die integrierte Fläche jedes Oligosaccharid-Peaks der unmodifizierten Variante, wurde auf 100 % gesetzt. Dieser Wert wurde von der relativen Fläche desselben Produkts, das von der modifizierten Mutante synthetisiert wurde, abgezogen.	160