

**Substratspezifität und Stereoselektivität
der Galaktitoldehydrogenase aus
Rhodobacter sphaeroides D**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen-Fakultät III

(Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften)

der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Chemiker

Thomas Friedrich Jung

Saarbrücken, im Juni 2008

Tag des Kolloquiums:

15.09.2008

Dekan:

Prof. Dr. Uli Müller

Berichterstatter:

Prof. Dr. Gerhard Wenz

PD Dr. Hans-Werner Adolph

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 2005 bis zum März 2008 am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Wenz an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

FÜR MEINE ELTERN

FÜR NICOLE

Zusammenfassung der Dissertation

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, einen sehr detaillierten Einblick in den katalytischen Mechanismus und in die Bindungsverhältnisse von Substraten im aktiven Zentrum der Galaktitoldehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter sphaeroides* D, einer short-chain-Dehydrogenase, zu erhalten. Das Substratspektrum der GatDH erstreckt sich von 1,2-Diketonen, die bevorzugt umgesetzt werden, und Hydroxyketonen über 1,3- 1,4-Diketone sowie α - und β -Ketoester. Die Verbindungsklassen der 1,3- und 1,4-Diketone stellten sich außerdem als recht effektive Inhibitoren der GatDH heraus. Durch Docking-Untersuchungen konnten die Substratspezifität und die für jede Substanzklasse eigene Stereospezifität, die mittels Gaschromatographie an chiraler Festphase bestimmt wurde, erklärt werden.

Für die Substrate, deren Kinetik vom Michaelis-Menten-Modell abweicht, wurde eine unkompetitive Substrathemmung gefunden. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass die enzymkatalysierte Reduktion von 1,2-Diketonen zu 1,2-Diolen nicht in einem Reaktionsschritt, sondern über die Bildung eines Zwischenproduktes, eines Hydroxyketons, verläuft.

Für eine Anwendung als Biokatalysator bei der Synthese chiraler Diole erscheint die GatDH als ungeeignet, da nur die aliphatischen 2,3-Diketone schnell genug umgesetzt werden. Diese zeigten jedoch Substratinhibition, welche Umsetzungen im großtechnischen Maßstab stark erschwert.

Abstract of the dissertation

Within this work we gained detailed insight in the catalytic mechanism and the binding of substrates in the active site of the short-chain-dehydrogenase Galactitoldehydrogenase (GatDH) isolated from *Rhodobacter sphaeroides* D. The wide scope of GatDH substrates comprises 1,2-diketones, which are the favored ones, hydroxyketones, 1,3-, 1,4-diketones as well as α - and β -ketoesters. On the other hand 1,3- and 1,4-diketones turned out to be effective inhibitors of GatDH. Both substrate specificities derived from the reaction kinetics and stereospecificities, determined by chiral gaschromatography, could be explained by dockingstudies for various substrates.

For those substrates deviating from Michaelis-Menten kinetics, a substrate inhibition for high substrate concentrations could be demonstrated. The reduction of diketones by GatDH occurs in two steps via formation of hydroxyketones as intermediates.

GatDH turned out to be improper as a biocatalytator for producing chiral diols. Just aliphatic 2,3-diones are reduced in a sufficient velocity by GatDH, but show a high degree of substrate inhibition, which complicates its large-scale conversion.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Eigenschaften der Galaktitoldehydrogenase	3
1.2	Zielsetzung	7
2	ERGEBNISSE	10
2.1	Synthese der Substrate	10
2.1.1	Theorie	10
2.1.2	Synthese der α -Diketone über die „Corey-Seebach-Route“	14
2.1.3	Synthese der α -Diketone über die „Wittig-Route“	15
2.1.4	Synthese der (R,S)- und (S,R)-Dirole	23
2.1.5	Synthese der γ -Diketone	24
2.2	Untersuchung des Substratspektrums der GatDH aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D	26
2.3	Activesite-Titration der GatDH und Bestimmung von k_{cat} -Werten 38	
2.4	Steady-state-Kinetik	40
2.5	Numerische Bestimmung kinetischer Parameter	51
2.6	Bestimmung von Inhibitionskonstanten.....	58
2.6.1	1,2-Diketone	62
2.6.2	1,3-Diketone	63
2.6.3	1,4-Diketone	65
2.6.4	α -Hydroxyketone	68
2.6.5	Ketoester	69
2.7	Bestimmung der Coenzympezifität	71
2.8	Docking-Untersuchungen	72
2.9	Präparative enzymatische Umsetzungen.....	81
2.9.1	Analytik der Produkte präparativer enzymatischer Umsetzungen mittels NMR	83
2.9.2	Analytik der Produkte präparativer enzymatischer Umsetzungen mittels HPLC	84
2.9.3	Gaschromatographie zur Ermittlung der Enantiomerenreinheit der Umsetzungsprodukte der GatDH	88
2.9.4	Messung der optischen Aktivität.....	97
3	DISKUSSION	98
3.1	Ein Vorschlag zum Katalysemechanismus der GatDH.....	100
3.2	Das Substratspektrum der GatDH	104

3.3	Die Substratspezifität der GatDH	110
3.4	Inhibitoren der GatDH	125
3.5	Die Coenzympezifität.....	131
3.6	Zwischenproduktakkumulierung.....	134
3.7	Die Stereospezifität der GatDH.....	135
3.8	Zusammenfassung und Ausblick	140
4	EXPERIMENTELLER TEIL	145
4.1	Arbeitsmaterialien	145
4.2	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	146
4.2.1	Isolierung der GatDH.....	146
4.2.2	Ultraviolett- und Visible-Spektroskopie (UV/VIS)	148
4.2.3	Bestimmung des K_M - und v_{max} -Wertes.....	149
4.2.4	Activesite-Titration	152
4.2.5	Modelle zur Beschreibung von Nicht-Michaelis-Menten-Kinetiken	154
4.2.6	Bestimmung der Inhibitionskonstanten	154
4.2.7	Bestimmung der Coenzymspezifität	157
4.2.8	Docking-Untersuchungen	158
4.2.9	NMR-Spektroskopie.....	159
4.2.10	Chirale Gaschromatographie.....	159
4.2.11	Messung der optischen Aktivität.....	161
4.2.12	Quantitative Umsetzung von Diketonen mit GatDH.....	162
4.2.13	Verfolgung der quantitativen Umsetzungen der GatDH mittels HPLC.....	163
4.3	Synthese der Substrate	164
4.3.1	Synthese von 2-Methyl-1,3-dithian	164
4.3.2	Synthese von 1-(2-Methyl-1,3-dithian-2-yl)-propan-1-on	164
4.3.3	Synthese von 2,3-Pentandion	165
4.3.4	Synthese der Phosphoniumsalze	166
4.3.5	Synthese der Olefine	168
4.3.6	Synthese der 1,2-Diole durch racemische Dihydroxylierung nach Sharpless.....	172
4.3.7	Oxidation der 1,2-Diole mittels NBS.....	178
4.3.8	Synthese von IBX	182
4.3.9	Oxidation der 1,2-Diole mittels IBX.....	182
4.3.10	Asymmetrische Dihydroxylierung von cis-2-Hepten nach Sharpless....	189
4.3.11	Asymmetrische Dihydroxylierung von cis-1-Phenylpropen nach Sharpless.....	190
4.3.12	Synthese der 1,4-Diketone nach Stetter	191
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	197

6 LITERATURVERZEICHNIS	200
DANKSAGUNGEN.....	202

1 Einleitung

Seit der Mitte des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass Bakterien dazu in der Lage sind, sich an neue Umweltbedingungen anzupassen^[1]. Die Grundlage zur Adaption der Mikroorganismen an Änderungen in ihrer Umwelt sind Mutationen. Diese können beispielsweise die katalytischen Eigenschaften von Enzymen des Organismus so verändern, dass neu gebotene Substrate nun durch den Organismus metabolisiert werden^[2]. Eine genetische Veränderung aktiviert also ein Gen, welches normalerweise nicht vom Organismus exprimiert wird, aber den Abbau eines neuen Substrates erlaubt. Bei Genen, die zwar funktionsfähige Enzyme kodieren aber nicht von dem Organismus exprimiert werden können, unterscheidet man zwischen kryptischen und stillen Genen. Kryptische Gene bieten dem Organismus einen Selektionsvorteil bei der Anpassung an sich ändernde Umwelteinflüsse. Stille Gene kodieren zwar ebenfalls funktionsfähige Enzyme, bieten dem Organismus aber keinen Selektionsvorteil und verschwinden daher langsam aus dem Genpool einer Population^[3]. Die Kultivierung von Bakterienstämmen, die Träger kryptischer oder stiller Gene sind, kann auch unter Ausübung eines bestimmten Selektionsdrucks bei Laborkulturen durchgeführt werden^[4]. Selektionsdruck in Form eines angebotenen, aber nicht nutzbaren Substrats als Energiequelle führt dazu, dass mutierte Bakterien, die die angebotene Nährstoffquelle nutzen können, einen entscheidenden Konkurrenzvorteil haben und sich im Gegensatz zu den Bakterien, die keine Nährstoffgrundlage besitzen, vermehren können.

Im Rahmen von Untersuchungen des Polyolstoffwechsels des phototrophen, schwefelfreien Purpurbakteriums *Rhodobacter sphaeroides* Si 4 konnte die Mutante *Rhodobacter sphaeroides* D isoliert werden. Nachdem im Jahr 1982 bereits eine Mutante dieses Organismus gefunden

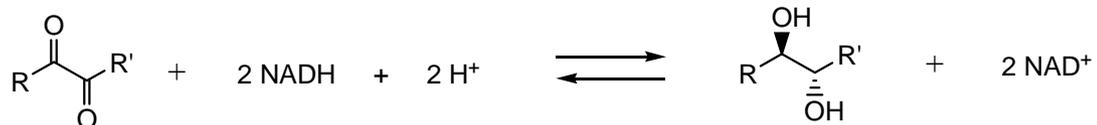
werden konnte, die in der Lage war, D-Tartrat als einzige C-Quelle zu nutzen^[5], konnte Schneider^[6] nun eine Mutante isolieren, die im Gegensatz zum Wildtypstamm das Polyol Galaktit metabolisieren konnte. Hierzu wurde der Wildtypstamm *Rhodobacter sphaeroides* Si 4 im Chemostaten in einem Mineralmedium, welches D-Glucit ($c = 1 \text{ mM}$) als wachstumsbegrenzenden Faktor und Galaktitol ($c = 20 \text{ mM}$) im Überschuss enthielt, kultiviert. Nach einer Inkubation von ca. 50 Tagen wurde eine deutliche Zunahme der optischen Dichte bei 650 nm beobachtet, was ein Beweis dafür war, dass der Organismus nun tatsächlich Galaktitol als Kohlenstoffquelle nutzen konnte. Schließlich gelang es, einen Stamm in Reinkultur zu isolieren, der mit Galaktit als einziger C-Quelle wachsen konnte. In diesem *Rhodobacter sphaeroides* D genannten Stamm wurde eine stark erhöhte Galaktit-Dehydrogenase-Aktivität festgestellt. Im Wildtypstamm wurden bereits drei Polyoldehydrogenasen, eine Mannitol-, eine Sorbitol- und eine Ribitoldehydrogenase, identifiziert^[7, 8]. Nach Aufreinigung und Repressionsexperimenten wurde allerdings nachgewiesen, dass die erhöhte Dehydrogenase-Aktivität nicht auf eine angepasste Variante der bereits beschriebenen Polyoldehydrogenasen zurückzuführen ist, sondern auf ein bisher unbeschriebenes Enzym, welches Galaktitoldehydrogenase (GatDH) genannt wurde.

Hierbei handelt es sich um ein NAD- und Magnesium-abhängiges Enzym, welches aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede Untereinheit besteht aus 254 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von insgesamt 27.5 kDa^[9, 10].

Die Galactitoldehydrogenase (GatDH) zeigte sich in darauf folgenden Untersuchungen als sehr vielseitiges Enzym, dessen Substratspektrum nicht auf Galaktitol beschränkt ist.

1.1 Eigenschaften der Galaktitoldehydrogenase

GatDH kann einerseits mit NADH als Coenzym prochirale Diketone und Hydroxyketone enantioselektiv zu den entsprechenden Diolen reduzieren und andererseits Diole und Hydroxyketone mit NAD⁺ zu den entsprechenden Diketonen oxidieren. Im Falle der Oxidationsreaktion ist die GatDH in der Lage, racemische Gemische von Hydroxyketonen oder Diolen zu trennen, da ein bestimmtes Enantiomer bei der Umsetzung bevorzugt wird^[10].



Schema 1: von der GatDH katalysierte Oxidations- und Reduktionsreaktionen

Das pH-Optimum der Reduktionsreaktion liegt bei pH 6.5, während die Oxidationsreaktion ein pH-Optimum von 9.0 besitzt. Der isoelektrische Punkt der GatDH wurde bei pH 4.2 ermittelt^[9]. Die Aktivität der GatDH ist allerdings nicht nur vom jeweiligen pH-Wert des Reaktionsmediums abhängig, sondern auch von der Gegenwart zweiwertiger Kationen. Eine Dialyse oder die Zugabe von EDTA bewirken eine kontinuierliche Abnahme der GatDH-Aktivität. Bei Zugabe von MgCl₂, MnCl₂, NiCl₂ oder von CoCl₂ ist eine Wiederherstellung der Enzymaktivität zu verzeichnen^[9].

Der Grund hierfür ist in der Struktur des Enzyms zu suchen. Diese besteht aus vier identischen Untereinheiten, die im Inneren des Enzyms zwei Magnesium-Ionen koordinieren, welche vermutlich für den Zusammenhalt und die Konformation der GatDH eine entscheidende Rolle spielen^[9].

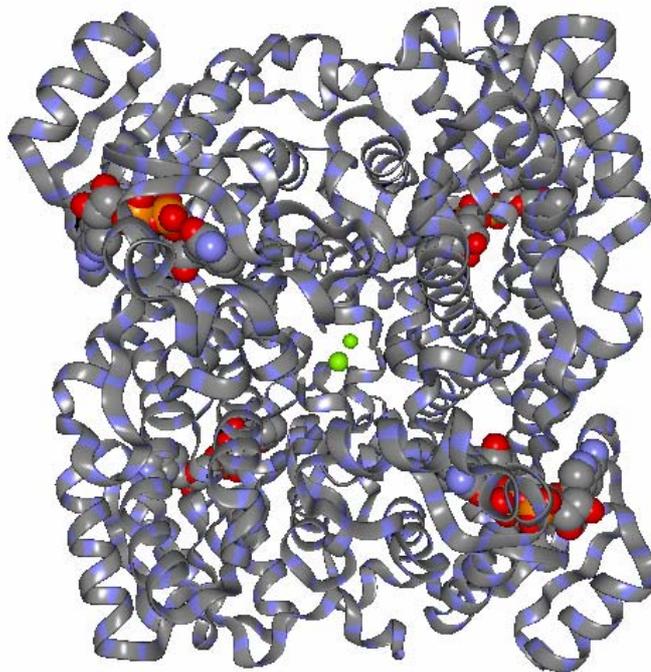


Abbildung 1: Bänderdarstellung der Kristallstruktur der GatDH. Es handelt sich um ein Homotetramer, in dessen Innern zwei Magnesiumionen (grüne Kugeln) koordiniert sind. Die aktiven Zentren jedes Monomers befinden sich in der Nähe der durch die van-der-Waals-Oberfläche dargestellten NADH-Moleküle. (Referenz Scheidig). Die Sauerstoffatome der NADH-Moleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Die von Scheidig et al. bestimmte Röntgenkristallstruktur zeigt ^[11], dass jedes Mg-Ion von jeweils zwei Carboxylgruppen der C-terminalen Tryptophane 254 benachbarter Untereinheiten komplexiert wird. Die NADH-Moleküle, die in Abb. 1 zur besseren Anschaulichkeit im Kugelmodell dargestellt sind, befinden sich nahe an den aktiven Zentren jeder Untereinheit. Die große Entfernung der Mg-Ionen zu den Cosubstrat-Molekülen und somit zum aktiven Zentrum beweisen, dass das Magnesium nicht direkt am katalytischen Prozess beteiligt ist, sondern eher für die Ausrichtung oder den Zusammenhalt der Untereinheiten verantwortlich sein kann.

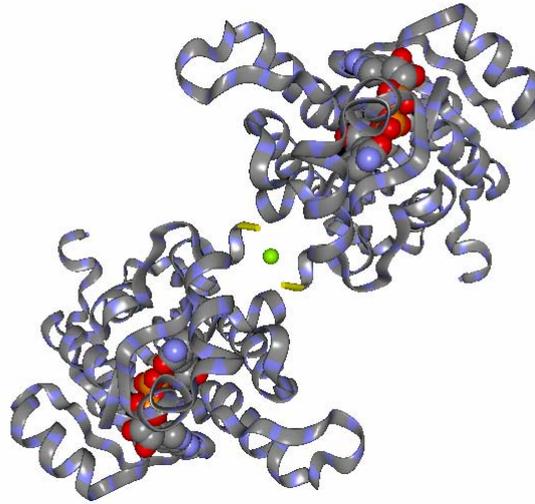


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Kristallstruktur der GatDH. Zwei diagonal gegenüberliegende Untereinheiten komplexieren ein Magnesiumion über die C-terminalen Trp 254.

Die C-Termini der diagonal gegenüberliegenden Untereinheiten sind so ausgerichtet, dass die im Innern der GatDH lokalisierten Carboxylgruppen der gegenüberliegenden C-Termini jeweils paarig ein Magnesium-Ion koordinieren (Abb.2). Wie an der Position der Cosubstratmoleküle zu erkennen ist, sind die aktiven Zentren der beiden Untereinheiten antiparallel nach außen orientiert.

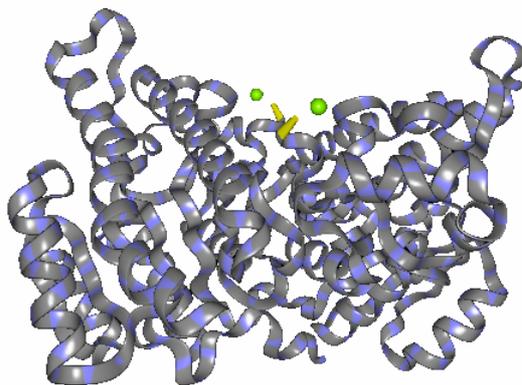


Abbildung 3: Darstellung zweier direkt benachbarter Untereinheiten. Diese sind antiparallel zueinander ausgerichtet und koordinieren jeweils ein Mg-Ion mit Hilfe ihres C- terminalen Tryptophanrestes.

Wie in Abb. 3 zu erkennen ist komplexieren zwei direkt benachbarte Untereinheiten nicht das gleiche Magnesiumion.

Die Zuordnung der Galactitoldhydrogenase zu einer bestimmten Enzymfamilie kann aufgrund charakteristischer Aminosäurereste und Sequenzabschnitte erfolgen.

Aufgrund der für short-chain-Dehydrogenasen (SDR)^[12-14] typischen Sequenz TyrXXXLys im aktiven Zentrum und dem am aktiven Zentrum befindlichen Serinrest 144 kann die GatDH dieser Enzymklasse eindeutig zugeordnet werden.

Ursprünglich unterscheidet man drei Arten von Dehydrogenasen:

long-chain, medium-chain und short-chain-Dehydrogenasen.

Während die Familie der long-chain-Dehydrogenasen bisher noch nicht sehr gut untersucht ist, sind die medium-chain-Dehydrogenasen (MDR), zu denen neben Alkoholdehydrogenase und Lactatdehydrogenase noch ca. 500 weitere Vertreter gehören, im Bereich ihrer drei-dimensionalen Struktur gut charakterisiert. Es handelt sich bei dieser Enzymklasse, die NAD(H) oder NADP(H) als Coenzym verwendet, entweder um Di- oder Tetramere, wobei jedes Monomer 350-400 Aminosäurereste besitzt und in eine katalytische Domäne und eine Coenzymbindungsdomäne unterteilt werden kann^[15]. Die Tertiärstruktur der Coenzymbindungsdomänen aller medium-chain-Dehydrogenasen ist sehr ähnlich und wird als „Rossmann-fold“ bezeichnet. An den katalytischen Umsetzungen im aktiven Zentrum ist stets ein dort gebundenes Zn-atom beteiligt.

Die Enzyme, die zur Familie der short-chain-Dehydrogenasen (SDR) gezählt werden, sind entweder Dimere oder Tetramere und benutzen wie die medium-chain-Dehydrogenasen NAD(H) oder NADP(H) als Coenzym^[15]. Anders als die medium-chain-Dehydrogenasen sind die short-chain-Dehydrogenasen jedoch keine Zinkenzyme.

Jedes Monomer der short-chain-Dehydrogenasen, zu denen mittlerweile über 100 Vertreter gezählt werden, besteht aus 250 – 300 Aminosäuren. Die katalytische Domäne liegt im Bereich des C-Terminus des Proteins während die Coenzymbindungsdomäne sich am N-terminalen Ende des Proteins befindet und die typische Struktur der „Rossmann-fold“ aufweist^[12]. Die Enzyme der short-chain-Familie besitzen alle ein mehr oder weniger breites Substratspektrum für Alkohole, Polyole, Steroide und Prostaglandine und katalysieren überwiegend Alkohol- und Steroiddehydrogenierungs- und Carbonylreduktionsreaktionen^[12].

Im Falle der Galactitoldehydrogenase handelt es sich um eine Polyoloxidoreduktase, deren Substratspektrum sich über Diole, Diketone, Hydroxyketone und Zucker erstreckt. In den Arbeiten von Wiehr und Jäkel^[9, 10] wurden Isolierung und Charakterisierung der GatDH sowie das Substratspektrum der Oxidationsreaktion bereits eingehend untersucht, welches überwiegend aus Alkoholen, 1,2-Diolen und Triolen, aber auch aus Tetrinen und Pentinen besteht. Die Arbeit von Jeworski^[10] hingegen beschäftigt sich mehr mit der Reduktionsreaktion der GatDH, deren Substratspektrum v.a. Hydroxyketone, Ketosen, 1,2- und 1,3-Diketone umfasst.

1.2 Zielsetzung

Den wenigen bisher veröffentlichten Arbeiten zur Substratspezifität und Stereoselektivität der GatDH ist zu entnehmen, dass das Enzym ein recht breites Substratspektrum hat. Da die stereoselektive Herstellung chiraler Alkohole und Polyole immer noch eine große Herausforderung darstellt, war es besonders interessant, das Potential der GatDH in der Reduktion von Diketonen näher zu charakterisieren. Das Vorliegen einer bisher noch nicht

veröffentlichten Kristallstruktur (Scheidig et al.) sollte es in Kombination mit Docking-Untersuchungen erlauben, Struktur-Funktions-Beziehungen aufzuzeigen. Zusätzlich sollte ein möglichst breites Spektrum von Verbindungen auf die Eignung als Substrate der GatDH untersucht werden. Neben 1,2-Diketonen, die bereits als Substrate der GatDH beschrieben wurden, sollten außerdem 1,3- und 1,4-Diketone in die Untersuchungen einbezogen werden. Kommerziell nicht erhältliche Vertreter der zu testenden Verbindungsfamilie sollten durch Kupplungsreaktionen von C-Bausteinen synthetisiert werden.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass einige der untersuchten Verbindungen zwar keine Substrate der GatDH darstellten, diese jedoch effektiv inhibierten. Davon ausgehend sollte dann auch das inhibitorische Potential der verschiedenen Diketone genauer charakterisiert werden. Da die Reduktion prochiraler Hydroxyketone und Diketone zu chiralen Diolen als Reduktionsprodukte führt, erwies es sich als notwendig, analytische Verfahren zu entwickeln, die eine Identifizierung der enzymatisch produzierten Enantiomere bzw. Diastereomere ermöglichen. So sollte untersucht werden, inwiefern die GatDH das Potential zur Entwicklung von Verfahren zur Herstellung synthetisch interessanter Diole hat. Dazu sollten Methoden getestet werden, die das während der Reduktion verbrauchte NADH recyceln und so quantitative Umsetzungen von Substraten bei sparsamem Einsatz von NADH erlauben. Da es sich bei der Reduktion eines Diketons um einen zweistufigen Prozess handelt, sollte auch untersucht werden, ob sich Hydroxyketone als Zwischenprodukte nachweisen lassen und inwiefern diese geeignete Substrate der GatDH darstellen.

Zur Identifikation chiraler Zwischenprodukte und Produkte sollten chromatographische Verfahren an chiralen Festphasen eingesetzt werden. Hierdurch können wichtige Erkenntnisse über die Stereospezifität der GatDH gewonnen werden. Aus detaillierten kinetischen Studien mit einem

breiten Substratspektrum im Kombination mit Docking-Untersuchungen sollte versucht werden, einen Vorschlag zum Katalysemechanismus der GatDH zu erarbeiten, der auch umfasst, welche strukturellen Eigenschaften eine Verbindung haben muss, um ein Substrat bzw. ein Inhibitor der GatDH zu sein.

2 Ergebnisse

2.1 Synthese der Substrate

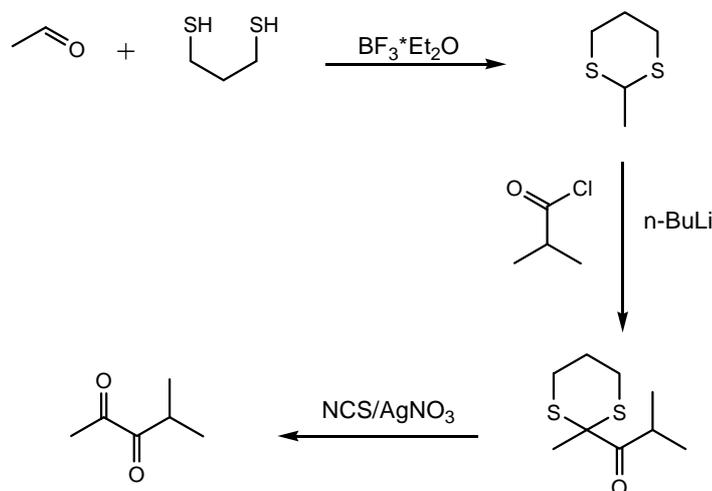
2.1.1 Theorie

Da einige der Verbindungen, die als Substrate oder Inhibitoren der GatDH getestet werden, käuflich nicht zu erwerben sind, müssen diese Substanzen synthetisiert werden. Um ein recht breites Spektrum an möglichen Substraten herzustellen, erfolgen die Synthesen der α - und γ -Diketone durch Kupplungsreaktionen von verschiedenen C-Bausteinen, wobei für jede Substanzklasse ein Reaktionsschema mit variierbaren Edukten angewendet wurde.

Im Falle der α -Diketone kommen für die C-C-Kupplungsreaktion prinzipiell zwei Synthesemöglichkeiten in Frage kommen, die „Corey-Seebach-Route“ (Schema 2) und die „Wittig-Route“ (Schema 3).

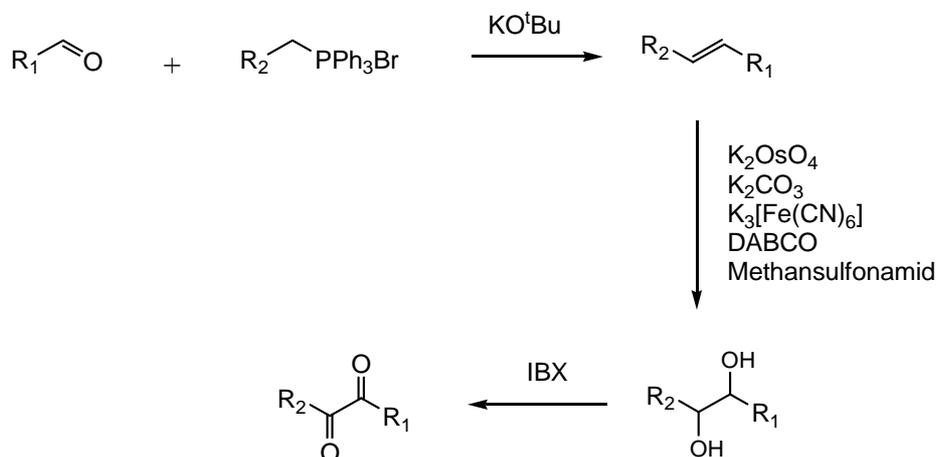
Im ersten Fall erfolgt die Verknüpfung der beiden C-Bausteine, bei denen es sich um ein Carbonsäurechlorid und ein 1,3-Dithian handelt, über eine Corey-Seebach-Reaktion. Hierbei kann das 1,3-Dithian in Gegenwart einer Lewis-Säure aus dem entsprechenden Aldehyd und 1,3-Propandithiol^[16] gewonnen werden. Zur eigentlichen Corey-Seebach-Reaktion wird zunächst das 1,3-Dithian in 2-Position mit n-BuLi deprotoniert und somit in das Li-Dithian überführt, welches nun als verkapptes Carbanion mit Carbonylkomponenten, wie zum Beispiel einem Carbonsäurechlorid unter Ausbildung einer C-C-Bindung reagieren kann^[17]. Im letzten Reaktionsschritt muss nun das Thioacetal abgespalten

werden, um das gewünschte α -Diketon zu erhalten. Dies geschieht in der Regel oxidativ mittels NCS in Gegenwart von AgNO_3 .



Schema 2: Synthese eines beliebigen α -Diketons über die „Corey-Seebach-Route“.

Bei der so genannten „Wittig-Route“ erfolgt der C-C-Kupplungsschritt über eine klassische Wittig-Reaktion, ausgehend von den entsprechenden Phosphoniumsalzen, die einfach aus Alkylbromiden und PPh_3 dargestellt werden können, und Aldehyden mit KO^tBu als Base.

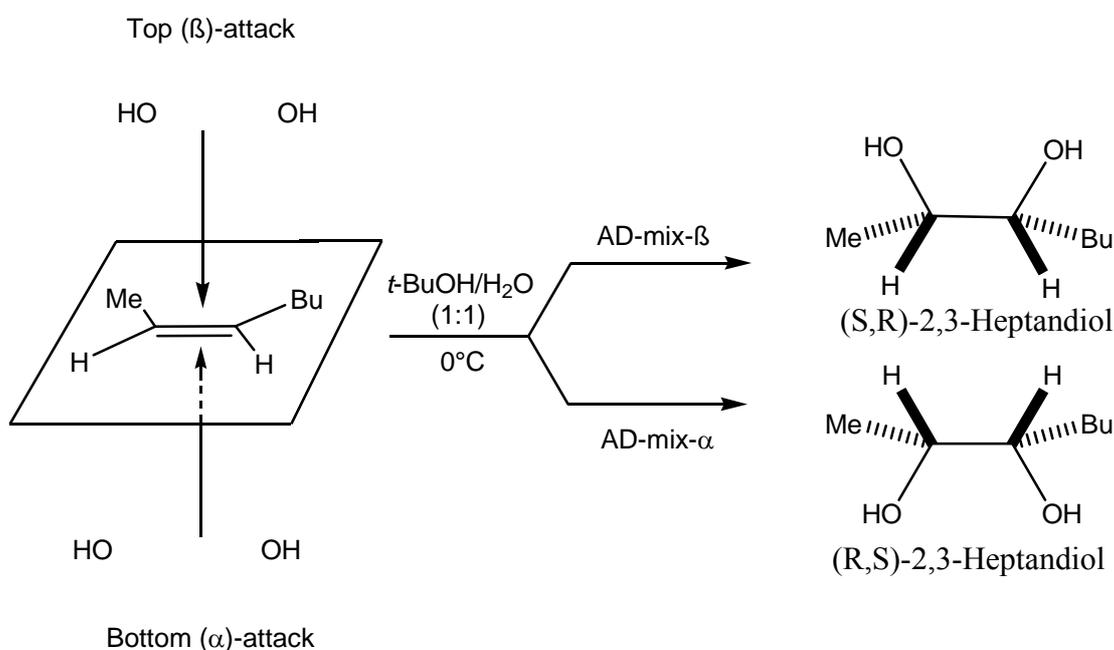


Schema 3: Synthese eines beliebigen α -Diketons über die „Wittig-Route“ mit IBX als Oxidationsmittel.

Anschließende Dihydroxylierung des Olefins nach Sharpless^[18] liefert das entsprechende 1,2-Diol, welches durch Oxidation in das gewünschte

1,2-Diketon überführt wird. Die Oxidation kann entweder klassisch mit Hilfe von Cr(VI) erfolgen, mittels NBS^[19] oder IBX^[20, 21], einer Vorstufe des Dess-Martin-Periodinans.

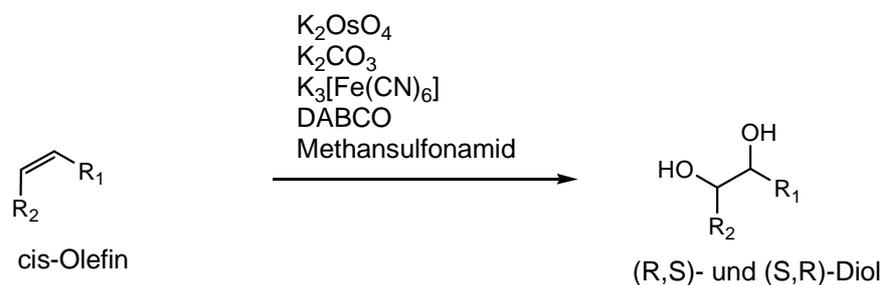
Die als Referenzsubstanz bei der Gaschromatographie benötigten Enantiomere einiger 2,3-Diole konnten mittels enantioselektiver Sharpless-Dihydroxylierung dargestellt werden. Wie in Schema 5 gezeigt, kann die Synthese von (R,S)-, bzw. (S,R)-Diolen aus den entsprechenden cis-Diolen über eine asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless^[22] erfolgen, entweder über AD-mix α , mit (DHQ)₂PHAL als chiraalem Ligand oder über AD-mix β , mit (DHQD)₂PHAL als chiraalem Ligand^[22, 23].



Schema 4: Asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung von cis-2-Hepten.

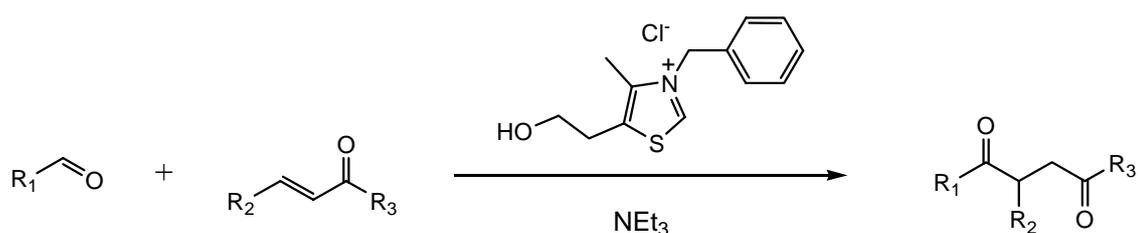
Ein racemisches Gemisch aus (R,S)- und (S,R)-Diol kann ebenfalls ausgehend von den entsprechenden cis-Olefinen durch racemische Dihydroxylierung nach Sharpless^[18], in diesen Fällen allerdings mit nicht chiralen Liganden wie z.B. DABCO, dargestellt werden. In beiden Fällen

erfolgt die Regenerierung des in situ gebildeten Os(VIII) mit Hilfe von Kaliumhexacyanoferrat(III) als Oxidationsmittel.



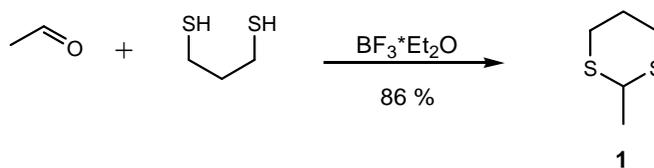
Schema 5: Osmium-katalysierte racemische Dihydroxylierung eines cis-Olefins.

Die γ -Diketone können durch Stetter-Reaktion^[24] mit 3-Benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumchlorid als Katalysator, wie in Schema 6 dargestellt, synthetisiert werden. Hierbei wird zunächst der Katalysator in 2-Position seines Thiazolringes von der Base deprotoniert und greift anschließend die Carbonylgruppe des Aldehyds nucleophil an. Das so gebildete Carbanion greift nun die Doppelbindung der α -, β -ungesättigten Carbonylverbindung michaelartig an. Nach einer Protonenwanderung wird der Katalysator wieder abgespalten, was zur Ausbildung des 1,4-Diketons führt.



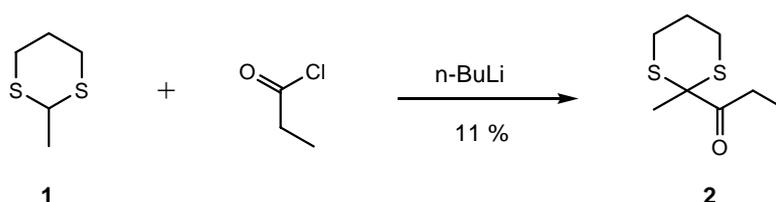
Schema 6: Synthese eines beliebigen γ -Diketons.

2.1.2 Synthese der α -Diketone über die „Corey-Seebach-Route“



Schema 7: Synthese des 2-Methyl-1,3-dithian.

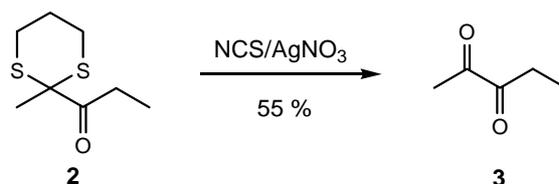
Im ersten Schritt der 1,2-Diketon-Synthese über die „Corey-Seebach-Route“ konnte das 2-Methyl-1,3-dithian aus 1,3-Propanedithiol und Acetaldehyd mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ als Lewis-Säure hergestellt werden.



Schema 8: Corey-Seebach-Reaktion.

Der eigentliche C-C-Verknüpfungsschritt fand nun über die Corey-Seebach-Reaktion statt, bei der, wie schon beschrieben, das Dithian mittels $n\text{-BuLi}$ in ein Lithiumdithian überführt wird, welches nun mit einem Carbonsäurechlorid zu 1-(2-Methyl-1,3-dithian-2-yl)-propan-1-on reagiert. Die sehr niedrige Ausbeute von 11 % lässt sich dadurch erklären, dass die Deprotonierung des 1,3-Dithians mit $n\text{-BuLi}$ nur in äußerst geringem Maße stattfand und daher den limitierenden Schritt der Reaktion darstellte. Die Deprotonierungsrate wurde durch Quenchen der Reaktion mit D_2O überprüft. Hierbei werden deprotonierte 1,3-Dithiane in der 2-Position deuteriert und ergeben im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum keine Signale mehr. Daher

kann durch Vergleich der integrierten Signale des C₂-Protons mit den integrierten Signalen anderer Protonen des Moleküls im ¹H-NMR das Maß der Deprotonierung errechnet werden. Auch durch die Verwendung anderer Basen, wie sec-BuLi oder der Lochmann-Schlosser-Base^[25], konnte die Deprotonierungsrate nicht erhöht werden.



Schema 9: Entschützung des Thioacetals.

Die Entschützung des Thioacetals erfolgte mit NBS und AgNO₃ in einer Ausbeute von 55 %. Insgesamt konnte über die „Corey-Seebach-Route“ nur eine Gesamtausbeute von 5% erzielt werden.

2.1.3 Synthese der α -Diketone über die „Wittig-Route“

Die für die Wittig-Reaktion benötigten Phosphoniumsalze werden ausgehend von den entsprechenden Bromalkanen durch eine S_N-Reaktion mit PPh₃ hergestellt.



Schema 10: Synthese eines beliebigen Phosphoniumsalzes.

Tabelle 1: Ausbeute und Struktur isolierter Phosphoniumsalze.

Phosphoniumsalz	Rest R	CAS-Nummer	Ausbeute
4	Ethyl	1530-32-1	82 %
5	Propyl	6228-47-3	69 %
6	Butyl	1779-51-7	78 %
7	Pentyl	21406-61-7	72 %
8	Hexyl	4762-26-9	83 %
9	Heptyl	13423-48-8	76 %

**4-9**

Im ersten Reaktionsschritt der „Wittig-Route“ erfolgte die Verknüpfung zweier C-Bausteine über eine Wittig-Reaktion mit Kaliumtert-butanolat als Base, welche zu einem cis/trans-Gemisch des entsprechenden Olefins führt.

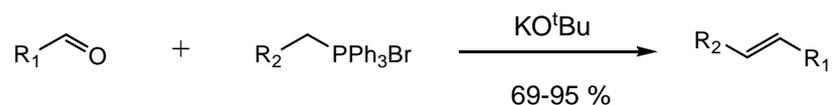
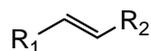
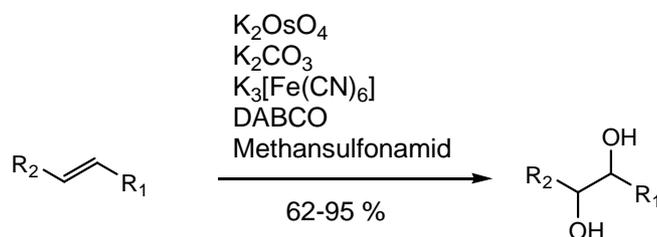
**Schema 11:** Wittig-Reaktion zur Bildung der entsprechenden Olefine.

Tabelle 2: Ausbeute und Struktur synthetisierter Olefine.

Olefine	Rest R ¹	Rest R ²	CAS-Nummer	Ausbeute
10	Methyl	Pentyl	111-67-1	84 %
11	Methyl	Hexyl	2216-38-8	50 %
12	Ethyl	Propyl	592-78-9	90 %
13	Ethyl	Butyl	592-98-3	49 %
14	Ethyl	Pentyl	20063-77-8	88 %
15	Propyl	Propyl	592-99-4	87 %
16	Propyl	Butyl	2198-23-4	80 %
17	Phenyl	Methyl	637-50-3	83 %
18	Phenyl	Ethyl	824-90-8	69 %
19	Phenyl	Propyl	826-18-6	89 %
20	Phenyl	Butyl	828-15-9	64 %
21	4-Ethylphenyl	Methyl	74532-89-1	89 %
22	4-Methoxyphenyl	Methyl	104-46-1	71 %
23	Isopropyl	Methyl	4461-48-7	95 %
24	Isopropyl	Propyl	17618-76-7	95 %
25	2-Methylpropyl	Methyl	3404-62-4	75 %
26	2-Methylpropyl	Propyl	64501775	74 %

**10-26**

Die so erhaltenen Olefine konnten mittels racemischer Sharpless-Dihydroxylierung^[18] mit Kaliumosmat als Dihydroxylierungs-Reagenz, Kaliumhexacyanoferrat(III) als Cooxidans und DABCO als unchiralem Liganden in die entsprechenden 1,2- Diole überführt werden.

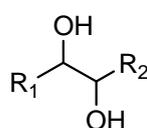


Schema 12: Racemische Sharpless-Dihydroxylierung

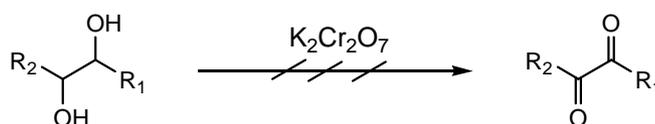
Tabelle 3: Ausbeute und Struktur synthetisierter 1,2-Diole.

1,2-Diole	Rest R¹	Rest R²	CAS-Nummer	Ausbeute
27	Methyl	Pentyl	20653-90-1	59 %
28	Methyl	Hexyl	124006-55-9	79 %
29	Ethyl	Propyl	62593-33-3	27 %
30	Ethyl	Butyl	99799-31-2	96 %
31	Ethyl	Pentyl	204987-20-2	87 %
32	Propyl	Propyl	22607-10-9	51 %
33	Propyl	Butyl	58159-12-9	67 %
34	Phenyl	Methyl	1855-09-0	79 %
35	Phenyl	Ethyl	22607-13-2	82 %
36	Phenyl	Propyl	858839-14-0	80 %
37	Phenyl	Butyl	17814-18-7	93 %

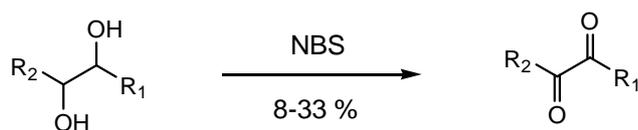
38	4-Ethylphenyl	Methyl	51410-48-1	62 %
39	4-Methoxyphenyl	Methyl	178035-22-8	81 %
40	Methyl	Isopropyl	7795-79-1	87 %
41	Propyl	Isopropyl	84248-90-8	61 %
42	Methyl	2-Methylpropyl	151750-70-8	48 %
43	Propyl	2-Methylpropyl	183713-13-9	61 %

**27-43**

Die abschließende Oxidation der Dirole zu den entsprechenden Diketonen konnte prinzipiell auf drei verschiedene Arten erfolgen. Mit Cr(VI) als Oxidationsmittel fand lediglich eine Oxidation zu den entsprechenden α -Hydroxyketonen statt.

**Schema 13:** Oxidation der Dirole mit Cr(VI)

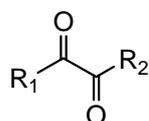
Die Oxidation der Dirole mit NBS als Oxidationsmittel, wie in Teil 2.1.1 beschrieben, führte in den meisten Fällen zu einem schwer zu trennenden Gemisch der bevorzugt gebildeten α -Hydroxyketone mit dem gewünschten Diketon. Außerdem fanden als Nebenreaktionen vermutlich Bromierungen der Alkylkette statt. Aus diesen Gründen erwies sich NBS nicht als Oxidationsmittel der Wahl zur Oxidation der 1,2-Dirole.



Schema 14: Oxidation der 1,2-Diole mit NBS.

Tabelle 4: Ausbeute und Struktur synthetisierter 1,2-Dione.

1,2-Dione	Rest R ¹	Rest R ²	CAS-Nummer	Ausbeute
44	Ethyl	Propyl	57733-23-0	33 %
45	Ethyl	Butyl	3457-39-4	15 %
46	Ethyl	Pentyl	6124-64-7	11 %
47	Propyl	Butyl	24610-09-1	13 %
48	Phenyl	Butyl	33720-29-5	12 %
49	4-Methoxyphenyl	Methyl	99865-21-1	8 %



44-49

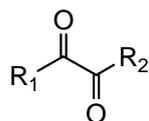
IBX als Oxidationsmittel hingegen führte zu einer vollständigen Oxidation der Diole, ohne die Bildung von α -Hydroxyketonen als Nebenprodukt, wodurch eine beträchtlich Steigerung der Ausbeuten im Vergleich zur Oxidation mit NBS möglich war. Weitere Vorteile der Verwendung von IBX sind die recht milden Reaktionsbedingungen (RT) und die leichte Abtrennbarkeit der ebenfalls als Reaktionsprodukt anfallenden 2-Iodosobenzoesäure (IBA). Im Gegensatz zu vielen anderen Oxidationsmitteln, die für die Oxidation von 1,2-Diolen zu 1,2-Diketonen in Frage kommen, besteht außerdem bei der Verwendung von IBX nicht die Gefahr einer Glykolspaltung als Nebenreaktion.



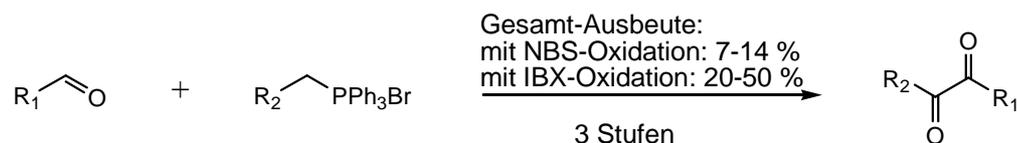
Schema 15: Oxidation der 1,2-Diole mit IBX.

Tabelle 5: Ausbeute und Struktur synthetisierter 1,2-Diketone.

1,2-Dione	Rest R ¹	Rest R ²	CAS-Nummer	Ausbeute
51	Methyl	Pentyl	855-25-1	40 %
52	Methyl	Hexyl	57644-90-3	48 %
53	Propyl	Propyl	7275-17-4	46 %
54	Phenyl	Methyl	647864-30-0	64 %
55	Phenyl	Ethyl	3457-55-4	47 %
56	Phenyl	Propyl	20895-66-3	72 %
57	4-Ethylphenyl	Methyl	10557-27-4	71 %
58	Isopropyl	Methyl	54073-38-0	75 %
59	Isopropyl	Propyl	19060-25-4	64 %
60	2-Methyl-propyl	Methyl	54073-36-8	68 %
61	2-Methyl-propyl	Propyl	6485-01-4	71 %



51-61



Schema 16: „Wittig-Route“ zur Synthese von α -Diketonen.

Tabelle 6: Gesamtausbeuten der 1,2-Diketone. In Klammern ist aufgeführt, welches Oxidationsmittel verwendet wurde.

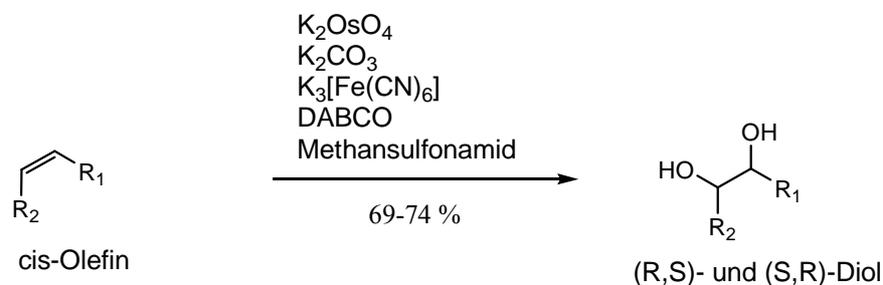
Produkt	Gesamtausbeute
3,4-Heptandion	8 % (NBS)
3,4-Octandion	7 % (NBS)
3,4-Nonandion	9 % (NBS)
4,5-Octandion	20 % (IBX)
4,5-Nonandion	7 % (NBS)
2,3-Octandion	20 % (IBX)
2,3-Nonandion	19 % (IBX)
2-Methyl-3,4-pentandion	50 % (IBX)
2-Methyl-4,5-hexandion	24 % (IBX)
2-Methyl-3,4-heptandion	28 % (IBX)
2-Methyl-4,5-octandion	40 % (IBX)
1-Phenylpropan-1,2-dion	40 % (IBX)
1-Phenylbutan-1,2-dion	27 % (IBX)
1-Phenylpentan-1,2-dion	28 % (IBX)
1-Phenylhexan-1,2-dion	7 % (NBS)
1-(4-Ethylphenyl)propan-1,2-dion	39 % (IBX)
1-(4-Methoxyphenyl)propan-1,2-dion	14 % (NBS)

In Tab. 6 sind die Ausbeuten der synthetisierten α -Diketone aufgeführt, wobei eindeutig zu erkennen ist, dass die Verwendung von IBX als Oxidationsmittel zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamtausbeuten führte.

Aufgrund der geringen Gesamtausbeute von 5 %, die über die „Corey-Seebach-Route“ erhalten wurde, erwies sich die „Wittig-Route“ mit den in Tab. 6 dargestellten Gesamtausbeuten als der besser geeignete Weg zur Synthese von α -Diketonen.

2.1.4 Synthese der (R,S)- und (S,R)-Dirole

Die racemischen Gemische der (R,S)- und (S,R)-Enantiomere von 1-Phenylpropan-1,2-diol und 2,3-Heptandiol konnten ausgehend von den käuflich erworbenen cis-Olefinen durch racemische Dihydroxylierung nach Sharpless wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben dargestellt werden.

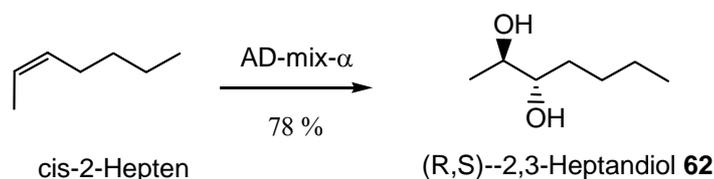


Schema 17: Racemische Dihydroxylierung eines cis-Olefins.

Tabelle 7: Ausbeuten der racemischen Sharpless-Dihydroxylierungen

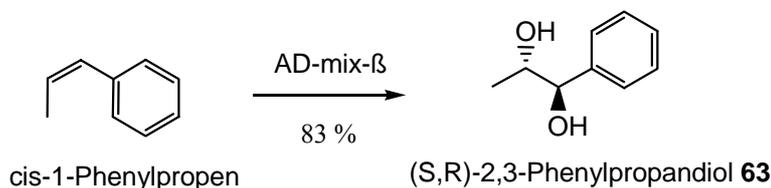
Produkt	Ausbeute
(R,S)-, (S,R)-Heptan-2,3-diol	69 %
(R,S)-, (S,R)-1-Phenylpropan-1,2-diol	74 %

Die Synthese des (R,S)-Enantiomers von 2,3-Heptandiol erfolgte mit AD-mix α allerdings nur mit einem ee von 20 %. Die Selektivität der chiralen Liganden ist wie schon von Sharpless beschrieben^[22] mit cis-Olefinen recht gering.



Schema 18: Asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless von cis-2-Hepten.

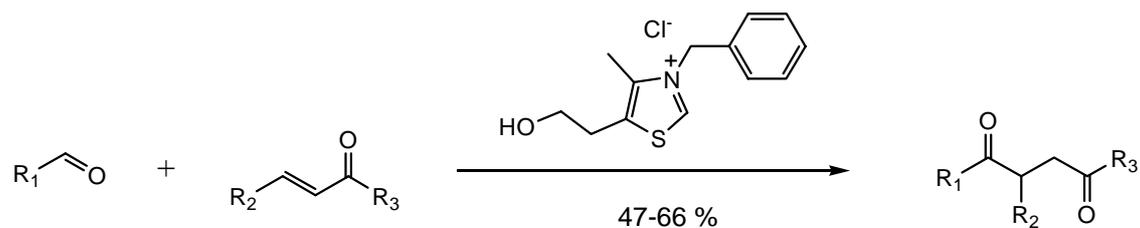
Die Synthese von (S,R)- 1-Phenylpropan-1,2-diol wurde mit AD-mix β in tertButanol/Wasser 50/50 durchgeführt. Auch hier wurde ein geringer ee-Wert von 30 % erzielt. Der ee wurde hierbei jeweils mit Hilfe von Gaschromatographie an einer chiralen Festphase (Lipodex E, 6-Butanoyl-2,3-o-pentyl- γ -Cyclodextrin) bestimmt.



Schema 19: Asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless von cis-1-Phenylpropen.

2.1.5 Synthese der γ -Diketone

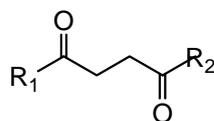
Die γ -Diketone konnten durch eine Stetter-Reaktion^[24] mit 3-Benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumchlorid als Katalysator, wie in Schema 20 dargestellt, synthetisiert werden.



Schema 20: Synthese der γ -Diketone.

Tabelle 8: Ausbeute und Struktur synthetisierter 1,4-Diketone.

1,4-Diketone	Rest R ¹	Rest R ²	CAS-Nummer	Ausbeute
64	Methyl	Ethyl	1703-51-1	47 %
65	Methyl	Propyl	3214-41-3	56 %
66	Methyl	Butyl	25234-82-6	48 %
67	Methyl	Pentyl	51575-16-7	4 %
68	Methyl	Hexyl	7018-92-0	56 %
69	Methyl	Phenyl	583-05-1	66 %
70	Methyl	Isopropyl	13901-85-4	59 %
71	Methyl	2-Methylpropyl	53626-90-7	65 %



64-71

2.2 Untersuchung des Substratspektrums der GatDH aus *Rhodobacter sphaeroides* D

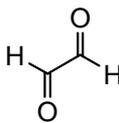
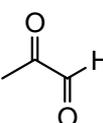
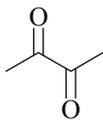
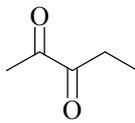
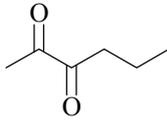
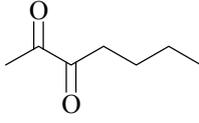
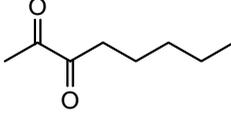
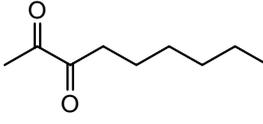
Um einen Überblick zu erhalten, welche Substanzen von der GatDH reduziert werden, wurden aliphatische, cyclische und aromatische Vertreter verschiedener Substanzklassen als Substrate für die GatDH untersucht. Außer den 1,2-Diketonen gehörten auch 1,3- und 1,4-Diketone sowie diverse Hydroxyketone und Ketoester zum Kreis der untersuchten Substanzen. Auf diese Weise sollte das Substratspektrum für die Reduktionsreaktion ermittelt werden. Hierzu wurde für jede Substanz ein Aktivitätstest durchgeführt, bei dem der Verbrauch des Coenzym NADH als Messgröße diente, da für jedes umgesetzte Substratmolekül mindestens ein Äquivalent des Coenzym NADH verbraucht wird. Dieser Verbrauch an NADH kann direkt UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden, da der Cofaktor bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzt. Wenn ein Verbrauch an NADH, d.h. eine Abnahme der Absorption bei 340 nm über den Zeitraum von 1 min, feststellbar war, wurde die Substanz als Substrat der GatDH eingestuft. Im Folgenden ist ein Beispielansatz für die Ermittlung der GatDH-Aktivität aufgeführt.

Ansatz zur Bestimmung der GatDH-Aktivität für die Reduktionsreaktion der GatDH:

KP-Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, 1 mM MgCl ₂ , pH 6.5)	600 µl
Getestete Verbindung (Stammlösung 20 mM in KP-Puffer)	200 µl
NADH-Lösung (20 mM in bidest. Wasser)	10 µl
GatDH-Lösung (0.1 mM in 20 mM Bistris-HCl-Puffer, 1 mM MgCl ₂ , pH 8.0)	10 µl

Die Ermittlung der kinetischen Daten für die Verbindungen, die einen Umsatz mit dem Enzym zeigten, wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

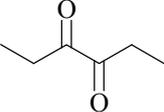
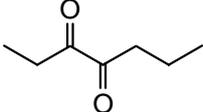
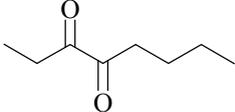
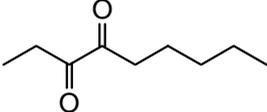
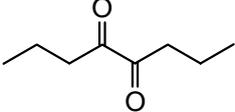
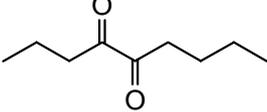
Tabelle 8: Aliphatische α -Diketone, die als potentielle Substrate der GatDH getestet wurden.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Glyoxal		-
Methylglyoxal		+
2,3-Butandion		+
2,3-Pentandion		+
2,3-Hexandion		+
2,3-Heptandion		+
2,3-Octandion		+
2,3-Nonandion		+

Alle getesteten 2,3-Diketone zeigten einen deutlichen Umsatz mit der GatDH und können daher als deren Substrate bezeichnet werden.

In Tab. 9 sind weitere unverzweigte 1,2-Diketone aufgeführt, die auf GatDH-Aktivität untersucht wurden.

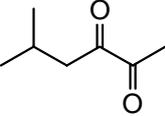
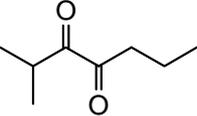
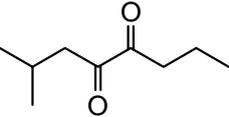
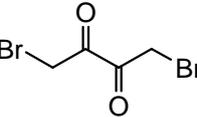
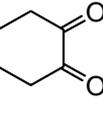
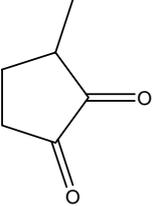
Tabelle 9: Weitere getestete aliphatische 1,2-Diketone

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
3,4-Hexandion		+
3,4-Heptandion		+
3,4-Octandion		+
3,4-Nonandion		+
4,5-Octandion		+
4,5-Nonandion		+

Nicht nur 2,3-Diketone, sondern auch alle untersuchten 3,4- und 4,5-Diketone wurden von der GatDH reduziert.

Insgesamt erwiesen sich alle getesteten aliphatischen α -Diketone als Substrate der GatDH mit Ausnahme des kleinsten Vertreters, des Glyoxals.

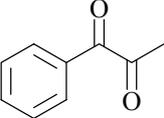
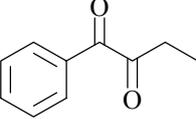
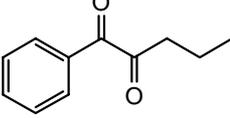
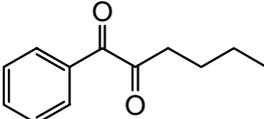
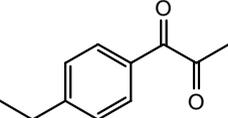
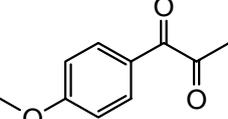
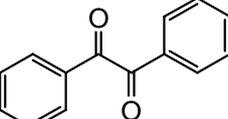
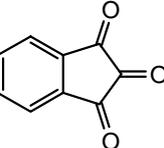
Tabelle 10: Als Substrate der GatDH getestete verzweigte, halogenhaltige und cyclische α -Diketone.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
2-Methyl-4,5-hexandion		+
2-Methyl-3,4-heptandion		+
2-Methyl-4,5-octandion		+
1,4-Dibrom-2,3-butandion		+
1,2-Cyclohexandion		+
3-Methylcyclopentan-1,2-dion		-

Während bei allen getesteten verzweigten α -Diketonen eine GatDH-Aktivität feststellbar war, wurde von den beiden cyclischen nur 1,2-Cyclohexandion umgesetzt. Überraschenderweise erwiesen sich auch 1,4-Dibrom-2,3-butandion trotz seiner beiden sperrigen Bromsubstituenten und

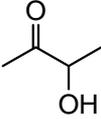
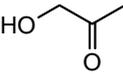
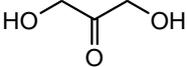
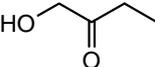
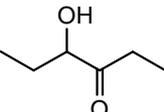
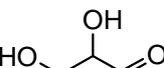
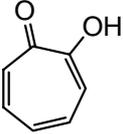
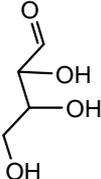
das sterisch sehr anspruchsvolle 2-Methyl-4,5-octandion als Substrate der GatDH.

Tabelle 11: Auf Enzymaktivität getestete α -Diketone mit aromatischen Resten.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
1-Phenylpropan 1,2-dion		+
1-Phenylbutan-1,2-dion		+
1-Phenylpentan-1,2-dion		-
1-Phenylhexan-1,2-dion		-
1-(4-Ethylphenyl)propan-1,2-dion		+
1-(4-Methoxyphenyl)propan-1,2-dion		+
Benzil		-
Ninhydrin		+

In der homologen Reihe der 1-Phenylalkan-1,2-dione ist ab 1-Phenylpentan-1,2-dion keine GatDH-Aktivität mehr zu beobachten. Auch mit dem sterisch recht anspruchsvollen Benzil erfolgt keine enzymatische Umsetzung während Substrate mit weiteren Substituenten am Aromaten durchaus von der GatDH reduziert wurden.

Tabelle 12: Substratspektrum der getesteten α -Hydroxyketone.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Acetoin		+
Hydroxyacetone		+
Dihydroxyacetone		+
1-Hydroxy-2-butanone		+
3-Hydroxy-4-hexanone		-
D,L-Glycerinaldehyd		-
Tropolon		-
D-(-)-Erythrose		+

α -Hydroxyketone sind aufgrund ihrer reduzierbaren Carbonylgruppe in direkter Nachbarschaft zu einer oder mehreren Hydroxygruppen ebenfalls potentielle Substrate der GatDH. Darüber hinaus wird weiter unten gezeigt, dass diese Verbindungsklasse als Zwischenprodukte sowohl der Oxidations- als auch der Reduktionsreaktion gebildet werden.

Wie erwartet sind die meisten α -Hydroxyketone Substrate der GatDH. Außerdem wurden verschiedene Zucker, die strukturell gesehen auch zur Familie der Hydroxyketone bzw. Hydroxyaldehyde gezählt werden können, auf ihre Enzymaktivität getestet; nämlich: D-(+)-Glucose, D-(+)-Galactose, D-(-)-Fructose, D-(+)-Fucose, beta-D-Allose, L-(-)-Sorbose, D-(+)-Mannose, D-(-)-Tagatose, L-(+)-Arabinose, D-(-)-Lyxose, D-(-)-Ribose. Mit keiner dieser Substanzen konnte jedoch eine messbare Enzymaktivität beobachtet werden.

Von den getesteten β -Diketonen, die in Tab. 13 aufgeführt sind, zeigten lediglich Acetylaceton und 2-Methyl-4,6-heptandion eine messbare GatDH-Aktivität. Alle anderen stellen wohl aufgrund der ungünstigen 1,3-Position der Carbonylgruppen keine Substrate der GatDH dar.

Tabelle 13: Auf Enzymaktivität getestete β -Diketone.

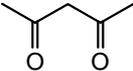
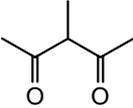
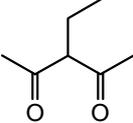
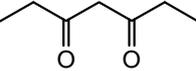
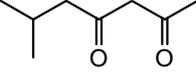
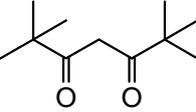
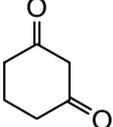
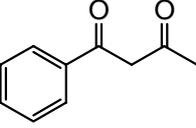
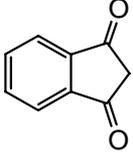
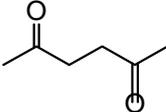
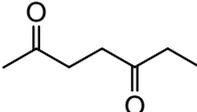
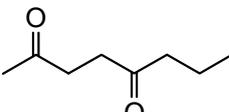
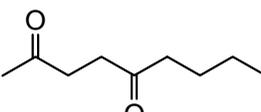
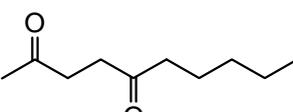
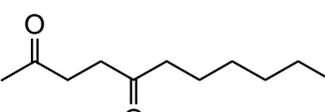
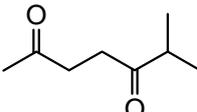
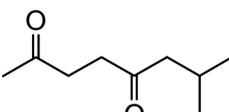
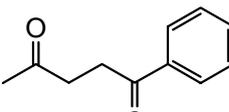
Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Acetylaceton		+
3-Methyl-2,4-pentandion		-
3-Ethyl-2,4-pentandion		-
3,5-Heptandion		-
2-Methyl-4,6-heptandion		+
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptandion		-
1,3-Cyclohexandion		-
Benzoylaceton		-
1,3-Indandion		-

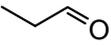
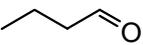
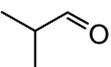
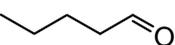
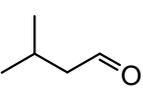
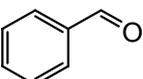
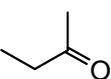
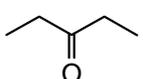
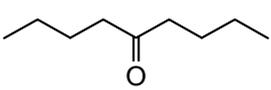
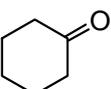
Tabelle 14: Auf Enzymaktivität getestete 1,4-Diketone.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Acetylaceton		+
2,5-Heptandion		+
2,5-Octandion		+
2,5-Nonandion		-
2,5-Decandion		-
2,5-Undecandion		-
6-Methyl-2,5-heptandion		-
7-Methyl-2,5-octandion		-
1-Phenyl-1,4-pentandion		+

Die aliphatischen γ -Diketone erwiesen sich nur bis zu einer Kettenlänge von acht C-Atomen als Substrate. Im Gegensatz zu 1,4-Diketonen mit

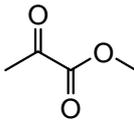
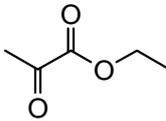
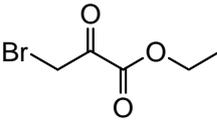
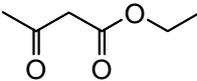
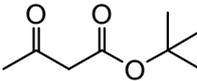
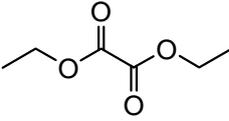
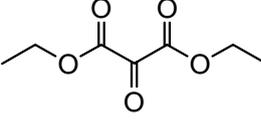
Kettenverzweigungen wurde 1-Phenyl-1,4-pentandion von der GatDH als Substrat akzeptiert.

Tabelle 15: Auf eventuelle Enzymaktivität getestete Aldehyde und Ketone.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Acetaldehyd		-
Propionaldehyd		-
Butyraldehyd		-
Isobutyraldehyd		-
Valeraldehyd		-
Isovaleraldehyd		-
Benzaldehyd		-
Aceton		-
2-Butanon		-
3-Pentanon		-
5-Nonanon		-
Cyclohexanon		-

Sowohl die getesteten Aldehyde als auch die Ketone erwiesen sich nicht als GatDH-Substrate.

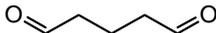
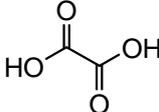
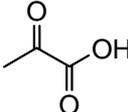
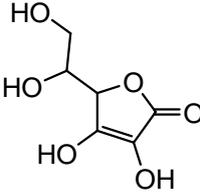
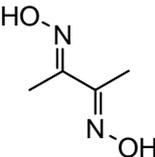
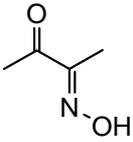
Tabelle 16: Auf Enzymaktivität getestete α - und β -Ketoester.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Methylpyruvat		+
Ethylpyruvat		+
Ethylbromopyruvat		+
Acetessigester		+
Tert-Butylacetoacetat		+
Oxalsäurediethylester		-
Diethylketomalonat		-

Außer Diethylketomalonat zeigten alle getesteten α - und β -Ketoester GatDH-Aktivität.

Mit Oxalsäurediethylester hingegen konnte kein Umsatz beobachtet werden.

Tabelle 17: Weitere auf Enzymaktivität getestete Verbindungen.

Substanz	Formel	von der GatDH umgesetzt
Glutaraldehyd		+
Oxalsäure		-
Brenztraubensäure		-
L-(+)-Ascorbinsäure (Vitamin C)		-
Dimethylglyoxim		-
Diacetylmonoxim		-

Außer bei der 1,5-Dicarbonylverbindung Glutaraldehyd konnte für keine andere der in Tab. 17 aufgeführten Verbindungen eine Umsetzung mit Galactitoldehydrogenase beobachtet werden.

Brenztraubensäure als Vertreter der α -Ketocarbonsäuren konnte wie Diacetylmonoxim, welches zur Familie der α -Ketooxime gehört, nicht als Substrat eingestuft werden.

2.3 Activesite-Titration der GatDH und Bestimmung von k_{cat} -Werten

Quantitative Proteinbestimmungen zur Konzentrationsbestimmung von Enzymen ergeben Werte, die nicht berücksichtigen, inwiefern das Enzym aktiv ist oder nicht. Daher ergeben sich große Probleme beim Vergleich kinetischer Parameter, die mit Enzymproben unterschiedlicher Chargen oder Lagerzeiten erhalten wurden. Zur Standardisierung wurde daher ein Verfahren angewendet, das eine quantitative Bestimmung der Konzentration an aktivem Enzym (activesite-Titration) erlaubt.

Die Bindung von NADH an das freie Enzym quencht die Intensität der Tryptophanfluoreszenz des Proteins. Die Tryptophanreste der GatDH wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Gemessen wurde die Emission für 340 nm, die in Abhängigkeit der hinzutitrierten Menge an NADH abnimmt. Die Auftragung der Emission bei 340 nm gegen die zugegebene NADH-Konzentration ergab so eine Titrationskurve (Abb.4), deren Äquivalenzpunkt der Totalkonzentration an aktivem Enzymmonomer entspricht. Der Äquivalenzpunkt ist erreicht, wenn alle vorhandenen Bindungsstellen mit NADH gesättigt sind. Er kann als Knick der Titrationskurve identifiziert werden. Obwohl nach Erreichen des Äquivalenzpunkts kein weiteres NADH vom Protein gebunden werden kann, nimmt die Emission dennoch weiterhin ab. Der Grund hierfür ist die im Verlauf der Titration steigende Konzentration an ungebundenem NADH, die aufgrund des Absorptionsmaximums von NADH bei 340 nm,

eine unmittelbare Absorption der von den Tryptophanresten emittierten Strahlung bewirkt.

Es wurde eine 99 μM NADH-Lösung in 5 μl -Schritten zu einer Enzymlösung titriert, welche die gleiche Enzymkonzentration enthielt, die auch zur Messung der Umsatzgeschwindigkeit von 2,3-Butandion eingesetzt wurde. Der Äquivalenzpunkt wurde nach Zugabe von 30 μl NADH-Lösung erreicht, was einer NADH-Konzentration von 0.9 μM und somit der Konzentration an aktivem GatDH-Monomer entspricht.

Die Umsatzgeschwindigkeit (v) bei 100 mM 2,3-Butandion (Sättigungskonzentration) wurde mit der gleichen Menge an Enzymlösung ermittelt und konnte mit Hilfe von Gleichung 2 in eine scheinbare Wechselzahl k_{app} umgerechnet werden.

$$v_{\text{max}} = k_{\text{app}} \cdot [E_0] \quad (\text{Gl.2})$$

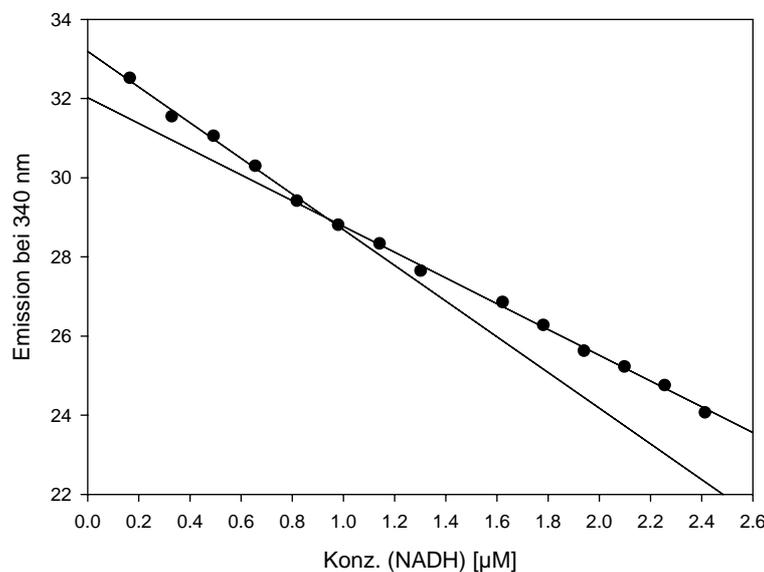


Abbildung 4: Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 340 nm in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration. Der Äquivalenzpunkt ist durch den Schnittpunkt der beiden Geraden kenntlich gemacht und ist bei einer NADH-Konzentration von 0.9 μM erreicht.

Mit Hilfe von Gl.2 und der ermittelten Umsatzrate von $17.00 \cdot 10^{-6}$ M/sec konnte nun der k_{app} -Wert für 100 mM 2,3-Butandion berechnet werden. Dieser betrug 18.9 sec^{-1} .

Für weitere Untersuchungen mit verschiedenen Enzymchargen konnte auf Activesite-Titration verzichtet werden. Stattdessen wurde jeweils mit 100 mM 2,3-Butandion eine Referenzmessung durchgeführt, die dann eine Berechnung von E_0 mittels Gl. 2 erlaubte.

Da alle anderen kinetischen Untersuchungen relativ zur Umsatzgeschwindigkeit von 2,3-Butandion durchgeführt wurden, war es so möglich für alle Substrate kinetische Parameter, d.h. k_{cat} - und K_M -Werte, zu berechnen, die von der jeweils verwendeten Enzymkonzentration unabhängig sind.

2.4 Steady-state-Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Substratumsetzung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration untersucht (steady-state-Kinetik). Auch hier konnten die Entstehung des Umsetzungsproduktes und der Verbrauch des Eduktes nicht direkt, sondern nur über den Verbrauch an NADH bei 340 nm spektroskopisch beobachtet werden. Die K_M - und k_{cat} -Werte wurden nun mit Hilfe von Sättigungskinetiken ermittelt, bei denen die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die jeweiligen Substratkonzentrationen aufgetragen wurden.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der GatDH wurden bei unterschiedlichen Substrat-konzentrationen gemessen, welche aus einem Bereich gewählt wurden, in dem eine Änderung der Substratkonzentration auch eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Die K_M - und k_{cat} -Werte wurden für die meisten Substrate mit Hilfe eines

hyperbolischen Fits ermittelt. Aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit konnten für einige Substanzen die Messungen nicht bis in den Sättigungsbereich der Reaktionsgeschwindigkeit durchgeführt werden. Für die Substanzen, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit nur im linearen Bereich bestimmt werden konnte, wurde die Steigung durch lineare Regression ermittelt.

$$v = \frac{k_{cat} * [E_0] * [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl. 3}) \quad \text{für } [S] \ll K_M: v = \frac{k_{cat} * [E_0] * [S]}{K_M} \quad (\text{Gl. 4})$$

Da es sich im linearen Bereich um eine Reaktion pseudo-erster Ordnung handelt, stellt die Steigung k_{cat}/K_M dar.

Das Verhältnis k_{cat}/K_M beschreibt die Spezifität oder katalytische Effizienz eines Enzyms gegenüber einem Substrat. Hierdurch lassen sich alle Substrate direkt miteinander vergleichen. Je größer der k_{cat}/K_M -Wert, desto besser wird ein Substrat vom jeweiligen Enzym umgesetzt. Das beschriebene Verfahren setzt voraus, dass die Umsatzkinetik eines untersuchten Substrates tatsächlich eine hyperbolische Sättigung mit steigender Substratkonzentration zeigt, also eine Michaelis-Menten-Kinetik. Nur für diesen Fall sind k_{cat} und K_M aus Gl. 3 definiert.

Da alle 2,3-Diketone und γ -Diketone sowie die meisten Ketoester nicht der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchen, konnten für diese Substanzen keine K_M -Werte ermittelt werden. Um die kinetischen Daten für diese Substrate ermitteln zu können, musste zuerst ein dem Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit angepasstes Modell gefunden werden (siehe Abschnitt 2.5).

In Abb.5 sind die Sättigungskinetiken für 2,3-Butandion und 2,3-Octandion dargestellt, wobei im Falle des 2,3-Butandions ein hyperbolischer Fit (k_{cat} : $18.89 \text{ s}^{-1} \pm 0.51$; K_M : $8.31 \text{ mM} \pm 0.95$) nach

Michaelis-Menten über die Messdaten gelegt wurde, der aber offensichtlich nicht ideal passte.

Im Falle des 2,3-Octandions erreicht die Reaktionsgeschwindigkeit keine Sättigung, sondern durchläuft ein Maximum bei einer Substratkonzentration von ungefähr 0.6 mM. Nach Erreichen dieses Maximums nimmt die Geschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration ab. Die gleiche Tendenz ist bei 2,3-Butandion ebenfalls zu erkennen, allerdings weniger stark ausgeprägt. Zur Ermittlung kinetischer Parameter der enzymatischen Umsetzungen dieser Verbindungen ist die Michaelis-Menten-Kinetik offensichtlich ungeeignet..

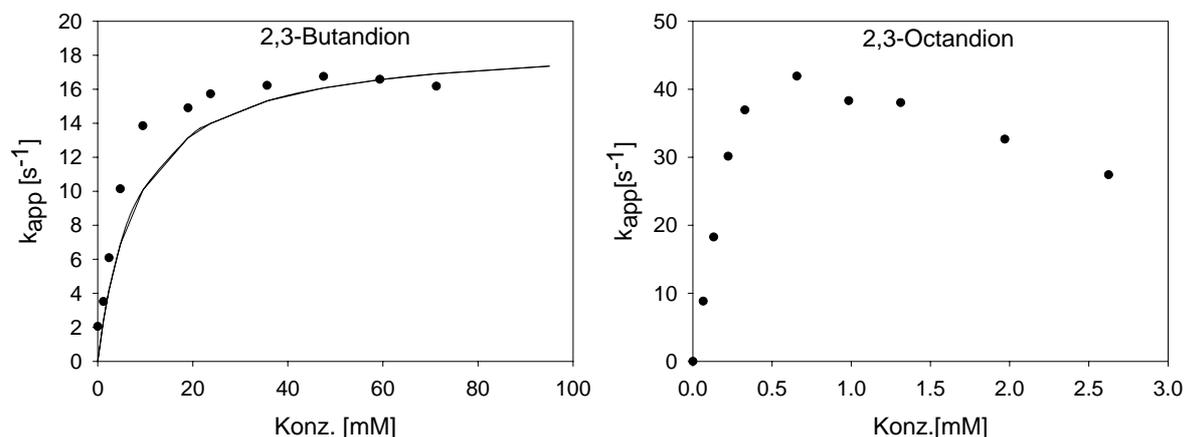


Abbildung 5: Sättigungskinetiken von 2,3-Butandion und 2,3-Octandion.

Abb.6 zeigt die Sättigungskinetiken von Ethylpyruvat und 2,5-Heptandion. Die theoretischen Kurven wurden durch nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Gleichung erhalten. Für Ethylpyruvat wurde durch den Fit nach Michaelis-Menten ein k_{cat} -Wert von $0.89 \text{ s}^{-1} \pm 0.05$ und ein K_{M} -Wert von $0.71 \text{ mM} \pm 0.17$ ermittelt. Für 2,5-Heptandion wurde durch den Fit nach Michaelis-Menten ein k_{cat} -Wert von $0.21 \text{ s}^{-1} \pm 0.03$ und ein K_{M} -Wert von $1.59 \text{ mM} \pm 0.64$ ermittelt. Auch in Abb. 6 sind

deutliche Abweichungen der theoretischen Kurven (durchgezogene Linie) vom Verlauf der Messpunkte zu erkennen.

Die Sättigungskinetiken von Ethylpyruvat und 2,5-Heptandion weisen, wie schon die eben gezeigten 2,3-Diketone, nicht den klassischen hyperbolischen Verlauf nach Michaelis-Menten auf. Die Kurven knicken bei einer gewissen Substratkonzentration abrupt ab und erreichen die Sättigung.

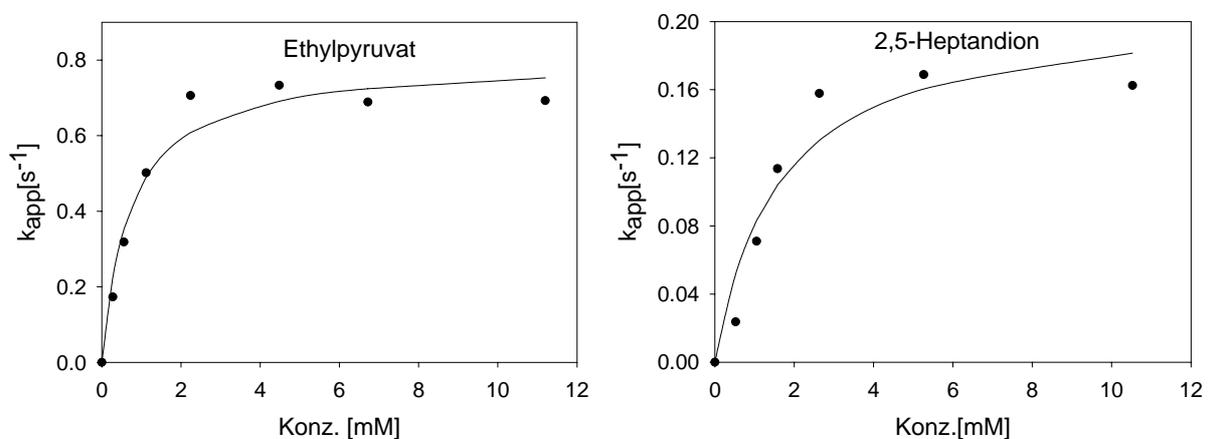


Abbildung 6: Sättigungskinetiken von Ethylpyruvat und 2,5-Heptandion.

In Abb. 7 sind die Kinetiken zweier α -Diketone dargestellt, die beide einen charakteristischen hyperbolischen Verlauf der Sättigungskinetik zeigen. Für diese Verbindungen konnten k_{cat} und K_M -Werte durch hyperbolische Fits nach Michaelis und Menten ermittelt werden.

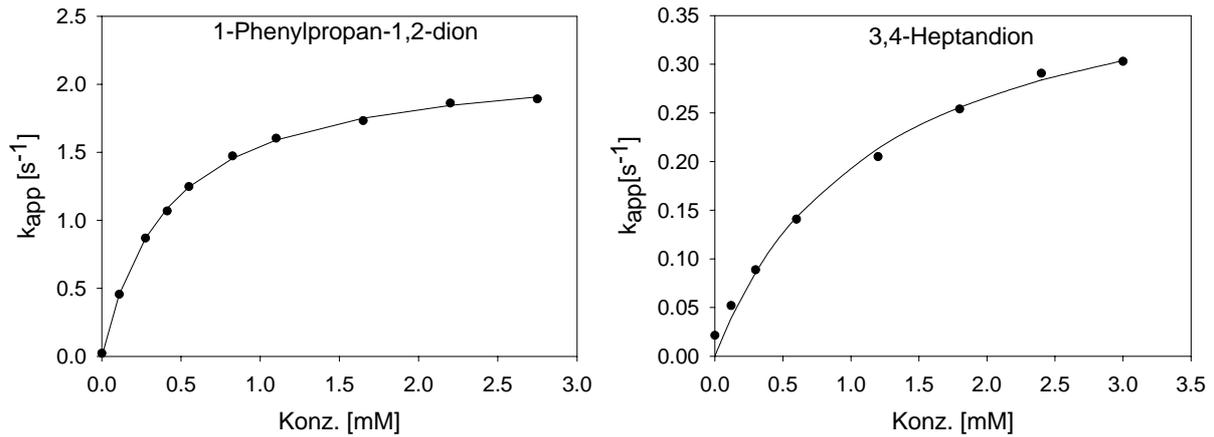


Abbildung 7: Sättigungskinetiken von 1-Phenylpropan-1,2-dion und 3,4-Heptandion.

Alle gemessenen Kinetiken der 1,3-Diketone und α -Hydroxyketone gehorchten, wie in Abb. 8 am Beispiel von zwei Vertretern dieser Stoffklassen gezeigt wird, der Michaelis-Menten-Kinetik.

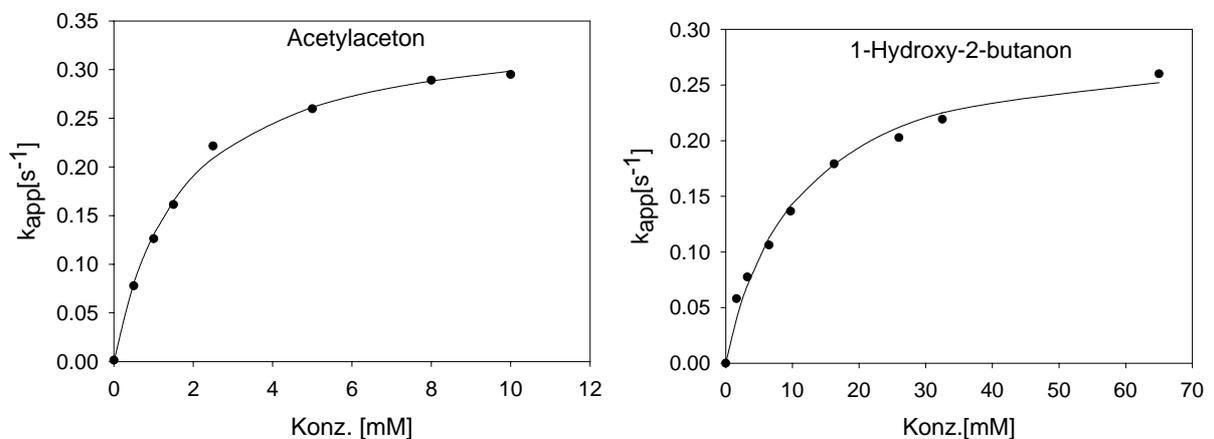


Abbildung 8: Sättigungskinetiken von Acetylaceton und 1-Hydroxy-2-butanon.

Obwohl Ethyl- und Methylpyruvat keine Michaelis-Menten-Kinetik aufweisen, zeigen Acetessigester als β -Ketoester und Ethylbromopyruvat als bromierter α -Ketoester einen klassischen hyperbolischen Verlauf der Sättigungskurve.

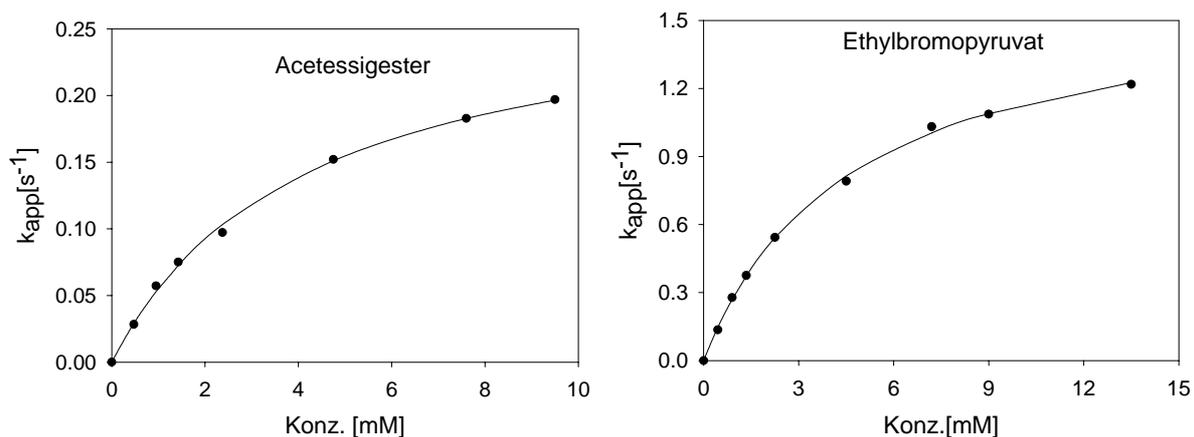


Abbildung 9: Sättigungskinetiken von Acetessigester und Ethylbromopyruvat.

Auch Glutaraldehyd als 1,5-Dialdehyd zeigt den Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik, während alle gemessenen 1,4-Diketone nicht diesem Modell gehorchen.

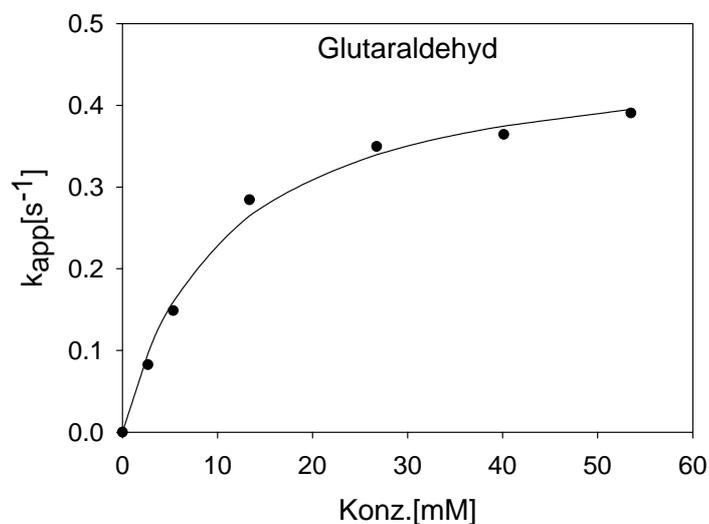
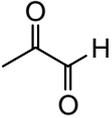
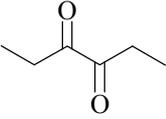
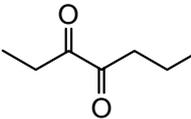
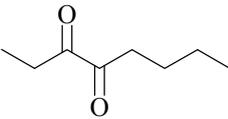
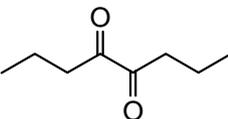
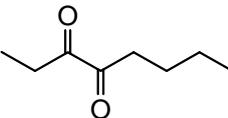
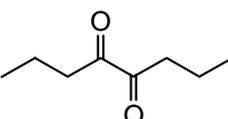


Abbildung 10: Sättigungskinetik von Glutaraldehyd.

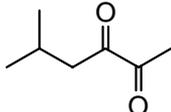
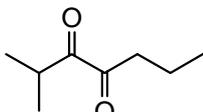
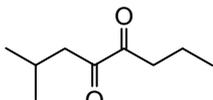
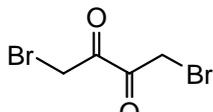
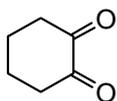
Die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) liegt, wie in Tab. 18 gezeigt, für alle aliphatischen 1,2-Diketone ungefähr im gleichen Bereich. Lediglich Methylglyoxal bildet hierbei mit einem um fast eine Zehnerpotenz geringeren $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert eine Ausnahme.

Tabelle 18: Kinetische Daten der aliphatischen 1,2-Diketone, die nach Michaelis und Menten ausgewertet werden konnten.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [(mM*sec)⁻¹]
Methylglyoxal		n.b.	n.b.	0.042 *
3,4-Hexandion		0.200 ± 0.003	1.2 ± 0.1	0.164
3,4-Heptandion		0.42 ± 0.03	1.18 ± 0.19	0.36
3,4-Octandion		3.06 ± 0.16	1.15 ± 0.14	2.11
4,5-Octandion		n.b.	n.b.	0.85 *
3,4-Nonandion		0.050 ± 0.003	0.20 ± 0.07	0.25
4,5-Nonandion		0.050 ± 0.003	0.20 ± 0.07	0.24

* Aus der Steigung der linearen Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration ermittelt.

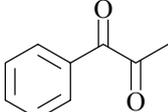
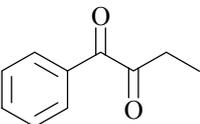
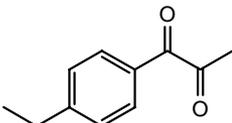
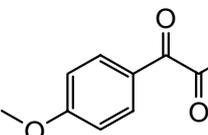
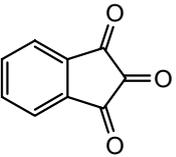
Tabelle 19: Kinetische Daten der verzweigten, cyclischen oder halogenhaltigen 1,2-Diketone.

Substra t	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [(mM*sec)⁻¹]
2-Methyl- 4,5- hexandion		0.090 ± 0.003	0.7 ± 0.1	0.13
2-Methyl- 3,4- heptandion		0.44 ± 0.03	0.88 ± 0.17	0.09
2-Methyl- 4,5- octandion		n.b.	n.b.	0.007 *
1,4-Dibrom- 2,3- butandion		2.70 ± 0.16	0.35 ± 0.07	4.88
1,2-Cyclo- hexandion		n.b.	n.b.	0.196 *

* Aus der Steigung der linearen Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration ermittelt.

Die in Tab. 19 aufgeführten kinetischen Daten zeigen für die verzweigten 1,2-Diketone eine leicht verminderte katalytische Effizienz im Vergleich zu den aliphatischen Vertretern dieser Verbindungsklasse. Der k_{cat}/K_M -Wert von 1,2-Cyclohexandion liegt etwa im Bereich der Werte der aliphatischen Diketone, während 1,4-Dibrom-2,3-butandion trotz der sperrigen Bromsubstituenten eine erstaunlich hohe katalytische Effizienz aufweist.

Tabelle 20: Kinetische Daten von 1,2-Diketonen mit aromatischen Resten.

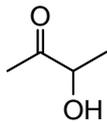
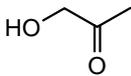
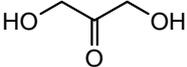
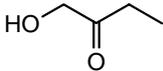
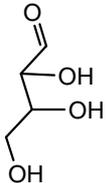
Substrat	Formel	k_{cat}	K_{M}	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$
		[1/sec.]	[mM]	[(mM*sec)⁻¹]
1-Phenylpropan-1,2-dion		2.20 ± 0.02	0.42 ± 0.01	5.23
1-Phenylbutan-1,2-dion		1.4 ± 0.1	0.79 ± 0.15	1.82
1-(4-Ethylphenyl)propan-1,2-dion		6.00 ± 0.24	1.39 ± 0.08	5.17
1-(4-Methoxyphenyl)propan-1,2-dion		1.28 ± 0.08	0.59 ± 0.08	2.17
Ninhydrin		n.b.	n.b.	0.04 *

* Aus der Steigung der linearen Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration ermittelt.

Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der α -Diketone mit aromatischem Rest sind deutlich größer als die der aliphatischen Diketone. Hierbei scheint, wie an den $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten von 1-Phenylpropan 1,2-dion und 1-(4-Ethylphenyl)-propan-

1,2-dion zu erkennen ist, eine Vergrößerung des Phenylrestes durch zusätzliche Alkylsubstituenten keinen besonderen Einfluss auf die katalytische Effizienz zu haben. Das Einführen einer Methoxygruppe am aromatischen Ring sowie der Austausch des Methylrestes in 2-Position gegen einen Ethylrest, wie bei 1-Phenylbutan-1,2-dion, verringern die Aktivität etwa um Faktor zwei bis drei.

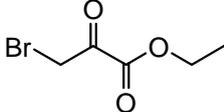
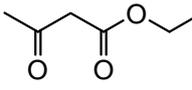
Tabelle 21: Kinetische Daten der α -Hydroxyketone.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [(mM*sec) ⁻¹]
Acetoin		2.19 ± 0.04	38.9 ± 3.0	0.17
Hydroxyacetone		1.13 ± 0.14	36.8 ± 7.9	0.03
Dihydroxyacetone		n.b.	n.b.	0.51 *
1-Hydroxy-2-butanone		0.29 ± 0.01	10.4 ± 1.2	0.028
D-(-)-Erythrose		n.b.	n.b.	5.72 *

* Aus der Steigung der linearen Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration ermittelt.

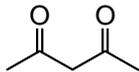
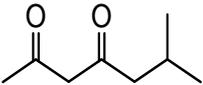
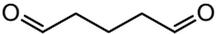
Die katalytische Effizienz der α -Hydroxyketone ist deutlich geringer als die der 1,2-Diketone. Während Acetoin und Dihydroxyaceton $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte im Bereich der inaktiveren aliphatischen α -Diketone aufweisen, ist die Aktivität der anderen Hydroxyketone um ca. eine Zehnerpotenz geringer. Eine Ausnahme bildet die D-(-)-Erythrose, die als einziger Zucker zu den Substraten gezählt werden kann, mit einem vergleichsweise hohen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $5.72 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Auffällig sind die hohen K_{M} -Werte der Hydroxyketone, die um mehr als eine Zehnerpotenz größer sind als die K_{M} -Werte der 1,2-Diketone.

Tabelle 22: Kinetische Daten der Ketoester, die nach Michaelis und Menten ausgewertet werden konnten.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_{M} [mM]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [(mM*sec) ⁻¹]
Ethylbromopyruvat		1.64 ± 0.03	4.58 ± 0.21	0.36
Acetessigester		0.28 ± 0.01	4.1 ± 0.3	0.07

Die Aktivität von Acetessigester ist um fast eine Zehnerpotenz geringer als die des Ethylbromopyruvats, dessen katalytische Effizienz ungefähr gleich der der meisten aliphatischen Diketone ist.

Tabelle 23: Kinetische Daten weiterer Diketone.

Sub- strat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_{M} [mM]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [(mM*sec) ⁻¹]
Acetylaceton		0.35 ± 0.01	1.66 ± 0.11	0.21
6-Methylheptan-2,4-dion		1.58 ± 0.13	2.16 ± 0.41	0.73
Glutaraldehyd		0.47 ± 0.02	10.5 ± 1.4	0.05

Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der 1,3-Diketone liegen im Bereich der Werte für die aliphatischen Diketone, während Glutaraldehyd wahrscheinlich aufgrund der 1,5-Positionierung der beiden Carbonylgruppen ein deutlich schlechteres Substrat darstellt.

2.5 Numerische Bestimmung kinetischer Parameter

Mit Hilfe des Programms Dynafit^[26], das postulierte Mechanismen einer enzymatischen Reaktion über den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten numerisch anpasst, sollte ein Mechanismus ermittelt werden, der die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten der Substrate, die nicht der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten, zutreffend beschreibt.

befindet sich, wie schon aus der Michaelis-Menten-Gleichung bekannt, ein Substratmolekül im aktiven Zentrum. Enzymsubstratkomplex 2 (ESS) hingegen bindet zwei Substratmoleküle.

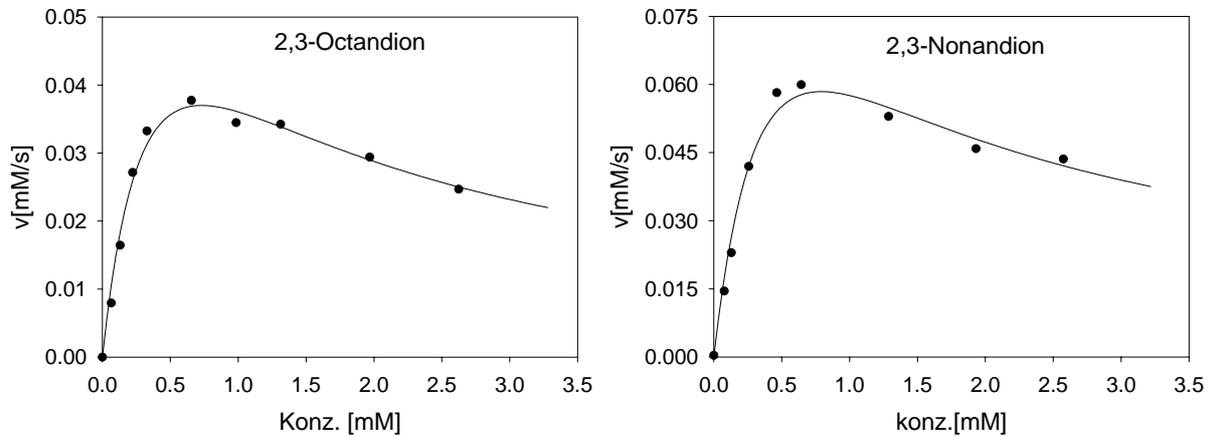


Abbildung 11: Sättigungskinetiken von 2,3-Octandion und 2,3-Nonandion mit theoretischen Kurven, die durch numerische Anpassung des Mechanismus in Schema 21 erhalten wurden.

Abb. 11 zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeitsverläufe für 2,3-Octandion und 2,3-Nonandion durch den postulierten Mechanismus gut erklärt werden können.

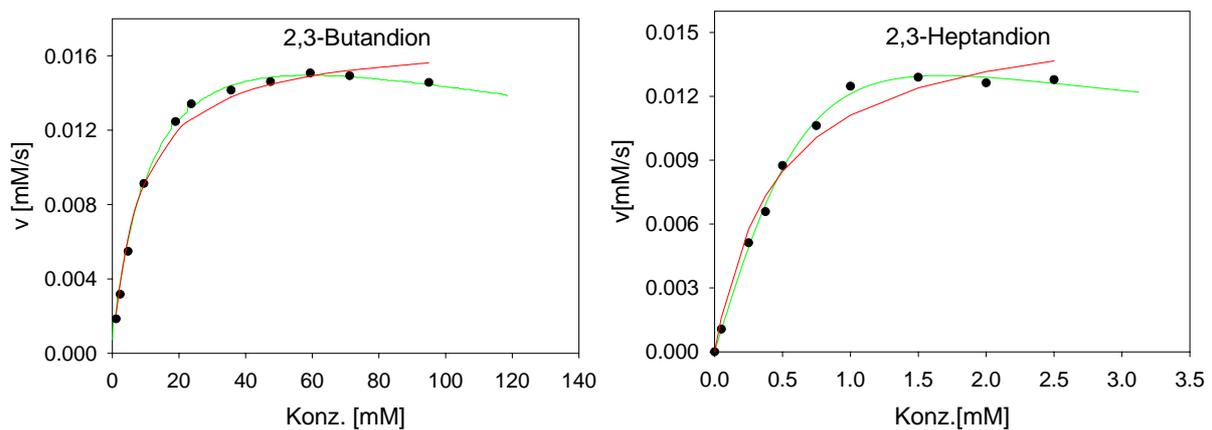


Abbildung 12: Sättigungskinetiken von 2,3-Butandion und 2,3-Heptandion Fit nach Michaelis-Menten (rot), Fit nach dem mittels Dynafit ermittelten Modell (grün).

Die Kurvenverläufe für 2,3-Butandion und 2,3-Heptandion zeigen ebenfalls nach Erreichen eines Maximums eine mit steigender Substratkonzentration abnehmende Geschwindigkeit. Hierbei ist deutlich zu sehen, dass der Reaktionsverlauf durch den postulierten Mechanismus wesentlich besser beschrieben wird als durch das Michaelis-Menten-Modell.

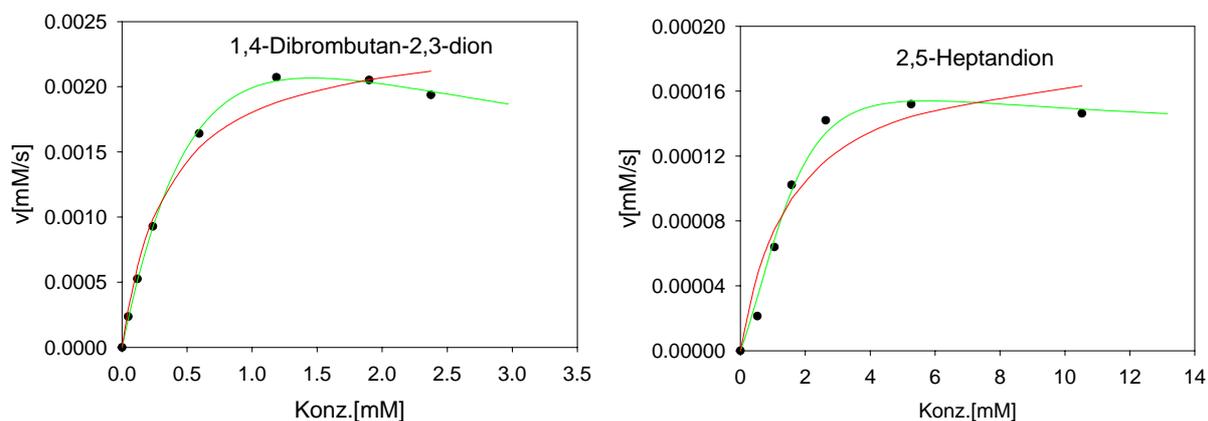


Abbildung 13: Sättigungskinetiken von 1,4-Dibrombutan-2,3-dion und 2,5-Heptandion Fit nach Michaelis-Menten (rot), Fit nach dem mittels Dynafit ermittelten Modell (grün).

1,4-Dibrombutan-2,3-dion und 2,5-Heptandion zeigen Geschwindigkeitsverläufe, auf die der hyperbolische Fit nach Michaelis-Menten nur schlecht passt. Auch hier beschreibt der postulierte Mechanismus den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten wesentlich treffender.

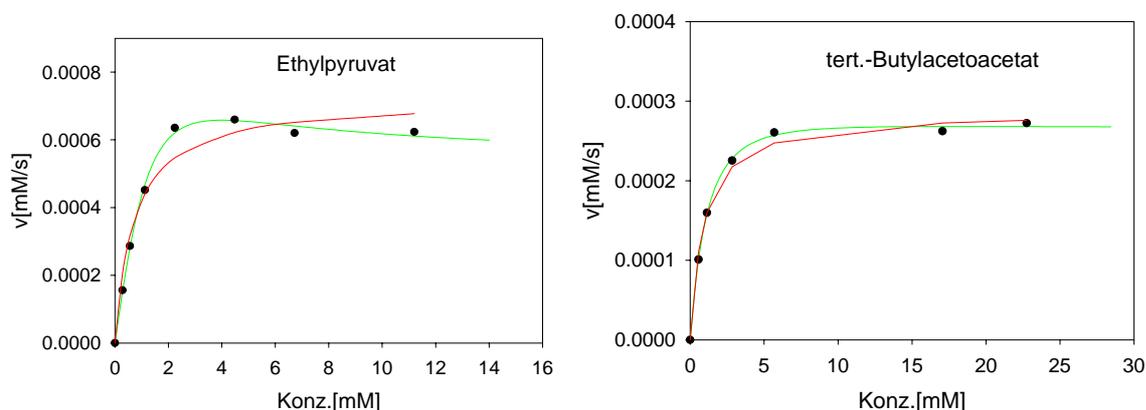


Abbildung 14: Sättigungskinetiken von Ethylpyruvat und tert.-Butylacetoacetat Fit nach Michaelis-Menten (rot), Fit nach dem mittels Dynafit ermittelten Modell (grün).

Die beiden Ketoester Ethylpyruvat und tert. Butylacetoacetat, die beide wie die bisher beschriebenen 2,3-Diketone keinen hyperbolischen Kurvenverlauf aufweisen, werden ebenfalls mit dem postulierten Mechanismus gut beschrieben.

Die mit Hilfe von Sättigungskinetiken ermittelten Verläufe der Anfangsgeschwindigkeiten jedes Substrates wurden mit dem in Schema 21 postulierten Modell ausgewertet. Das Programm *DynaFit* verwendet hierzu ein numerisches Integrationsverfahren. Die hierbei erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten stellen statistisch gesehen keine voneinander unabhängigen Werte dar. Die Aussagekraft der erhaltenen Parameter hängt stark von der zugrundeliegenden Datenstruktur ab. Für die gleiche Sättigungskurve können unterschiedliche Kombinationen der gefitteten Parameter gleich gute Anpassungen liefern. Mit Hilfe des postulierten Modells werden somit sechs statistisch voneinander abhängige Werte durch einen Fit ermittelt. Als Ausgangsinformationen diene hierbei lediglich die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen verschiedene Substratkonzentrationen, welche über die Sättigungskinetiken erhalten wurde. Aufgrund der Korrelation der gefitteten Parameter ergeben sich teilweise sehr hohe statistische Fehler. Aus den folgenden theoretischen Überlegungen ergibt sich, dass die Aussagekraft einzelner erhaltener Geschwindigkeitskonstanten sehr gering sein kann, während jedoch ihr Verhältnis durchaus fundierte Schlussfolgerungen zulässt. So kann man die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Assoziation beider Enzym-Substrat-Komplexe zu den jeweiligen Dissoziationskonstanten zusammenfassen (Gl. 13/14). Hier sind die absoluten Werte der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten nicht von Bedeutung, lediglich ihr Verhältnis in Form der Gleichgewichtskonstanten. Aus diesen Gründen wird hier auf die Tabellierung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten verzichtet. Für die Konstanten k_S und k_D wurden stets gleich große Standardabweichungen erhalten. Das Gleiche gilt für die Standardabweichungen der Konstanten k_{S2} und k_{D2} .

$$K_{ES} = \frac{k_{D1}}{k_{S1}} \quad \text{Gl. (13)}$$

$$K_{ESS} = \frac{k_{D2}}{k_{S2}} \quad \text{Gl. (14)}$$

Die erhaltenen Werte für k_{cat} und k_{cat2} liegen trotz z.T. großer Standardabweichungen in einem vernünftigen Größenbereich, d.h. im Bereich der k_{cat} -Werte, die für andere Substrate über einen hyperbolischen Fit ermittelt wurden.

In Tab. 24 werden die k_{cat} -Werte, die nach Michaelis-Menten bestimmt wurden, mit den k_{cat} -Werten verglichen, die durch das Programm Dynafit über den postulierten Mechanismus berechnet wurden. Hierbei ist zu erkennen, dass die k_{cat} -Werte, die über nach dem Modell von Michaelis-Menten ermittelt wurden, stets niedrigere Werte annehmen als die über Dynafit ermittelten Werte.

Tabelle 24: Vergleich der k_{cat} -Werte des Fits nach Michaelis-Menten mit den der k_{cat} -Werten des Fits über das Modell, das mittels Dynafit ermittelt wurde.

Substrat	k_{cat} [s⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat1} [s⁻¹]
	Michaelis-Menten	Michaelis-Menten	ESS-Modell (Schema 21)
2,3-Butandion	18.9 ± 0.5	8.31 ± 0.95	24.0 ± 13
2,3-Heptandion	17.4 ± 0.8	0.43 ± 0.07	29.5 ± 35
1,4-Dibrom-butan-2,3-dion	2.7 ± 0.1	0.35 ± 0.07	5.6 ± 51
Ethylpyruvat	0.8 ± 0.05	0.71 ± 0.17	1.8 ± 34

In Tab.25 sind die kinetischen Daten aller Substrate aufgeführt, deren Kinetiken nicht mit dem Modell von Michaelis-Menten beschrieben werden konnten. Die mit dem Programm Dynafit errechneten Geschwindigkeits-

und Gleichgewichtskonstanten ergaben sich aus dem Fit des Verlaufs der Anfangsgeschwindigkeiten nach dem in Schema 21.

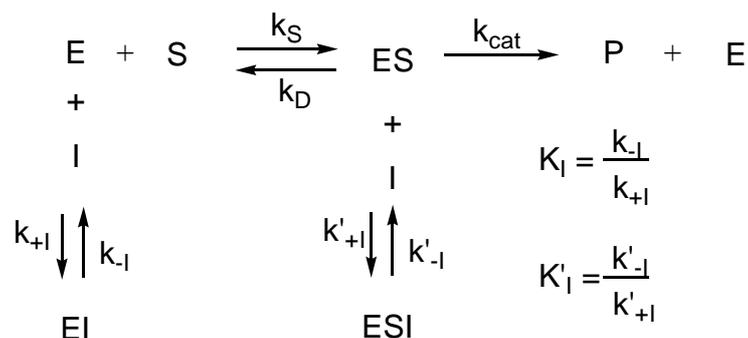
Tabelle 25: Kinetische Daten für alle Substrate, deren Sättigungskinetik mittels Dynafit gefittet wurde. k_{cat} und k_{cat2} sind Geschwindigkeitskonstanten während K_{ES} und K_{ESS} Gleichgewichtskonstanten darstellen.

Substrat	k_{cat1} [s^{-1}]	k_{cat2} [s^{-1}]	$K_{ES} =$ k_{D1}/k_{S1} [mM]	$K_{ESS} =$ k_{D2}/k_{S2} [mM]
2,3-Butandion	24.0 ± 13	$10.0 \pm$ 0.0024	12.99	270.2
2,3-Pentandion	16.0 ± 3.6	1.9 ± 1.9	0.046	16.95
2,3-Hexandion	29.5 ± 35	10.6 ± 37	1.59	9.09
2,3-Heptandion	60.7 ± 1900	9.6 ± 31	2.70	0.34
2,3-Octandion	90 *	2.5 ± 66	0.43	1.16
2,3-Nonandion	150 *	8.7 ± 130	0.52	1.04
Methylpyruvat	3.8 ± 21	0.4 ± 1.3	6.66	0.21
Ethylpyruvat	1.8 ± 34	0.6 ± 0.32	3.03	0.98
1,4-Dibrom-butan-2,3- dion	5.6 ± 51	1 *	1.08	1.13
Acetonylaceton	0.08 ± 0.23	0.017 ± 0.001	2.56	6.66
2,5-Heptandion	10 *	0.14 ± 0.23	166.6	0.03
2,5-Octandion	1.24 ± 0.0001	5.54 ± 800	0.87	769.2
1-Phenyl-1,4-pentandion	1 *	5.16 ± 0.2	0.58	2.27
tert. Butylacetoacetat	0.34 ± 0.19	0.29 ± 0.068	1.26	4.16

* für den Fit vorgegebene Werte

Aus den in Tab. 25 dargestellten kinetischen Daten kann man deutlich ersehen, dass k_{cat} stets wesentlich größer ist als $k_{\text{cat}2}$, was bedeutet, dass die Umsetzung eines Substratmoleküls deutlich langsamer erfolgt, wenn zwei Substrate gebunden sind. Für einige Verbindungen musste der k_{cat} -Wert vorgegeben werden, da der resultierende Fit auch dann passend war, wenn k_{cat} beliebig groß wurde. Hierbei wurde der kleinstmögliche Wert gewählt, unterhalb dessen die erhaltene Anpassung deutlich schlechter wurde.

2.6 Bestimmung von Inhibitionskonstanten



Schema 22: Reaktionsschema der nichtkompetitiven Hemmung bei $K_{\text{I}}' = K_{\text{I}}$; Kompetitive Hemmung bei $K_{\text{I}}' = 0$; Unkompetitive Hemmung bei $K_{\text{I}} = 0$.

Man unterscheidet insgesamt vier Arten der Hemmung von Enzymen: die kompetitive, die unkompetitive, die nicht-kompetitive Hemmung und gemischte Hemmtypen. Bei der kompetitiven Hemmung greift der Inhibitor ausschließlich das aktive Zentrum des freien Enzyms an und konkurriert so mit dem Substrat um die gleiche Bindungsstelle. Die Bindungskonstante K_{I}' , die den Zerfall des ESI-Komplexes beschreibt, ist hier gleich null. Im Falle der unkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an den bestehenden Enzym-Substrat-Komplex. In diesem Fall ist die Bindungskonstante K_{I} , die den Zerfall des EI-Komplexes beschreibt, gleich

null. Die nichtkompetitive Hemmung vereint die beiden vorherigen Hemmtypen, hier werden freies Enzym und Enzym-Substrat-Komplex vom Inhibitor angegriffen. Eine reine nicht-kompetitive Hemmung liegt allerdings nur vor falls K_I und K_I' exakt den gleichen Wert besitzen. Falls K_I' und K_I verschieden groß und beide ungleich null sind, spricht man von einem gemischten Hemmtyp.

Die Bestimmung der K_I -Werte erfolgte analog zur Bestimmung von v_{\max} - und K_M -Werten durch UV/VIS-spektroskopische Messungen, wobei als Messgröße genau wie bei den Sättigungskinetiken die Absorptionsänderung bei 340 nm diente, die der Konzentrationsänderung von NADH entspricht. Die Inhibitionskonstanten (K_I -Werte) wurden mit Hilfe von Inhibitionskinetiken mit 2,3-Butandion als Substrat ermittelt. Bei $[S] = K_M$ wurde die Konzentration des Inhibitors kontinuierlich erhöht. Aus der Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Inhibitorkonzentration ergab sich ein hyperbolischer Kurvenverlauf. Für die meisten der untersuchten Substanzen konnte ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus zugrunde gelegt werden. In diesen Fällen konnte der K_I -Wert durch nicht-lineare Regression mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$v = \frac{[E_0] \cdot [S] \cdot k_{\text{cat}}}{\left(K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S] \right)} \quad (\text{Gl.5})$$

für $[S] = K_M$ vereinfacht sich Gleichung (5) zu:

$$v = \frac{v_{\max}}{\left(2 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (\text{Gl.6})$$

Handelt es sich bei den auf inhibitorische Eigenschaften getesteten Verbindungen selbst um schwache Substrate der GatDH, dann muss dies in der Regressionsgleichung berücksichtigt werden, wie in Gl.7 gezeigt wird.

v_0 stellt hierbei die Restaktivität, d.h. die Umsatzgeschwindigkeit, des Inhibitors dar.

$$v = v_0 + \frac{v_{\max} - v_0}{\left(2 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (\text{Gl.7})$$

Auf diese Weise kann K_I allerdings nur im Falle einer rein kompetitiven Hemmung ermittelt werden. Da auch andere Hemmtypen beobachtet wurden, wurden zusätzlich IC_{50} -Werte bestimmt, die eine Vergleichbarkeit der inhibitorischen Effizienz aller Verbindungen zulassen. Für Fälle nicht-kompetitiver, unkompetitiver Hemmung oder gemischter Hemmtypen wurde der IC_{50} -Wert bestimmt.

Der IC_{50} -Wert gibt für standardisierte Reaktionsbedingungen an, bei welcher Inhibitorkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit auf 50 % der uninhibierten Geschwindigkeit reduziert ist. Für die Fälle, in denen kein kompetitiver Inhibitionsmechanismus angenommen werden konnte, wurde der jeweilige IC_{50} -Wert durch nicht-lineare Regression mit Gleichung (8) bestimmt:

$$v_i = v_0 + \frac{v_u}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)^c} \quad (\text{Gl.8})$$

v_0 = Restaktivität, $v_0 + v_u$ = nicht-inhibierte Geschwindigkeit, $[I]$ = Inhibitorkonzentration, c = Exponent, der bei rein kompetitiver Inhibition den Wert 1 besitzt.

Um alle Inhibitoren direkt vergleichen zu können, wurden sämtliche K_I -Werte über Gleichung (9) in die entsprechenden IC_{50} -Werte umgerechnet:

$$IC_{50} = K_I * \left(\frac{[S]}{K_M} + 1\right) \quad (\text{Gl.9})$$

da in unseren Messungen $[S] = K_M$ war, vereinfacht sich die Formel zu

$$IC_{50} = 2 * K_I \quad (\text{Gl.10})$$

Dieses Verfahren ist allerdings nur für kompetitive Hemmung zulässig [27].

Vor der Ermittlung der Inhibitionskonstanten muss also zuerst der Hemmtyp bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Hemmtyps wurden jeweils drei Sättigungskinetiken mit 2,3-Butandion als Substrat bei verschiedenen jeweils konstant gehaltenen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration ergab hyperbolische Kurvenverläufe. Die doppelt reziproke Auftragung $1/v$ gegen $1/[S]$ nach Lineweaver und Burk resultiert in der Linearisierung der Sättigungskurven nach Gleichung (11).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (\text{Gl. 11})$$

Für unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen werden Geraden unterschiedlicher Steigungen und/oder Achsenabschnittpunkten erhalten.

Schneiden sich die Geraden auf der x-Achse, liegt eine nicht-kompetitive Hemmung vor. Im Falle der kompetitiven Hemmung besitzen die Geraden einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der y-Achse, während ein paralleler Verlauf auf eine unkompetitive Hemmung hindeutet.

Es sind auch Fälle der gemischten Inhibition bekannt, bei der sich die Geraden in einem gemeinsamen Punkt schneiden, der jedoch auf keiner der beiden Achsen liegt.

Neben der Untersuchung der Inhibitoreigenschaften einiger 1,3- und 1,4-Diketone, wurden auch einige Ketoester, Hydroxyketone sowie Glutaraldehyd, Benzoylacetnitril und das α -Diketon 2-Methyl-4,5-octandion getestet.

2.6.1 1,2-Diketone

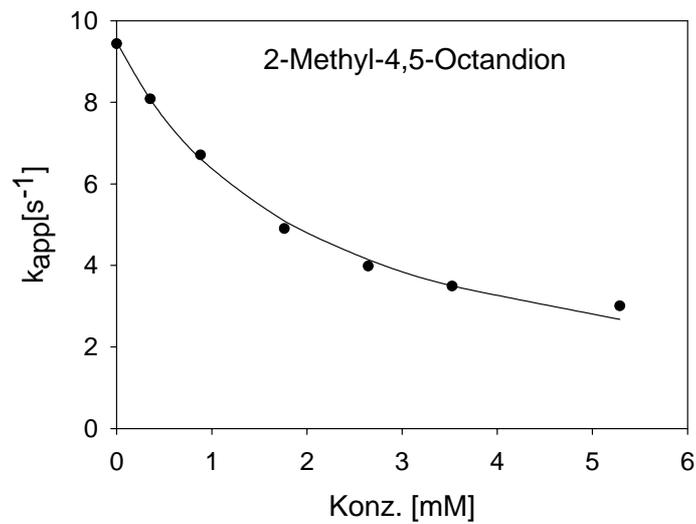


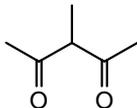
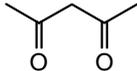
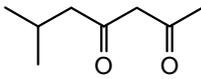
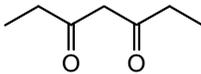
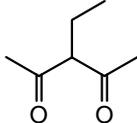
Abbildung 15: Konkurrenzassay von Methyl-4,5-octandion bei konstantgehaltener Konzentration an 2,3-Butandion (7.5 mM).

Als Vertreter der 1,2-Diketone wurde 2-Methyl-4,5-octandion getestet, bei dem als schwaches Substrat mit einem k_{cat}/K_M -Wert von $0.04 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ eine kompetitive Inhibition vermutet werden konnte. Aus dem hyperbolischen Fit ergab sich ein K_I -Wert von $1.0 (\pm 0.04) \text{ mM}$ und ein IC_{50} -Wert von 2.0 mM .

2.6.2 1,3-Diketone

Die in Tab. 26 aufgeführten Substanzen wurden auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht.

Tabelle 26: K_I -Werte der 1,3-Diketone.

Inhibitor	Formel	K_I -Wert [mM]	IC_{50} -Wert [mM]
3-Methyl-2,4-pentandion		1.8 ± 0.1	3.6 ± 0.2
Acetylaceton		1.5 ± 0.05	3.0 ± 0.1
2-Methyl-4,6-heptandion		0.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2
3,5-Heptandion		1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2
3-Ethyl-2,4-pentandion		0.6 ± 0.03	1.2 ± 0.06

Die K_I -Werte aller getesteten 1,3-Diketone liegen in dem sehr engen Bereich zwischen 0.5 mM und 1.8 mM, was darauf hindeutet, dass die Bindung an das aktive Zentrum der GatDH nur in geringem Maße von kleineren Alkylsubstituenten in α -Position der Carbonylgruppen beeinflusst wird..

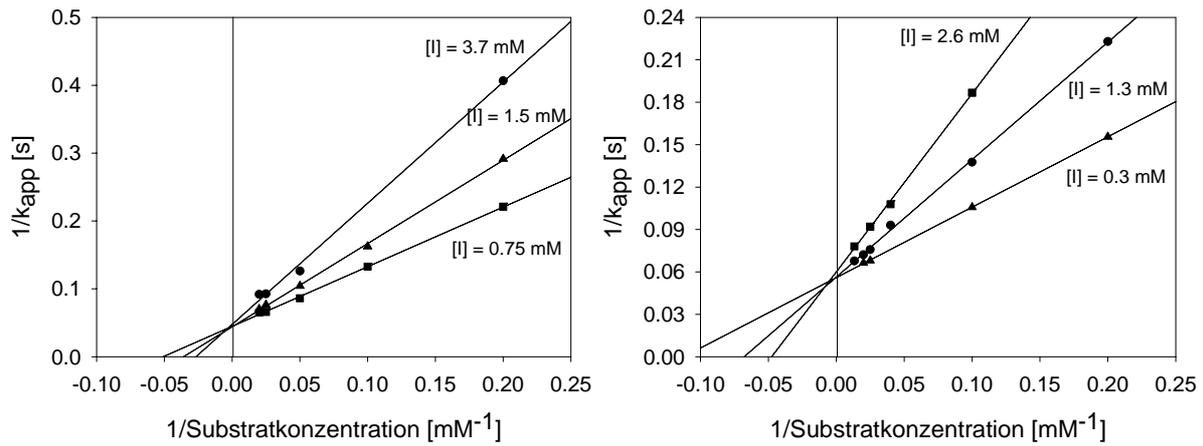


Abbildung 16: Lineweaver-Burk-Darstellungen für die 1,3-Diketone 3-Methyl-2,4-pentandion (links) und 2-Methyl-4,6-heptandion (rechts).

In allen Fällen handelt es sich hierbei um kompetitive Inhibitoren, was aus den Lineweaver-Burk-Darstellungen (in Abb. 16 am Beispiel zweier Substrate dargestellt) eindeutig hervorgeht.

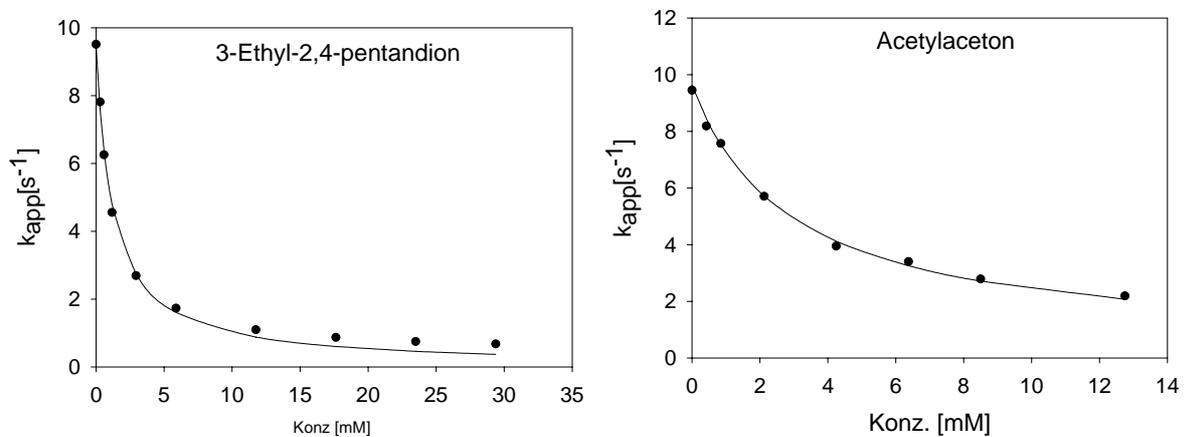


Abbildung 17: Verdrängungsassay für 3-Ethyl-2,4-pentandion (links) und Acetylaceton (rechts) bei konstanter Konzentration an 2,3-Butandion (7.5 mM).

2.6.3 1,4-Diketone

Die 1,4-Diketone weisen keinen rein kompetitiven Inhibitionsmechanismus auf, was anhand der Lineweaver-Burk-Darstellungen in Abb. 18 leicht zu erkennen ist. Es handelt sich bei den 1,4-Diketonen eher um Inhibitoren eines gemischten Hemmtyps. Daher sind hier in Tab.27 die IC_{50} -Werte zum Vergleich der inhibitorischen Wirkung aufgeführt. Bei einigen 1,4-Diketonen handelt es sich um schwache Substrate der GatDH, weshalb hier bei der Bestimmung des IC_{50} -Wertes die Restaktivität mitberücksichtigt werden muss (Gl. 8). Diese entspricht dem für die jeweilige Substanz ermittelten k_{cat} -Wert.

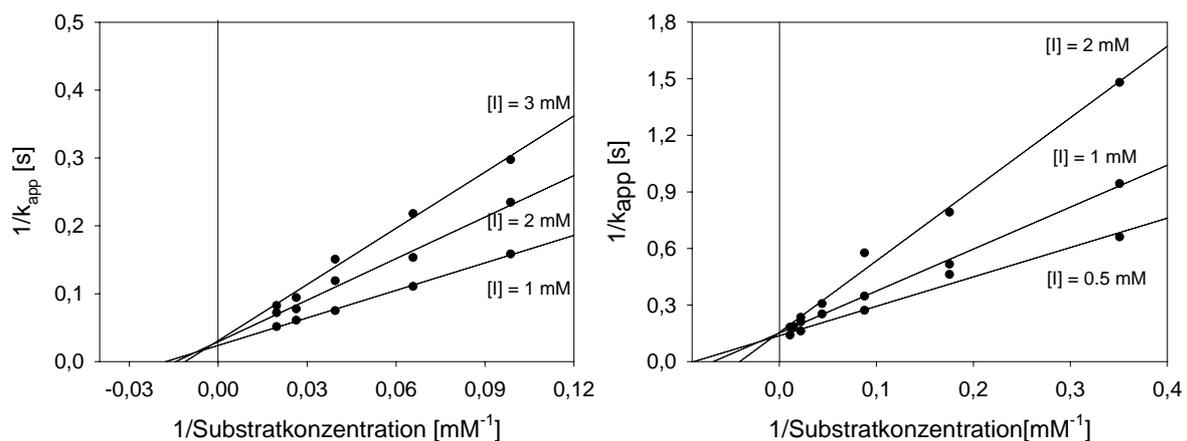
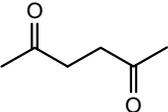
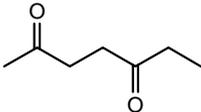
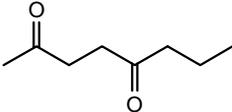
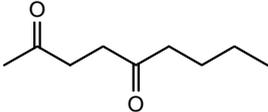
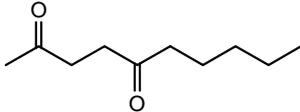
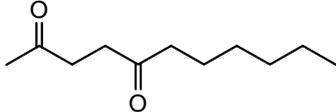
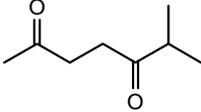
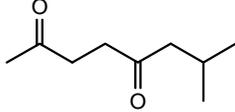
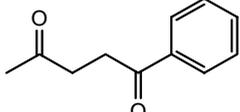


Abbildung 18: Lineweaver-Burk-Darstellungen für die 1,4-Diketone 6-Methyl-2,5-heptandion (rechts) und 2,5-Nonandion (links).

Tabelle 27: IC₅₀-Werte der 1,4-Diketone.

Inhibitor	Formel	IC ₅₀ -Wert [mM]
2,5-Hexandion		5.26 ± 0.31
2,5-Heptandion		1.28 ± 0.18
2,5-Octandion		3.65 ± 0.44
2,5-Nonandion		2.37 ± 0.46
2,5-Decandion		0.50 ± 0.07
2,5-Undecandion		1.7 ± 0.2
6-Methyl-2,5-heptandion		2.62 ± 0.66
7-Methyl-2,5-octandion		2.90 ± 0.36
1-Phenyl-1,4-pentandion		0.050 ± 0.006

Die IC_{50} -Werte aller 1,4-Diketone liegen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich von 0.5 mM bis 5 mM. Das 1-Phenyl-1,4-pentandion bildet mit seinem sehr niedrigen IC_{50} -Wert eine Ausnahme.

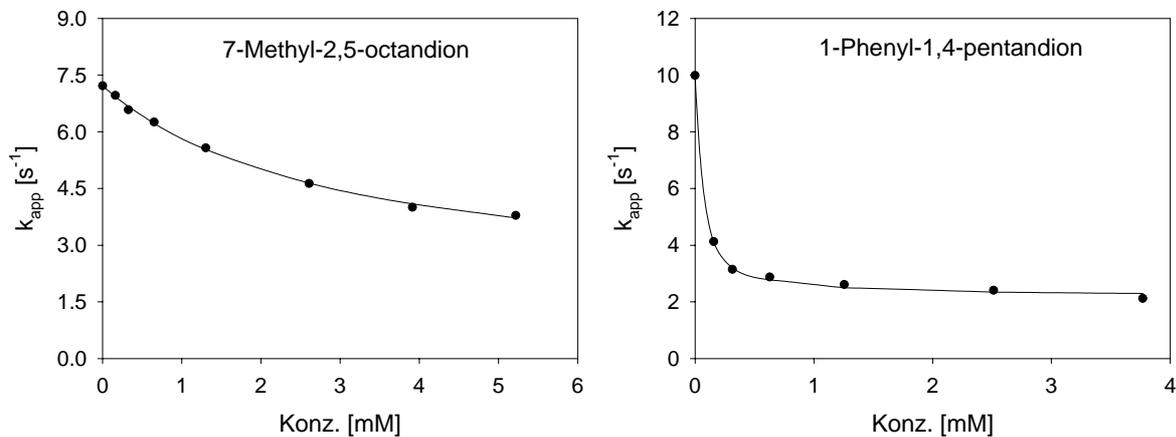


Abbildung 19: Konkurrenzassays mit 7-Methyl-2,5-octandion (links) und 1-Phenyl-1,4-pentandion (rechts) bei konstanter 2,3-Butandion-Konzentration (7.5 mM).

Der Konkurrenzassay von 1-Phenyl-1,4-pentandion zeigt sehr deutlich, dass hier ein schwaches Substrat der GatDH getestet wurde, da der Kurvenverlauf sich bei einem k_{app} -Wert von ungefähr 2 s^{-1} einpendelt. Dieser Wert entspricht dem k_{cat} -Wert des 1-Phenyl-1,4-pentandions.

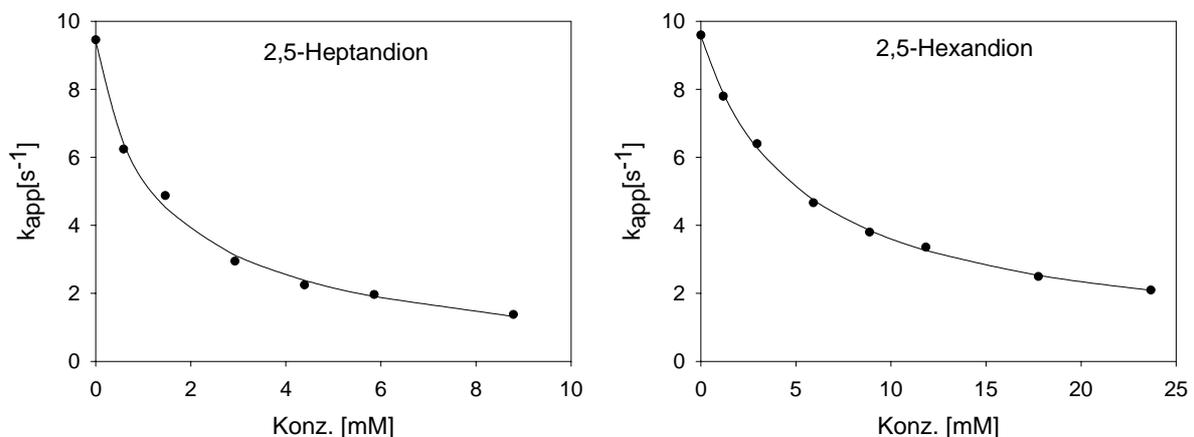
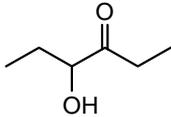
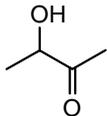
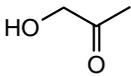


Abbildung 20: Konkurrenzassays mit 2,5-Heptandion (links) und 2,5-Hexandion (rechts) bei konstanter 2,3-Butandion-Konzentration (7.5 mM).

2.6.4 α -Hydroxyketone

Da es sich bei den meisten Hydroxyketonen auch um schwache Substrate der GatDH handelt, ist anzunehmen, dass ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus vorliegt.

Tabelle 28: K_I -Werte der α -Hydroxyketone.

Inhibitor	Formel	K_I -Wert [mM]	IC_{50} -Wert [mM]
3-Hydroxy-4-hexanon		1.1 ± 0.03	$2.2 \pm .0.6$
Acetoin		19.7 ± 1.6	$39,4 \pm 3.2$
Hydroxyaceton		17.4 ± 2.4	34.8 ± 4.8

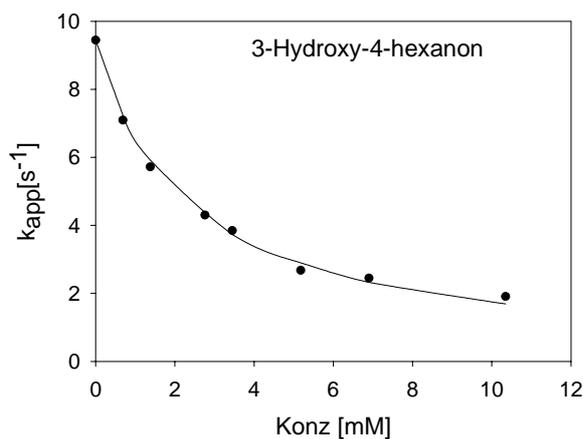


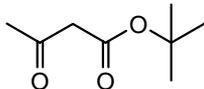
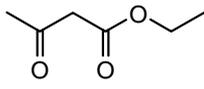
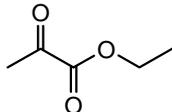
Abbildung 21: Konkurrenzassay mit 3-Hydroxy-4-hexanon bei konstanter Konzentration an 2,3-Butandion (7.5 mM). $K_I = 1.1 \pm 0.03$ mM.

Während Hydroxyaceton und Acetoin relativ schwache Inhibitoren darstellen, bindet 3-Hydroxy-4-hexanon mit seinen beiden Ethylgruppen um ein Vielfaches stärker.

2.6.5 Ketoester

Aus der Lineweaver-Burk-Darstellung geht eindeutig hervor, dass lediglich tert.-Butylacetoacetat und Acetessigester einem kompetitiven Inhibitionsmechanismus gehorchen.

Tabelle 29: K_I -Werte der Ketoester.

Inhibitor	Formel	K_I -Wert [mM]	IC_{50} -Wert [mM]
Tert.- Butylacetoacetat		1.0 ± 0.06	2.0 ± 0.12
Acetessigester		5.3 ± 0.4	10.6 ± 0.8
Ethylpyruvat		0.1 ± 0.01	0.25 ± 0.02

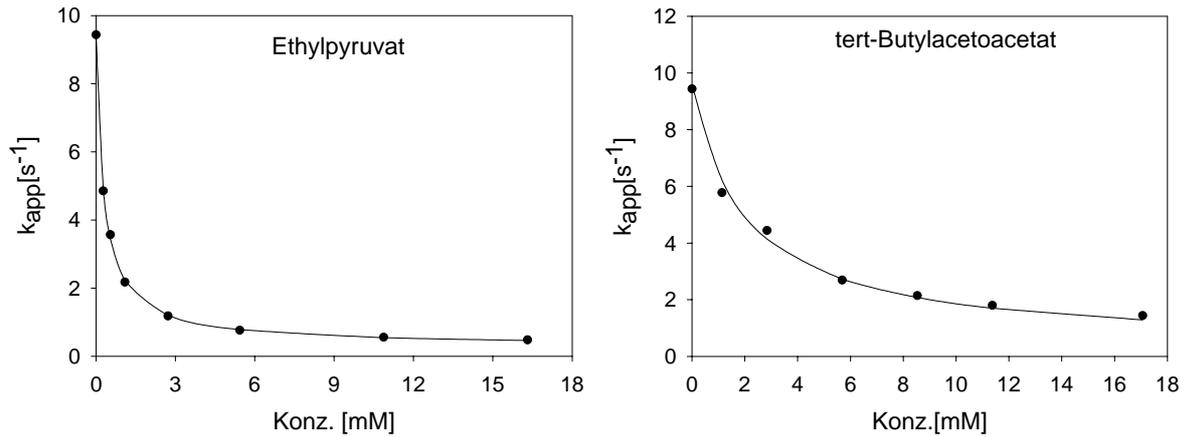


Abbildung 22: Konkurrenzassays mit Ethylpyruvat (links) tert-Butylacetoacetat (rechts) bei konstanter 2,3-Butandion-Konzentration (7.5 mM).

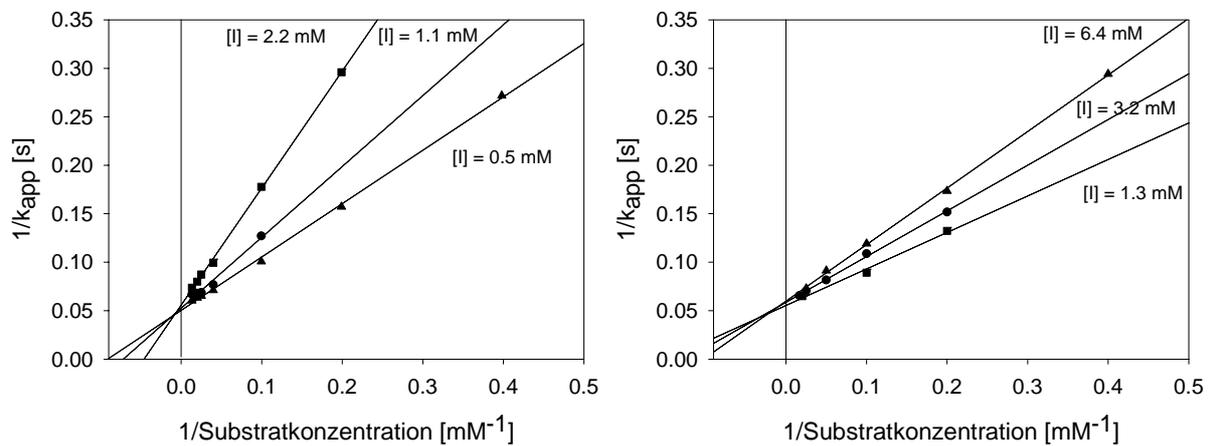


Abbildung 23: Lineweaver-Burk-Darstellungen der Ketoester Acetessigester (rechts) und Tert-butylacetoacetat (links).

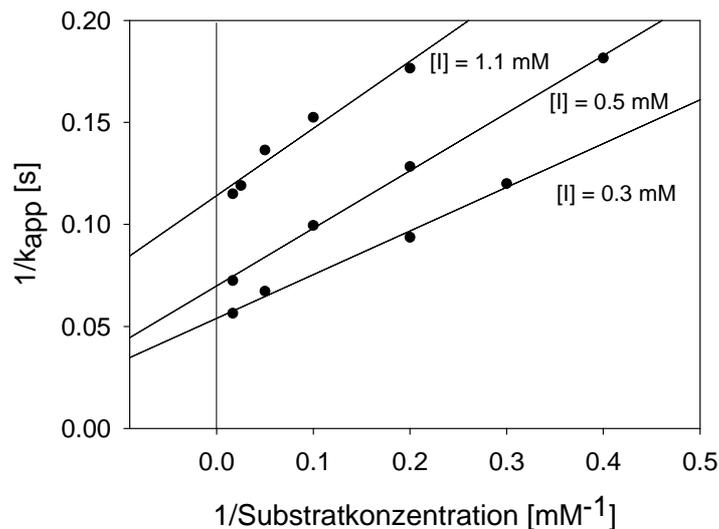


Abbildung 24: Lineweaver-Burk-Darstellung für Ethylpyruvat

Mit Glutaraldehyd und Benzoylacetoneitril wurden zwei weitere Substanzen getestet, von denen aufgrund ihrer Struktur ebenfalls eine Bindung zum aktiven Zentrum des Enzyms vermutet wurde. Für Glutaraldehyd als schwaches Substrat mit einem k_{cat}/K_M von $0.05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ konnte ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus angenommen werden. Der ermittelte K_I -Wert von 6.8 mM (IC_{50} -Wert: 13.6 mM) liegt deutlich über den K_I -Werten anderer Dicarbonylverbindungen.

Für Benzoylacetoneitril wurden ein K_I -Wert von 1.0 mM und ein IC_{50} -Wert von 2.0 mM ermittelt.

2.7 Bestimmung der Coenzympezifität

Hierzu wurden Sättigungskinetiken mit konstanter Konzentration an 2,3-Butandion (100 mM) und ansteigender Coenzymkonzentration durchgeführt. In der Sättigung wird der k_{cat} -Wert des 2,3-Butandions erreicht. Der K_M -Wert von NADH ist so klein, dass er mit Hilfe einer

normalen Sättigungskinetik und photometrischer Bestimmung nicht erfasst werden kann, d.h. er liegt im nanomolaren Bereich. Der K_M -Wert von NADPH beträgt 0.68 ± 0.1 mM.

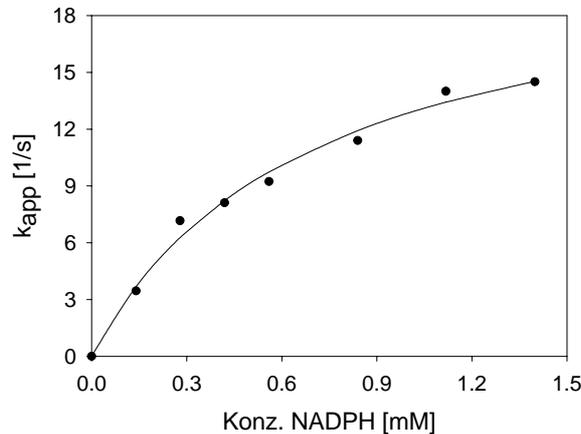


Abbildung 25: Sättigungskinetik von NADPH bei konstanter Konzentration an 2,3-Butandion.

2.8 Docking-Untersuchungen

Mit Hilfe der von Scheidig et al. ermittelten Röntgenkristallstruktur des Enzyms wurden für verschiedene Substrate, die im aktiven Zentrum platziert wurden, Energieminimierungen mit dem Programm *Ballview 1.2*^[28] durchgeführt.

Die Röntgenkristallstruktur der GatDH musste vor der Durchführung der Docking-Untersuchungen auf den Bereich des aktiven Zentrums reduziert werden, um die Rechenkapazität des verwendeten Computers nicht zu überlasten. Hierdurch ergaben sich u.a. freie CO- und NH-Reste durch getrennte Peptidbindungen, die in dieser Form natürlich in der Enzymstruktur nicht vorhanden sind. Daher war es notwendig, die Substrate, die im aktiven Zentrum gedockt werden sollten, vorher in der

Nähe der potentiellen Bindungsstellen zu platzieren, um Wechselwirkungen mit den artifiziellen Resten auszuschließen. Auf diese Weise konnten andere Wechselwirkungen, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen oder Interaktionen von Substraten mit anderen Aminosäureresten in der Nähe des aktiven Zentrums nicht berücksichtigt werden. Auch Wassermoleküle konnten bei den Energieminimierungen nicht berücksichtigt werden. Die Lage des aktiven Zentrums und die der Aminosäurereste, die an der Katalyse wahrscheinlich beteiligt sind, mussten also schon vorher bekannt sein. In der von Scheidig et al. ermittelten Röntgenkristallstruktur des Enzyms befand sich ein Acetatmolekül in einer hydrophoben Tasche nahe beim Nikotinamidring. Dieses Acetatmolekül, das über Wasserstoffbrücken mit Aminosäureresten verknüpft war, diente als Ausgangspunkt für die Platzierung der Substratmoleküle, die gedockt werden sollten. Ein entscheidendes Kriterium hierfür war vor allem der geringe Abstand des Acetats zum Nikotinamidring des Cofaktors, durch welchen die Hydridübertragung erst ermöglicht wird.

Die Docking-Studien mit dem Programm *Ballview 1.2* wurden mit Vertretern aller Stoffklassen, für die eine Bindung im aktiven Zentrum erwartet wurde, durchgeführt.

Als Vertreter der 2,3-Diketone wurde 2,3-Octandion gewählt, welches sehr schnell umgesetzt wird und daher ein sehr gutes Substrat für die GatDH darstellt. Interessant ist hier die Ausrichtung des Hexylsubstituenten entlang der α -Helix im aktiven Zentrum.

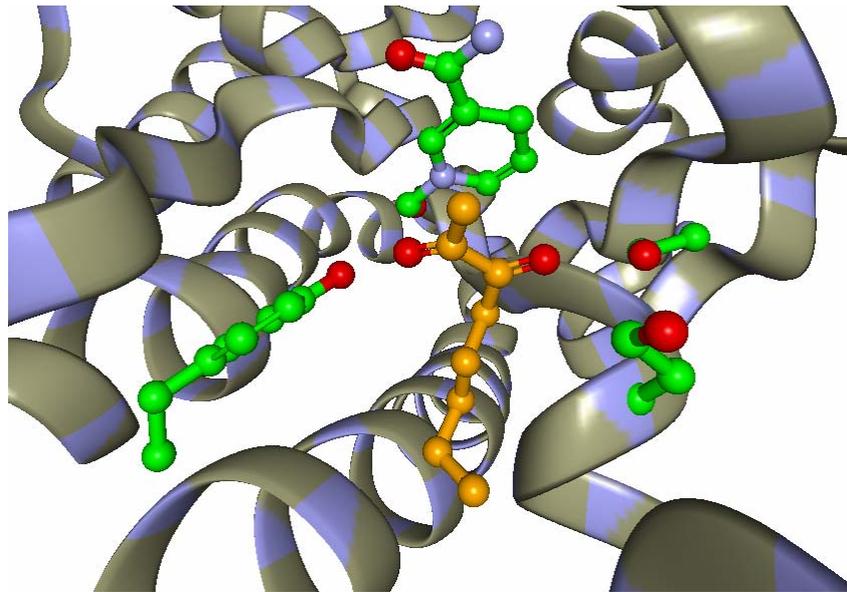


Abbildung 26: Detaildarstellung des aktiven Zentrums mit gedocktem 2,3-Octandion.

Abb. 26 zeigt die gedockte Struktur von 2,3-Octandion. Hierbei ist der Aminosäurebackbone im Bändermodell dargestellt, während Aminosäurereste, Substrate sowie der Nikotinamidring des NADH im Kugel-Stab-Modell dargestellt sind. Die Kohlenstoffatome der an der Bindung von Substraten beteiligten Aminosäurereste im aktiven Zentrum und diejenigen des NADH sind als grüne Kugeln dargestellt. Zur besseren Erkennbarkeit sind die Kohlenstoffatome des Substrates in Form von orangenen Kugeln dargestellt; alle Sauerstoffatome als rote Kugeln.

Die Bindung erfolgt in dem hier vorgeschlagenen Model über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonylgruppen des Diketons und den Hydroxylgruppen von Tyr 159 und Ser 144. Der Tyrosinrest bildet hierbei eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe an „2“-Position (Abstand O-O: 2.43 Å) aus. Ser 144 bindet die Carbonylgruppe in α -Position über eine Wasserstoffbrücke (Abstand O-O: 2.50 Å).

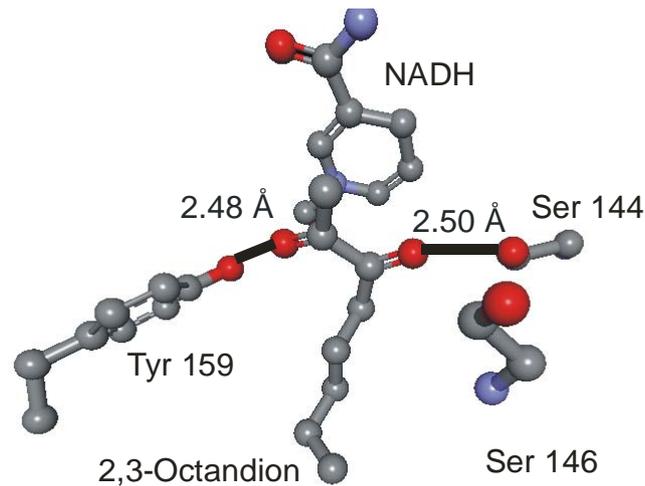


Abbildung 27: 2,3-Octandion im aktiven Zentrum.

2,4-Hexandion wurde als Vertreter der 1,3-Diketone ins aktive Zentrum gedockt. Bei den β -Diketonen handelt es sich entweder um sehr schwache Substrate der GatDH oder es erfolgt keine Umsetzung. Da die Vertreter dieser Stoffklasse kompetitive Inhibitoren der GatDH sind, werden sie offensichtlich trotzdem gut im aktiven Zentrum gebunden.

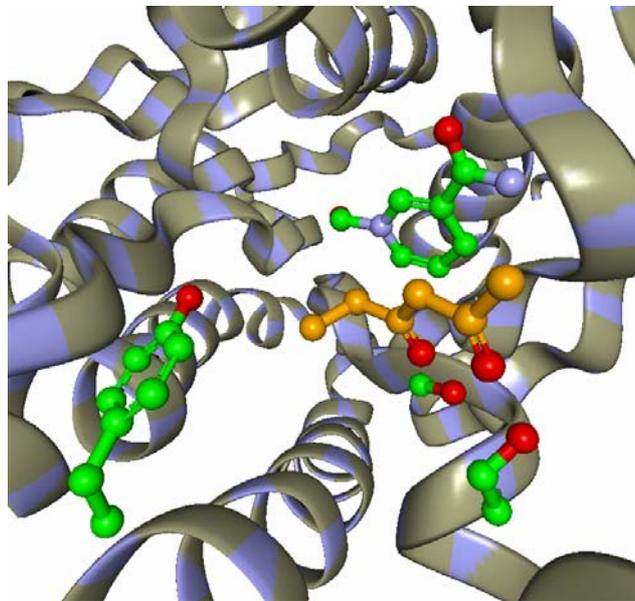


Abbildung 28: 2,4-Hexandion im aktiven Zentrum.

Die Bindung erfolgt hier über Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Carbonylgruppen mit den Serinresten 144 (Abstand O-O: 2.47 Å) und 146 (Abstand O-O: 2.46 Å). Die Ausrichtung der Alkylreste ist im Falle des sterisch wenig anspruchsvollen 2,4-Hexandion nicht sehr aussagekräftig. Für sterisch anspruchsvollere Reste erfolgt die Ausrichtung vermutlich in ähnlicher Weise wie bei 2,3-Octandion.

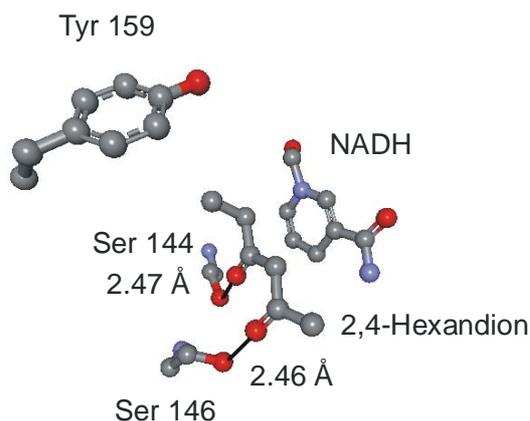


Abbildung 29: Bindung von 2,4-Hexandion im aktiven Zentrum.

Die Bindung von 2,5-Heptandion wurde stellvertretend für die Verbindungsklasse der 1,4-Diketone untersucht.

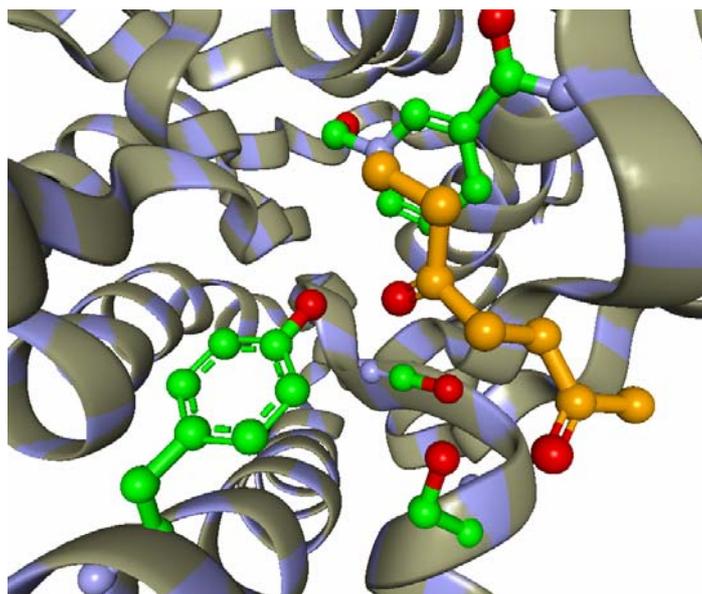


Abbildung 30: gedocktes 2,5-Heptandion.

Bei dieser Stoffklasse handelt es sich genau wie bei den 1,3-Diketonen zwar um schwache Substrate aber um starke kompetitive Inhibitoren. Die Bindung erfolgt hier zwischen den beiden Carbonylgruppen des Diketons und Tyr 159 (Abstand O-O: 2.45 Å) sowie Ser 146 (Abstand O-O: 2.55 Å). Auch hier erfolgt vermutlich die Ausrichtung sterisch anspruchsvoller Reste in ähnlicher Weise wie bei 2,3-Octandion.

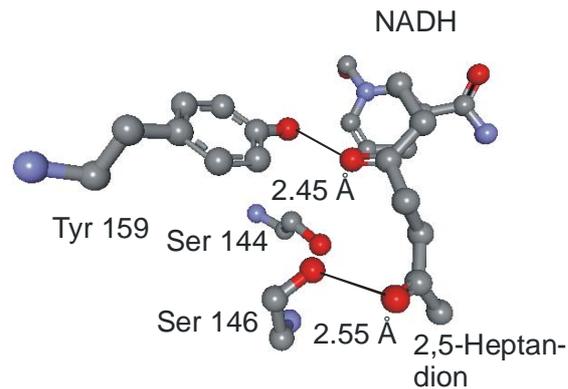


Abbildung 31: 2,5-Heptandion im aktiven Zentrum.

Stellvertretend für die α -Ketoester wurde Ethylpyruvat ins aktive Zentrum gedockt.

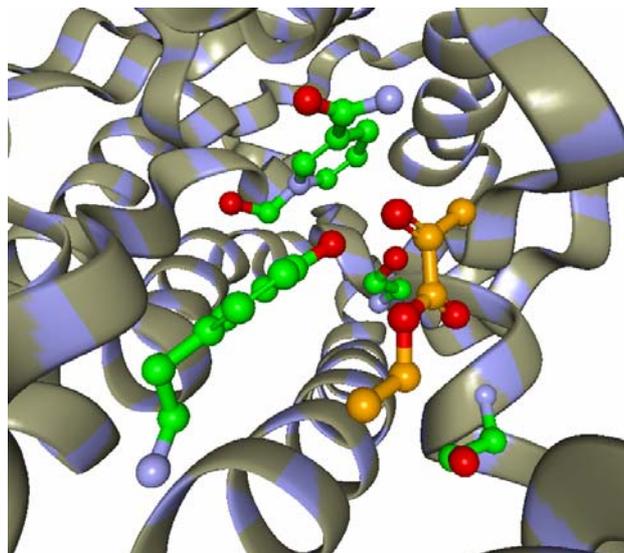


Abbildung 32: Bindung von Ethylpyruvat im aktiven Zentrum.

Bei Ethylpyruvat handelt es sich um ein schwaches Substrat und um einen sehr starken kompetitiven Inhibitor. Die Bindung erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonylgruppe und Tyr 159 (Abstand O-O: 2,43 Å) und durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylsauerstoff der Estergruppe und Serinrest 144 (Abstand O-O: 2,80 Å).

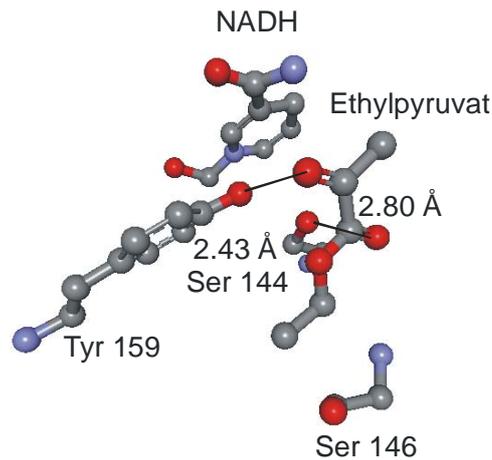


Abbildung 33: Bindung von Ethylpyruvat im aktiven Zentrum.

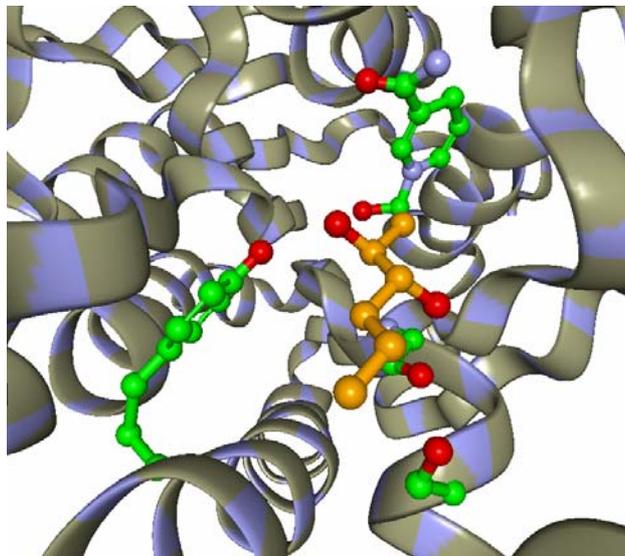


Abbildung 34: Detaildarstellung des aktiven Zentrums mit 2,3-(R,S)-Hexandiol.

Als Vertreter der 1,2-Diole wurde 2,3-(R,S)-Hexandiol ins aktive Zentrum gedockt. Hierbei handelt es sich um das Hauptprodukt der enzymatischen Umsetzung von 2,3-Hexandion. Außerdem sind die meisten Diole selbst Substrate der GatDH, allerdings für die Oxidationsreaktion.

Die Bindung erfolgt hier erwartungsgemäß durch Wasserstoffbrücken zwischen Tyr 159 und der Hydroxylgruppe am C-2-Atom (Abstand O-O: 2.44 Å), sowie durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser 144 und der OH-Gruppe am C-3-Atom (Abstand O-O: 2.40 Å). Die Bindung erfolgt hier also in gleicher Weise wie die Bindung eines 2,3-Diketons. Auch die Ausrichtung des sterisch anspruchsvolleren Alkylrestes - hier des Butylrestes - erfolgt in ähnlicher Weise entlang der α -Helix.

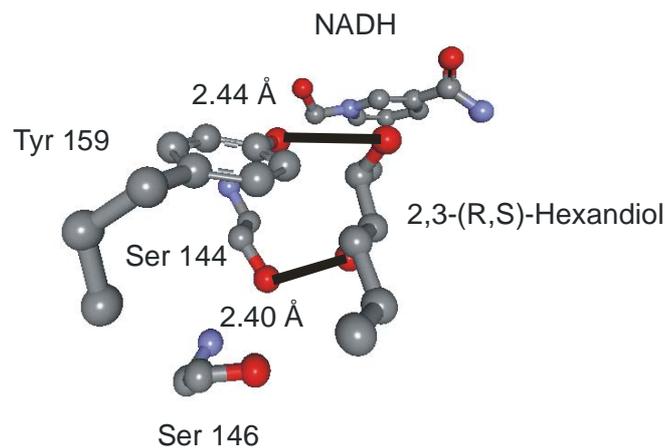


Abbildung 35: ins aktive Zentrum gedocktes 2,3-(R,S)-Hexandiol.

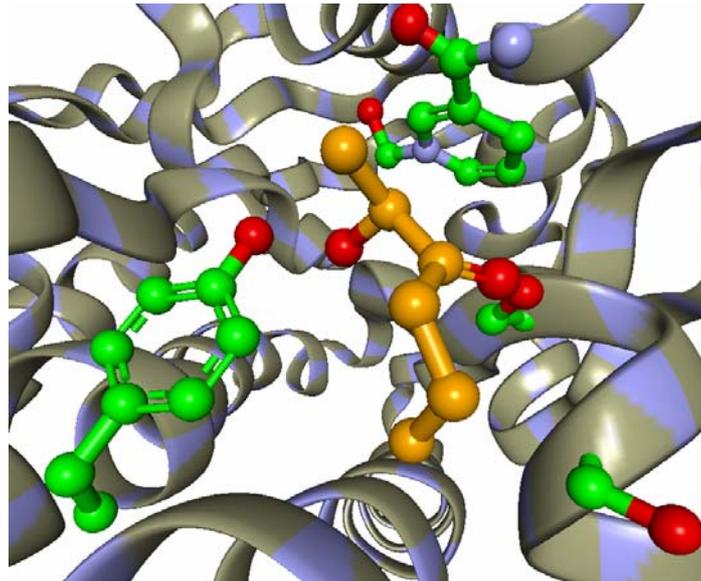


Abbildung 36: 2-Hydroxy-3-hexanon im aktiven Zentrum.

Stellvertretend für die Familie der α -Hydroxyketone, die ebenfalls Substrate der GatDH sind, wurde 2-Hydroxy-3-hexanon im aktiven Zentrum gedockt.

Analog zur Bindung der 2,3-Diketone werden auch hier Wasserstoffbrücken zwischen Tyr 159 und der Hydroxylgruppe des Hydroxyketons (Abstand O-O: 2.43 Å) sowie zwischen der Carbonylgruppe des Substrats und Ser 144 ausgebildet (Abstand O-O: 2.47 Å).

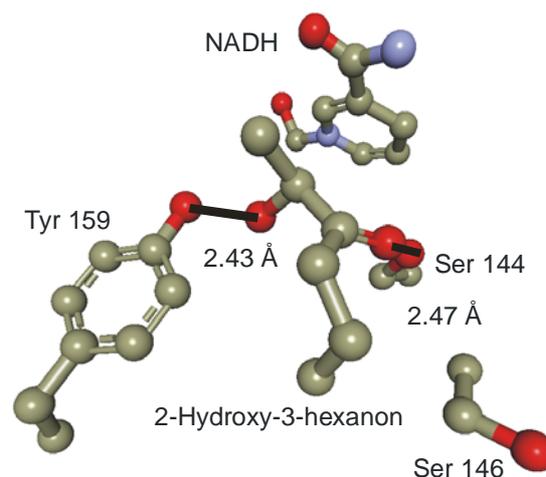


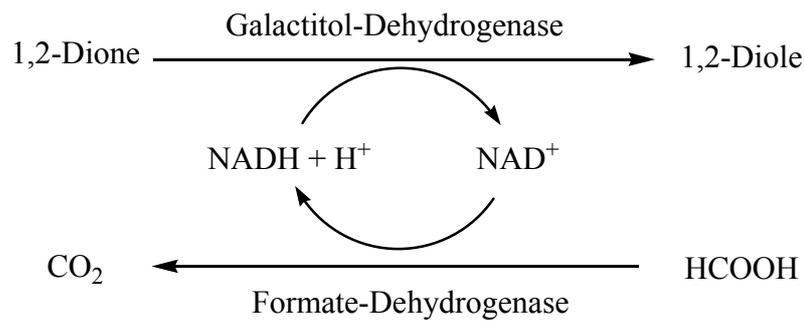
Abbildung 37: Bindung von 2-Hydroxy-3-hexanon im aktiven Zentrum.

2.9 Präparative enzymatische Umsetzungen

Die Galaktitoldehydrogenase (GatDH) ist ein NAD(H)-abhängiges Enzym. Bei quantitativen Umsetzungen wird der Cofaktor in äquimolaren Mengen verbraucht, im Falle der Umsetzung von Dicarbonylverbindungen sogar in doppeltäquimolaren Mengen. Da NADH recht teuer ist, ist eine ökonomischere Reaktionsführung von Nöten. Hierzu ist ein Cosubstratregenerierungssystem notwendig, durch welches das bei der Umsetzung entstehende NAD⁺ kontinuierlich recycelt wird.

Eine solche Cosubstratregenerierung kann elektrochemisch, chemisch und auf enzymatischem Wege erfolgen. Bei der elektrochemischen Cosubstratregenerierung wird das während einer Oxidationsreaktion entstehende NADH an einer Elektrode reoxidiert. Die freiwerdenden Elektronen werden an einer Hilfselektrode auf Protonen übertragen, was zur Entstehung von Wasserstoff führt^[29].

Ein Beispiel für die chemische Cosubstratregenerierung stellt die NADH-Regenerierung mit Formiat als Donor und Rhodiumkomplexen als Redoxkatalysatoren dar^[30]. Die enzymatische Regenerierung des Cofaktors erfolgt in den meisten Fällen mit Hilfe eines zweiten Enzymsystems, welches allerdings ähnliche pH- und Temperaturoptima wie das zur eigentlichen Biokonversion verwendete Enzym aufweisen sollte. Außerdem entsteht ein zusätzliches Produkt, das im Idealfall den Reaktionsverlauf nicht beeinflussen sollte. Zur kontinuierlichen NADH-Regenerierung in den Reduktionsreaktionen wurde hier das Formiat-Dehydrogenase-System verwendet, bei dem NAD⁺ zu NADH reduziert wird, während Formiat zu CO₂ oxidiert wird^[31].



Schema 23: FDH/Formiat-Cosubstratregenerierungssystem.

Das als Nebenprodukt gebildete CO_2 entweicht als Gas aus dem Reaktionsgemisch und stellt daher weder für den Reaktionsverlauf noch für die Aufarbeitung ein Problem dar. Bei vielen Enzymreaktionen stellen zudem eventuelle Rückreaktionen ein Problem dar. Im Falle des Formiat/Formiatdehydrogenase-System ist dieses allerdings zu vernachlässigen, da das gebildete CO_2 ausgast und daher für die Rückreaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Der für die Reaktion eingestellte pH-Wert sollte einen Kompromiss zwischen dem pH-Optimum der Formiatoxidation und dem pH-Optimum der eigentlichen enzymatischen Umsetzung darstellen.

Für alle Biokonversionen wurde wie bei den vorherigen Messreihen ein pH von 6.5 gewählt, was dem ermittelten pH-Optimum der GatDH für Reduktionsreaktionen entspricht. Das pH-Optimum für die Oxidation von Formiat zu CO_2 durch die FDH liegt allerdings zwischen 7 und 9^[31]. Bei pH 6.5 kann die FDH lediglich 60 % ihrer Maximalaktivität erreichen, was jedoch in Kauf genommen wurde, weil es den Reaktionsverlauf nicht wesentlich beeinflusst.

2.9.1 Analytik der Produkte präparativer enzymatischer Umsetzungen mittels NMR

Die Produkte der Biokonversion von Acetoin und 2,3-Butandion wurden mit ^1H - und ^{13}C -NMR eindeutig als 2,3-Butandiol identifiziert. Die Reduktion des 2,3-Diketons erfolgt also nach einer Reaktionszeit von 3 d vollständig zur Stufe des 2,3-Diols und stoppt nicht auf der Stufe des Hydroxyketons.

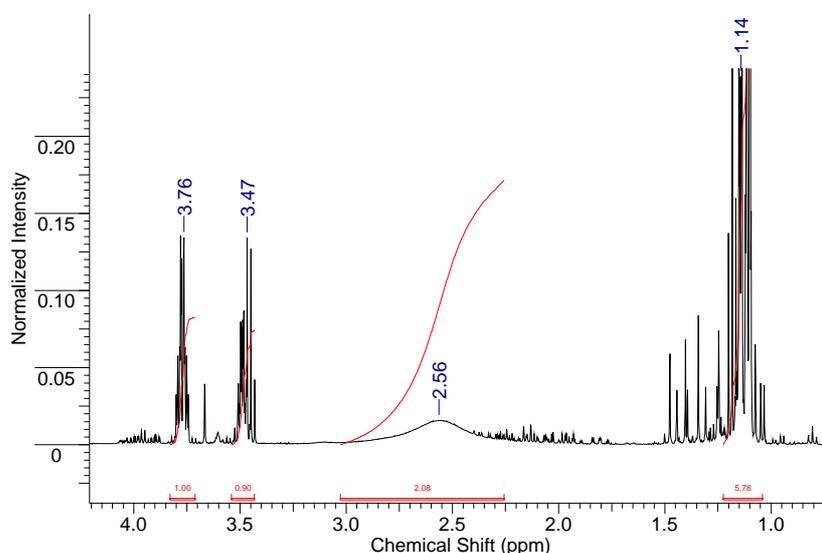


Abbildung 38: ^1H -NMR von 2,3-Butandiol aus den enzymatischen Reduktionen von Acetoin und 2,3-Butandion.

Als Referenz diente die chemische Verschiebung von CDCl_3 . Die beiden Hydroxylprotonen des 2,3-Butandiol erscheinen als breites Singulett bei 2.56 ppm, während die Protonen der CHOH -Gruppen als kombinierte Signale bei 3.76 ppm bzw. 3.47 ppm auftauchen. Beide Methylgruppen erscheinen als kombiniertes Signal, welches zu 6 Protonen integriert wurde, bei 1.14 ppm.

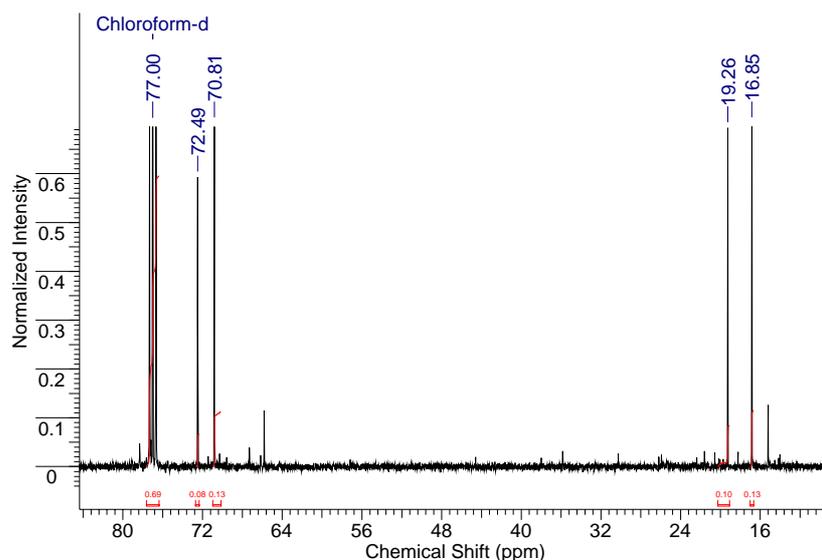


Abbildung 39: ^{13}C -NMR von 2,3-Butandiol aus den enzymatischen Reduktionen von Acetoin und 2,3-Butandion.

Im ^{13}C -Spektrum erscheinen beide Methylgruppen bei 19.26 ppm und 16.85 ppm; die Signale der CHOH-Gruppen bei 72.49 ppm und 70.81 ppm.

2.9.2 Analytik der Produkte präparativer enzymatischer Umsetzungen mittels HPLC

Es wurden GatDH-katalysierte Reduktionen mit den Substraten 2,3-Butandion und Acetoin durchgeführt.

Allen Reaktionsansätzen wurde 0.7 mM NADH zugegeben damit die Reaktion sofort bei Substratzugabe starten konnte. Da höhere NADH-Konzentrationen die FDH kompetitiv hemmen können^[31] wurde zu Beginn der Reaktionen ein Konzentrationsverhältnis von NAD^+ zu NADH von 5:1 gewählt. Der Verlauf beider Umsetzungen, die bei RT durchgeführt wurden, wurde mittels HPLC verfolgt.

Reduktion von 2,3 Butandion

Die GatDH reduzierte 2,3-Butandion zu 2,3-Butandiol. Der Ansatz enthielt Natriumformiat in doppeltäquimolarer Menge bezüglich des eingesetzten Substrats, da für die vollständige Umsetzung des 2,3-Butandions auch jeweils 2 mol NADH pro mol Substrat erforderlich waren.

Der Reaktionsansatz enthielt 23 mM 2,3-Butandion, 50 mM Na-Formiat, 0.7 mM NADH, 3.5 mM NAD⁺, 1.6 U/ml FDH, 1.7 U/ml GDH in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, 1 mM MgCl₂, pH 6.5).

In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen, in denen Edukt,- Produkt- und eventuelle Zwischenproduktkonzentrationen mittels HPLC bestimmt wurden. Um den exakten Reaktionsverlauf verfolgen zu können, wurden Kalibrationskurven für Acetoin, das als Zwischenprodukt erwartet wurde, und 2,3-Butandiol im Konzentrationsbereich von 0-60 mM erstellt.

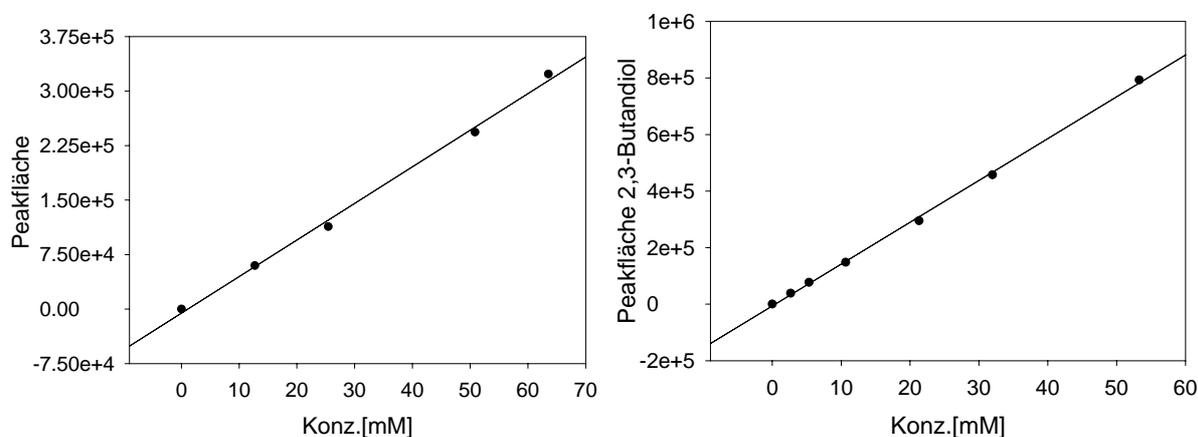


Abbildung 40: Kalibrationskurven für Acetoin und 2,3-Butandiol, erstellt mittels Ionen-Verteilungschromatographie mit einer Ca²⁺-Ionen-Austauschersäule (Nucleogel Sugar 810 Ca, 300 x 7.8 mm, Fa. Machery & Nagel). Die Säule wurde bei einer Temperatur von 80 °C gehalten, und die Elution erfolgt bei einer Flussrate von 0.75 ml/min mit H₂O_{deion} als Eluent.

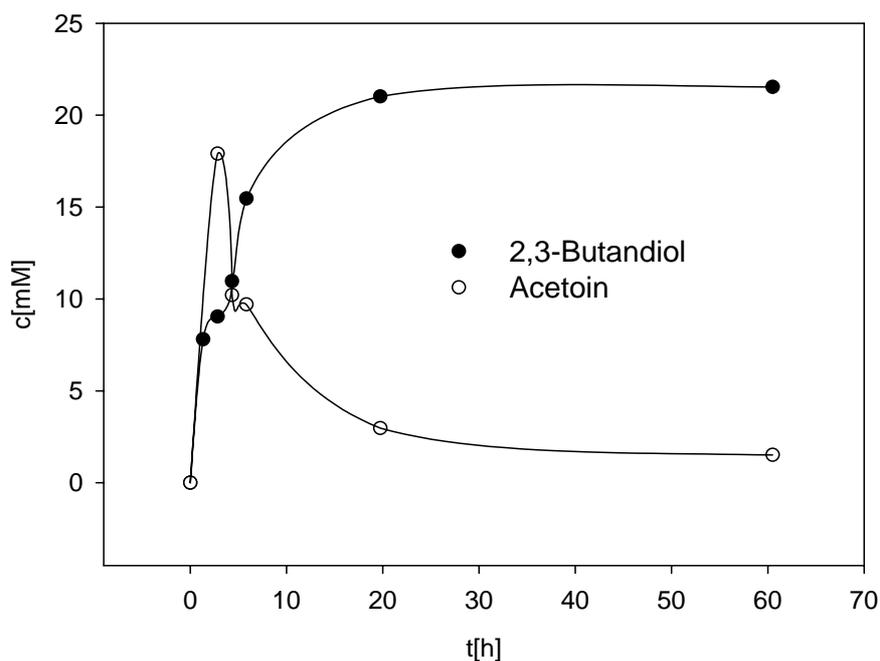


Abbildung 41: Verlauf der Biokonversion von 2,3-Butandion (20mM)

Der durch die HPLC-Analyse bestimmte Verlauf der Biokonversion ist in Abb. 41 dargestellt.

Zunächst konnte eine starke Zunahme der Acetoin-Konzentration beobachtet werden, während die Konzentration des erwarteten Endproduktes 2,3-Butandiol nur recht langsam anstieg. Nach Durchlaufen eines Maximums bei einer Reaktionsdauer von 3 h konnte eine Abnahme der Acetoin-Konzentration festgestellt werden. Acetoin wird hier also als Zwischenprodukt gebildet, was bedeutet, dass die Reduktion eines Diketons zum Diol nicht einstufig verläuft. Die Umsetzung des als Zwischenprodukt gebildeten Hydroxyketons verläuft merklich langsamer, was zu dessen Akkumulation führt. Nach 20 h schließlich war nur noch eine sehr schwache Produktzunahme festzustellen, da hier der größte Teil an Edukt und Zwischenprodukt bereits umgesetzt war. Nach 60 h war schließlich eine vollständige Umsetzung des 2,3-Butandions zu 2,3-Butandiol feststellbar.

Reduktion von Acetoin

Die GatDH reduzierte Acetoin zu 2,3-Butandiol. Der Ansatz enthielt Natriumformiat in der gleichen Konzentration wie das eingesetzte Substrat, da sowohl bei der GatDH- als auch bei der FDH-Reaktion das jeweilige Cosubstrat in äquimolaren Mengen verbraucht wurde.

Der Reaktionsansatz enthielt 70 mM Acetoin, 70 mM Na-Formiat, 0.7 mM NADH, 3.5 mM NAD⁺, 1.6 U/ml FDH, 1.7 U/ml GDH in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, 1 mM MgCl₂, pH 6.5).

In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen, in denen Edukt,- und Produktkonzentrationen mittels HPLC vermessen wurden. Um den exakten Reaktionsverlauf verfolgen zu können, wurden Kalibrationskurven für Acetoin und 2,3-Butandiol im Konzentrationsbereich von 0–60 mM (Abb. 40) erstellt.

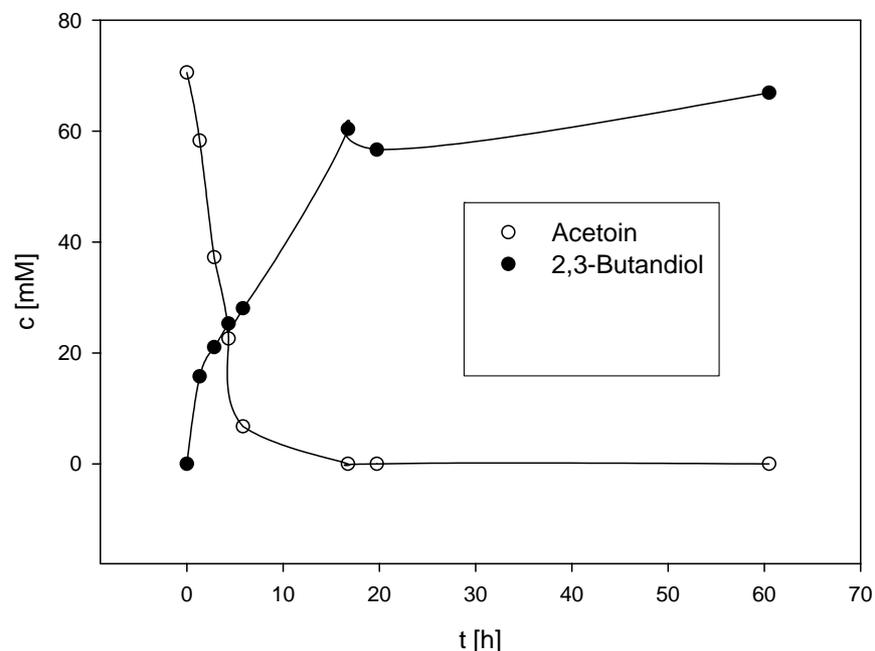


Abbildung 42: Verlauf der Biokonversion von Acetoin.

Nach 10 h war nur noch eine schwache Produktzunahme bzw. Eduktabnahme zu beobachten. Die Konzentration des 2,3-Butandiols betrug nach 60 h 70 mM, was einer Ausbeute von 100 % entsprach.

2.9.3 Gaschromatographie zur Ermittlung der Enantiomerenreinheit der Umsetzungsprodukte der GatDH

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der enzymatischen Reaktionsprodukte wurden gaschromatographische Messungen an einer chiralen Festphase durchgeführt. Hierdurch sollte der Enantiomerenüberschuss ermittelt werden, der bei Reduktionen verschiedener Substrate der GatDH erzielt wurde.

Zunächst mussten die Bedingungen ermittelt werden, bei denen eine Basislinientrennung des racemischen Gemisches der entsprechenden Alkohole, die als Umsetzungsprodukte der enzymatischen Reduktion erwartet wurden, erfolgte. Die Zuordnung der einzelnen Peaks erfolgte entweder durch Vergleich mit käuflich erworbenen Standards oder mit Diolen, die via enantioselektiver Sharpless-Dihydroxylierung synthetisiert wurden. Anschließend erfolgte bei den gleichen Bedingungen, bei denen eine optimale Trennung der Enantiomere erzielt wurde, die Analytik der Umsetzungsprodukte aus den enzymatischen Reduktionen. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Enantiomere, anhand derer der Enantiomerenüberschuss ermittelt wurde, berechneten sich über die integrierten Peakflächen.

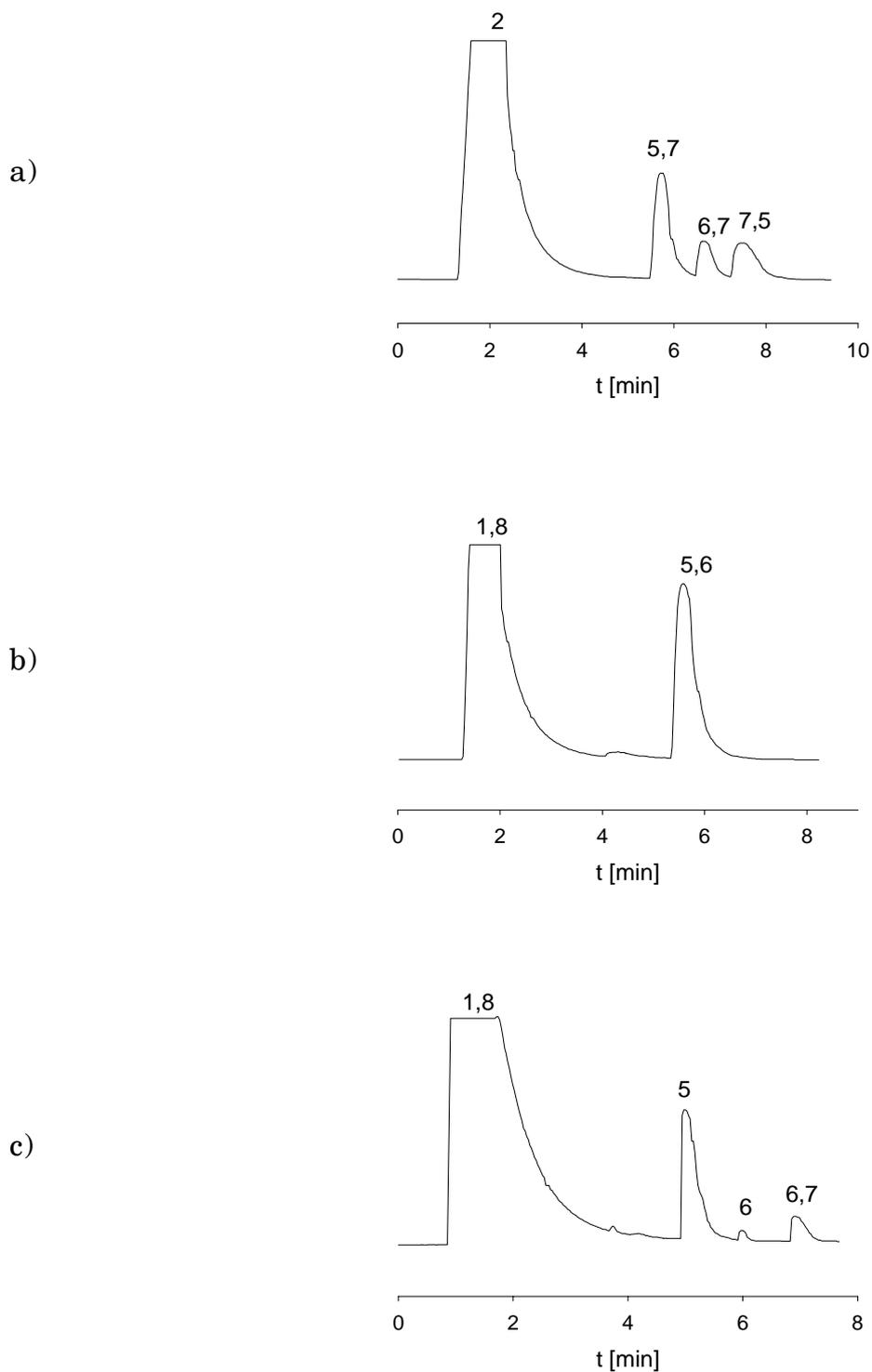


Abbildung 43: Gaschromatogramme für 2,3-Butandiol bei 50 °C; alle Proben wurden mit TFAA derivatisiert; a) racemisches Gemisch von meso-, (R,R)- und (S,S)-2,3-Butandiol; b) meso-2,3-Butandiol; c) durch enzymatische Reduktion von 2,3-Butandion synthetisiertes 2,3-Butandiol

Abb. 43 zeigt, dass eine Basislinientrennung des racemischen Gemisches von meso-, (R,R)- und (S,S)- 2,3-Butandiol bei 50 °C möglich war. Meso-2,3-Butandiol wird zuerst eluiert, darauf folgen (R,R)-2,3-Butandiol mit einer Retentionszeit von 6,7 min und (S,S)-2,3-Butandiol mit einer Retentionszeit von 7,5 min. Aus dem Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung ist klar ersichtlich, dass nicht nur eine enantiomere Spezies gebildet wird. Größtenteils wird jedoch die meso-Form mit einem prozentualen Anteil von 79 % gebildet; das (R,R)-Enantiomer mit 3 % und das (S,S)-Enantiomer mit 18 % sind lediglich Nebenprodukte.

Zur Überprüfung der Stereoselektivität der enzymatischen Reduktion von 2,3-Heptandion, wurde das Produkt des Umsatzes mit einem racemische Gemisch von (R,S)- und (S,R)- 2,3-Heptandiol verglichen. Zur Zuordnung der beiden Enantiomeren erfolgte zusätzlich der Vergleich mit einem Enantiomerengemisch, welches überwiegend das (R,S)-Enantiomer enthalten sollte.

Das racemische Gemisch von (R,S)- und (S,R)- 2,3-Heptandiol wurde ausgehend von cis-2-Hepten durch eine Dihydroxylierung nach Sharpless ohne chiralen Liganden^[18] synthetisiert, während zur Synthese des 60:40-Gemisches eine Sharpless-Dihydroxylierung von cis-2-Hepten mit α -AD-mix durchgeführt wurde. Bei dieser enantioselektiven Dihydroxylierung sollte das (R,S)-Enantiomer, wie unter 2.1.1 beschrieben, bevorzugt gebildet werden.

Abb. 44 zeigt ganz eindeutig, dass bei dem enzymatischen Umsatz nur ein Enantiomer gebildet wird. Die Retentionszeit von 22.2 min legt den Schluss nahe, dass es sich hierbei um das gleiche Enantiomer handelt, welches auch bei der enantioselektiven Sharpless-Dihydroxylierung bevorzugt entstanden ist. Hierbei handelt es sich um das (R,S)-Enantiomer des 2,3-Heptandiols.

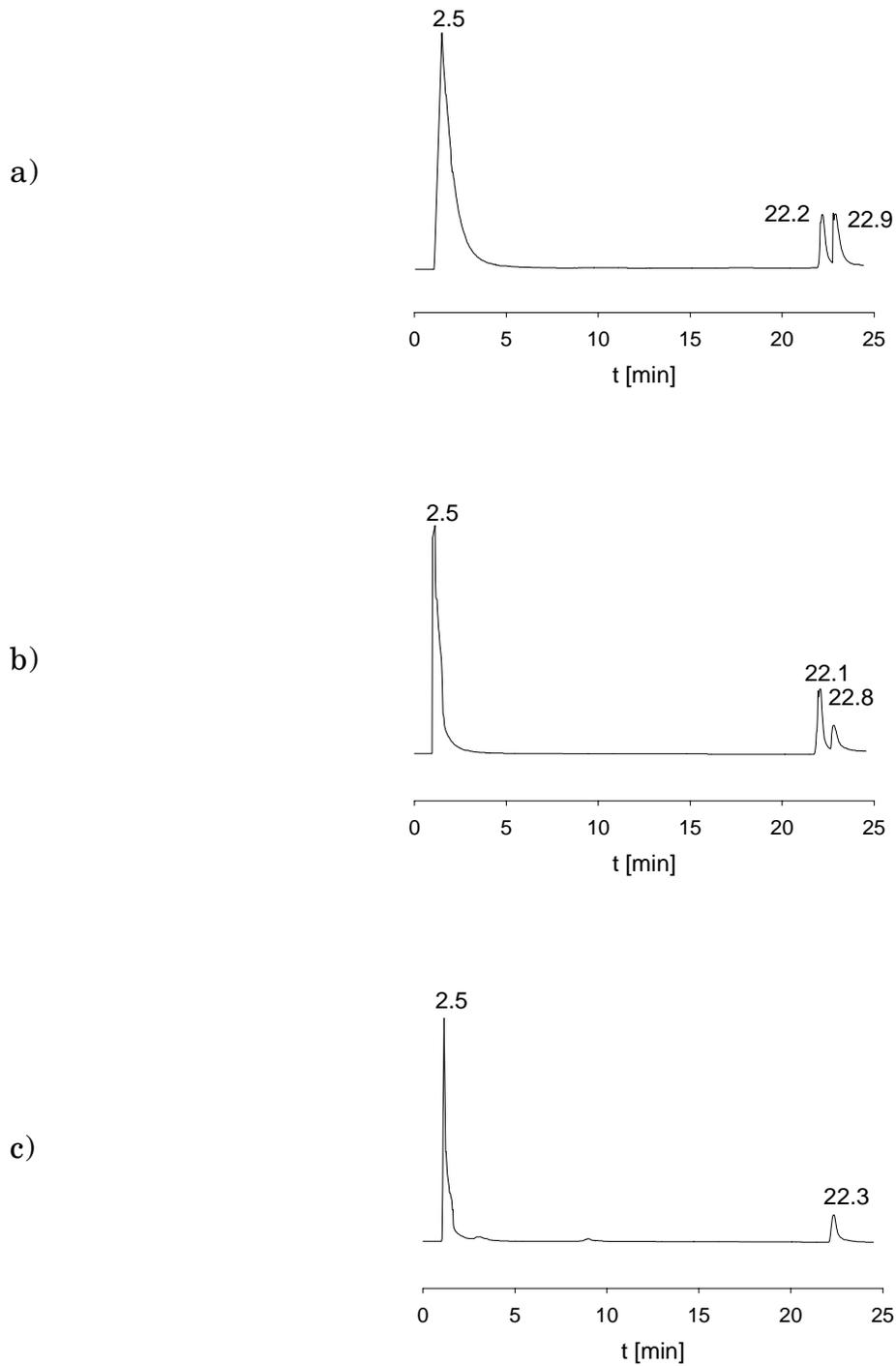


Abbildung 44: Gaschromatogramme an chiraler Phase eines racemischen Gemisches von (R,S)- und (S,R)-2,3-Heptandiol (a)), eines 60:40-Gemisches dieser beiden Enantiomere (b)) und des durch enzymatische Reduktion gebildeten 2,3-Heptandiols (c)) bei 50°C.

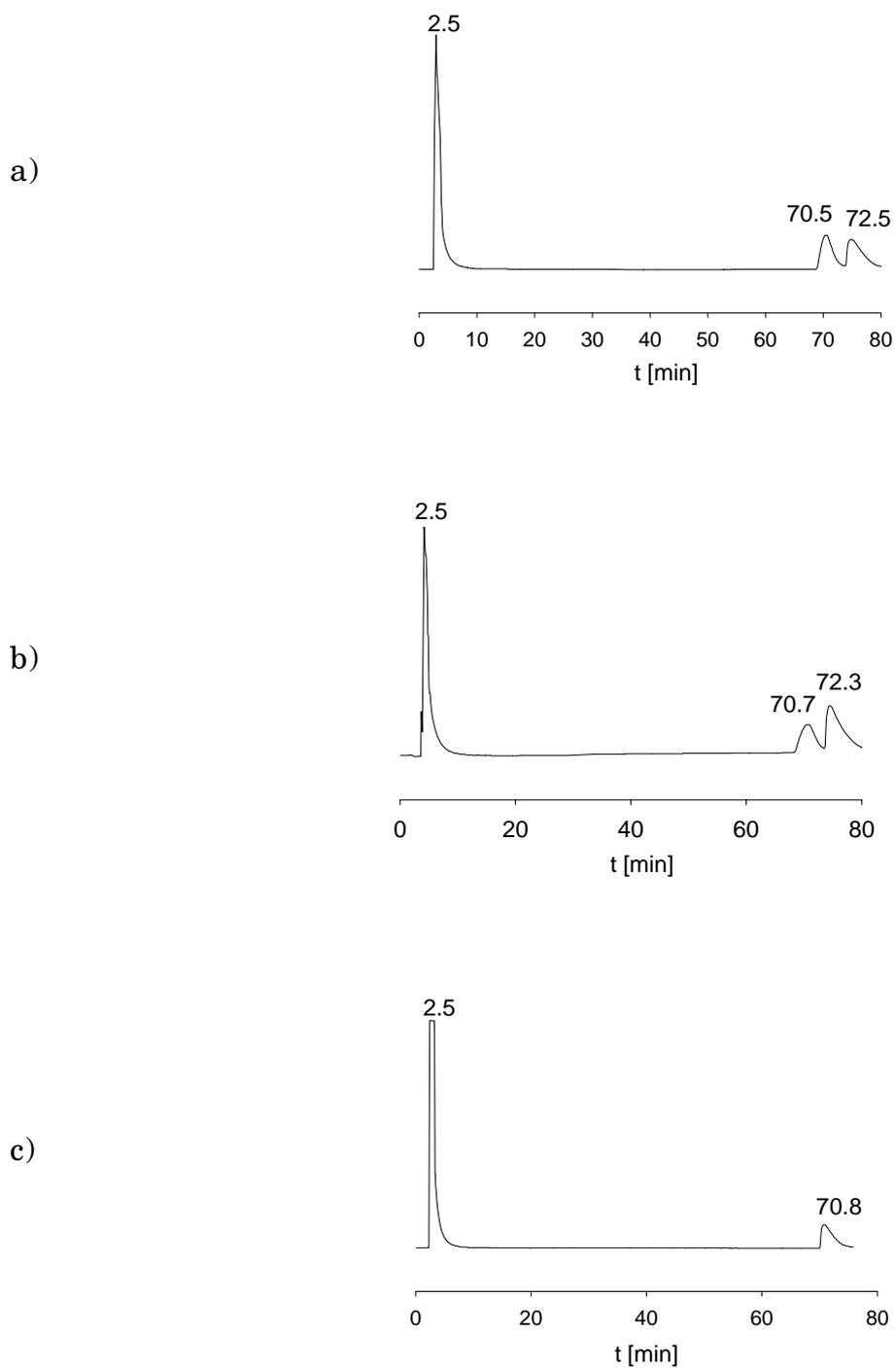


Abbildung 45: Gaschromatogramme eines racemischen Gemisches von (R,S)- und (S,R)-1-Phenyl-1,2-propanandiol (a)), eines 35:65-Gemisches dieser beiden Enantiomere (b)) und des durch enzymatische Reduktion gebildeten 1-Phenyl-1,2-propandiols (c)) bei 60°C.

Zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit der Produkte der enzymatischen Reduktion von 1-Phenyl-1,2-propandion, wurde das Produkt des Umsatzes mit einem racemischen Gemisch von (R,S)- und (S,R)- 1-Phenyl-1,2-propandion verglichen. Zur Zuordnung der beiden Enantiomere erfolgte zusätzlich der Vergleich mit einem Enantiomerengemisch, welches überwiegend das (R,S)-Enantiomer enthalten sollte. Dieses wird, wie Abb. 45 zeigt, bei 72,3 min eluiert. Daher sollte es sich bei der bei 70.7 min eluierten Verbindung um das (R,S)-Enantiomer handeln.

Wie schon bei der Umsetzung des 2,3-Heptandions wird auch hier lediglich eine enantiomere Spezies gebildet, die über die Retentionszeit eindeutig als (R,S)-1-Phenyl-1,2-propandiol identifizierbar ist.

Die Enantiomerenreinheit der Produkte der enzymatischen Reduktion von 2,4-Pentandion wurde durch den Vergleich des Umsatzprodukts mit einem racemischen Gemisch von meso, (R,R)- und (S,S)- 2,4-Pentandiol überprüft. In Abb. 29 ist deutlich zu erkennen, dass bei 60°C eine Basislinientrennung erfolgte. Das Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung zeigt, dass ausschließlich das (S,S)-Enantiomer, welches durch direkten Vergleich mit einem käuflich erworbenen Standard identifiziert werden konnte, gebildet wird. Dieses wird bei 8.3 min eluiert. Bei der bei 5 min eluierten Substanz, die in einem hohen prozentualen Anteil im Vergleich mit (S,S)-2,4-Pentandiol gebildet wird, handelt es sich vermutlich um das als Zwischenprodukt gebildete 2-Hydroxy-4-pentanone. Die bei 3.2 min eluierte Substanz konnte als 2,4-Pentandion, also als unumgesetztes Edukt, identifiziert werden.

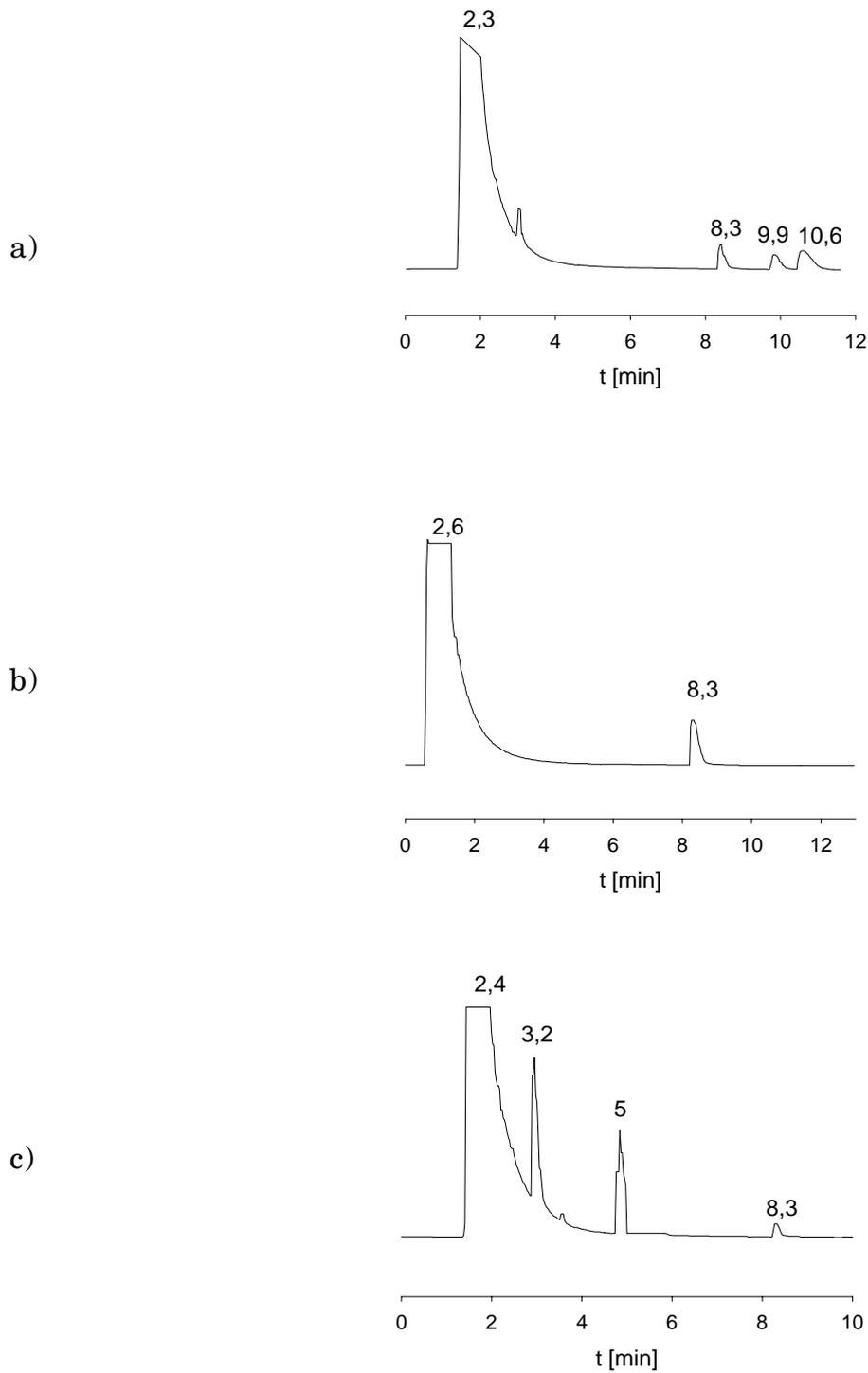


Abbildung 46: Gaschromatogramme für 2,4-Pentandiol bei 60°C;. Alle Proben wurden mit TFAA derivatisiert; a) racemisches Gemisch von meso, (R,R)- und (S,S)-2,4-Pentandiol; b) (S,S)-2,4-Pentandiol; c) durch enzymatische Reduktion von 2,4-Pentandion synthetisiertes 2,4-Pentandiol.

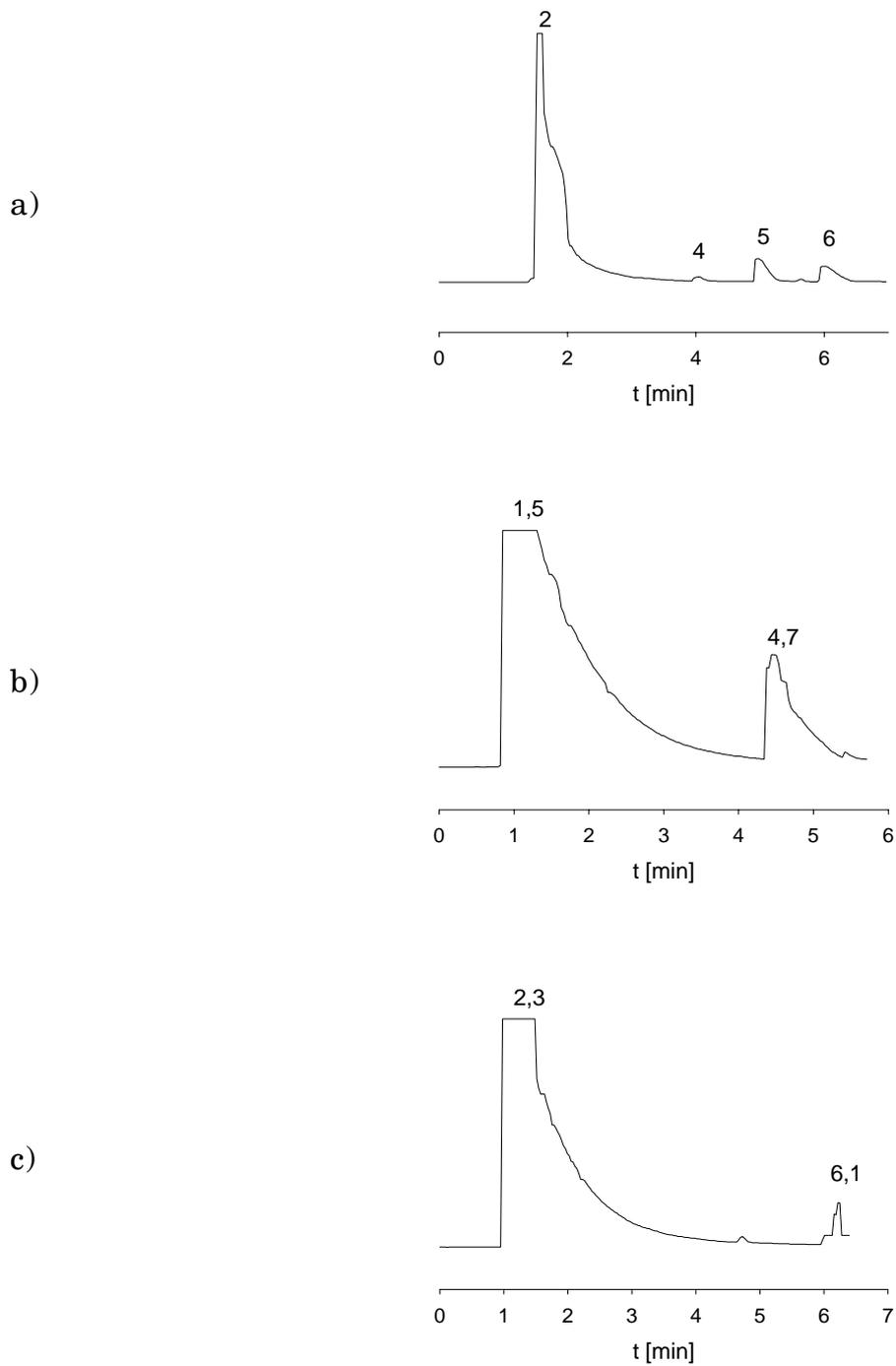


Abbildung 47: Gaschromatogramme für Methyllactat bei 60°C. Alle Proben wurden mit TFAA derivatisiert; a) racemisches Gemisch von (R)- und (S)- Methyllactat; b) (S)-Methyllactat; c) durch enzymatische Reduktion von Methylpyruvat synthetisiertes Methyllactat.

Der Vergleich mit dem käuflich erworbenen (S)-Standard, der bei 4.7 min eluiert wird zeigt eindeutig, dass durch enzymatische Reduktion von Methylpyruvat ausschließlich (R)-Methylactat gebildet wird.

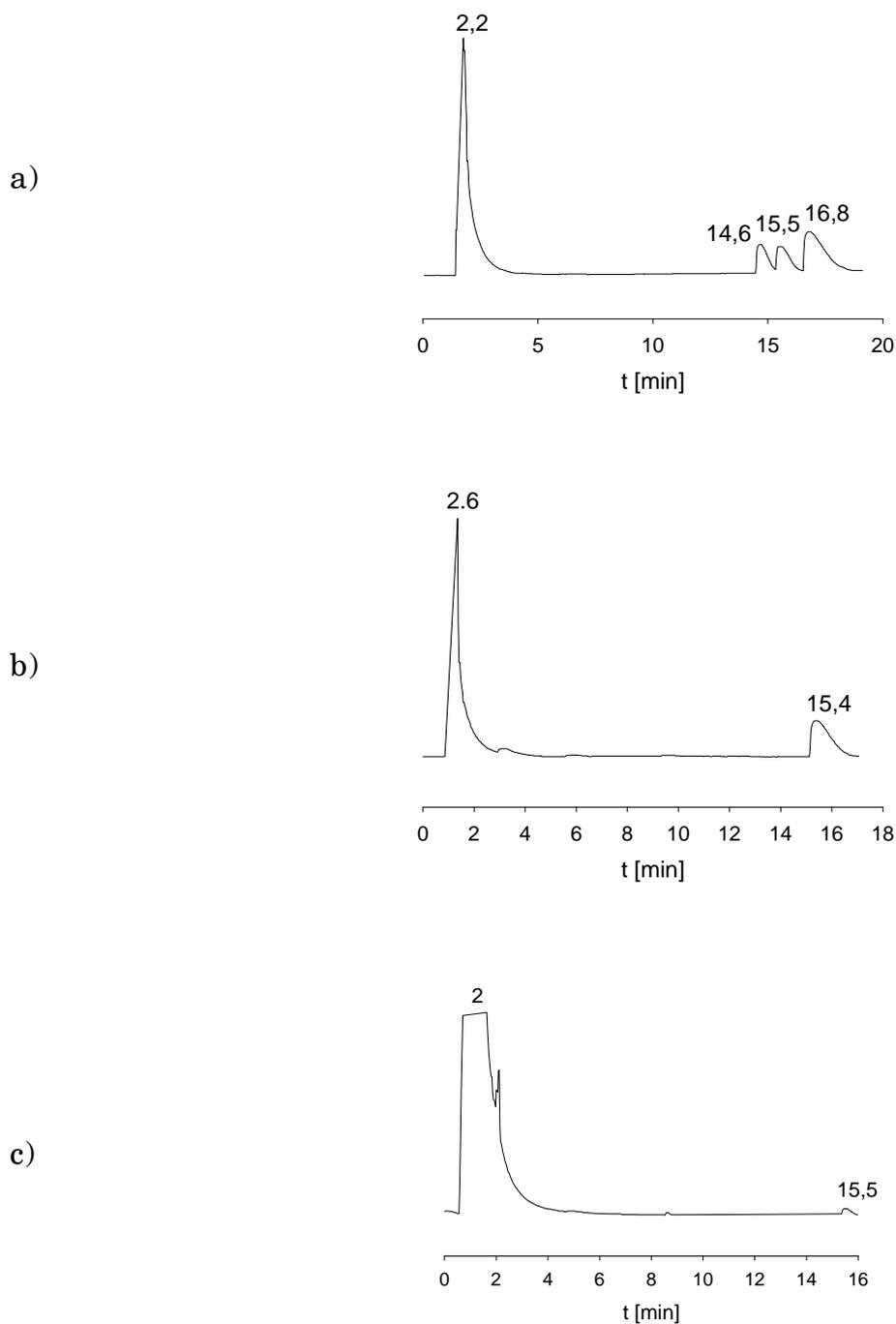


Abbildung 48: Gaschromatogramme für 2,5-Hexandiol bei 65°C. Alle Proben wurden mit TFAA derivatisiert; a) racemisches Gemisch; b) (R,R)-2,5-Hexandiol; c) durch enzymatische Reduktion aus 2,5-Hexandion synthetisiertes 2,5-Hexandiol.

Die Enantiomerenreinheit der Produkte der enzymatischen Reduktion von 2,5-Hexandion wurde durch den Vergleich des Umsatzprodukts mit einem racemischen Gemisch von meso, (R,R)- und (S,S)- 2,5-Hexandiol überprüft. In Abb. 48 ist deutlich zu erkennen, dass bei 60°C eine Basislinientrennung erfolgte. Das Chromatogramm der Produkte der enzymatischen Umsetzung zeigt, dass ausschließlich das (R,R)-Enantiomer gebildet wird, welches durch direkten Vergleich mit einem käuflich erworbenen (R,R)-Standard identifiziert werden konnte,.

2.9.4 Messung der optischen Aktivität

Die optische Aktivität des durch enzymatische Reduktion dargestellten 1,2-Propandiols wurde wie unter 4.2.11 beschrieben gemessen und berechnet.

Hierbei konnte ein $[\alpha]_{20}^D$ -Wert = + 22° (c= 0.1 mM, Dichlormethan) gemessen werden. Der Literaturwert für (S)-1,2-Propandiol beträgt + 15,8° (c=1.00 mM, Ethanol, Merck-Index, 5.Auflage) und - 15,8° für (R)-1,2-Propandiol (c=1.00 mM, Ethanol, Merck-Index, 5.Auflage). Die Abweichung von den Literaturwerten kann durch die niedrige Konzentration des Diols in der Messlösung erklärt werden. Trotz dieser Ungenauigkeit konnte der Drehsinn, durch den eine Unterscheidung der beiden Enantiomere möglich ist, eindeutig bestimmt werden. Bei dem isolierten Enantiomer handelt es sich um (S)-1,2-Propandiol.

3 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war vor allem die Bestimmung der Substrat- und Stereospezifität der Galactitoldehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter spaeroides* D. Mit Hilfe der von Scheidig et al. erstellten Röntgenkristallstruktur der GatDH sollten Zusammenhänge zwischen der Substratstruktur und der Substratspezifität diskutiert werden.

Die Ursache der Substratspezifität beruht in den meisten Fällen entweder auf dem räumlichen Aufbau der Bindungstasche des Enzyms oder auf Wechselwirkungen des Substrats mit bestimmten Aminosäureresten. Ein Maß für die Substratspezifität ist das Verhältnis aus der spezifischen Aktivität und der Michaelis-Menten-Konstante (k_{cat}/K_M), welches mit Hilfe von Sättigungskinetiken experimentell bestimmt wurde.

Die Stereospezifität eines Enzyms hingegen beruht auf der Bevorzugung einer bestimmten Bindungskonfiguration des Substratmoleküls im aktiven Zentrum. Hierbei erfolgt entweder bei der Umsetzung prochiraler Substrate die Bildung nur eines Enantiomers, oder das Enzym ist in der Lage, verschiedene Enantiomere zu unterscheiden und nur ein bestimmtes als Substrat umzusetzen. Letztere Eigenschaft einiger Enzyme wird z.T. bereits in der organischen Synthese zur Deracemisierung von racemischen Gemischen genutzt. Die Stereospezifität der Enzyme ist in der Natur in vielen Stoffwechselreaktionen von großer Bedeutung (z.B. Aminosäuresynthese). Experimentell lässt sich die Stereospezifität eines Enzyms am besten durch die Analyse der Umsetzungsprodukte der enzymatischen Reaktion ermitteln. Dies kann auf chromatographischem Wege (GC, HPLC) mit Hilfe einer chiralen Säule erfolgen oder für Verbindungen mit einem Chiralitätszentrum durch Ermittlung des spezifischen Drehwertes.

Strukturen der GatDH mit gebundenen Inhibitoren könnten genauere Informationen über die Substratbindung im aktiven Zentrum liefern. Hierzu ist es wichtig, kompetitive Inhibitoren zu finden, d.h. solche, die mit Substratmolekülen um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum konkurrieren. Mit Hilfe sogenannter Konkurrenzassays kann die Güte eines Inhibitors, d.h. die Stärke seiner Bindung im aktiven Zentrum, durch die Bestimmung von K_I - bzw. IC_{50} -Werten ermittelt werden. Auch für Inhibitoren kann der Zusammenhang zwischen der Inhibitorstruktur und der Spezifität für die GatDH mit Hilfe der Kristallstruktur des Enzyms diskutiert werden.

Ergänzend können Docking-Untersuchungen einen detaillierteren Einblick in die möglichen Bindungsverhältnisse im aktiven Zentrum verschaffen.

Die GatDH akzeptiert, wie in früheren Arbeiten beschrieben^[9], ein sehr breites Substratspektrum, welches bisher v.a. für die Oxidationsreaktion untersucht wurde. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich hingegen weitestgehend auf das Substratspektrum der Reduktionsreaktion.

Ob nun eine Carbonylverbindung von der Galactitoldehydrogenase als Substrat akzeptiert wird, ist von der Komplementarität der Strukturen des Substrats und des Enzyms abhängig. Da die GatDH in der Natur Galaktitol, einen C6-Körper, als Substrat verwendet, ist anzunehmen, dass andere Substrate dieser Größe, wie zum Beispiel Diketone oder Hydroxyketone, ebenfalls in das Substratspektrum fallen. Da es sich bei Galaktitol um eine aliphatische Verbindung handelt, liegt zudem die Annahme nahe, dass andere aliphatische Verbindungen auch als Substrate dienen können. Ob die Kettenlänge hierbei eine entscheidende Rolle spielt, hängt vom Aufbau des aktiven Zentrums ab. Synthetisch interessant erscheint die Eignung verzweigter oder cyclischer Substrate oder von Verbindungen mit aromatischen Resten als Substrate. Da die GatDH zur Familie der Polyoldehydrogenasen gehört, sind sowohl die Anzahl als auch

die Position von Carbonyl- und Hydroxylgruppen am Substrat wichtig für dessen Bindung am Enzym. Docking-Untersuchungen an der von Scheidig et al. erstellten Kristallstruktur der GatDH liefern hierbei wichtige Informationen über mögliche Ankerstellen im aktiven Zentrum. Diese Informationen sind die Grundlage für die Diskussion des Katalysemechanismus, der wiederum entscheidend für die Umsetzung verschiedener Substratklassen ist. Aufgrund der in Abschnitt 2.8 näher erläuterten Vorgehensweise bei den Docking-Untersuchungen, liefern diese nur ein sehr oberflächliches Bild über die Bindung eines Substrates am Enzym.

3.1 Ein Vorschlag zum Katalysemechanismus der GatDH

Bei allen Enzymen, die zur Familie der short-chain-Dehydrogenasen (SDR) gezählt werden, wird übereinstimmend von der Aminosäuresequenz TyrXXXLys (X kann jede beliebige Aminosäure sein) im aktiven Zentrum berichtet^[32-34]. Die Galactitoldehydrogenase besitzt ebenfalls diese charakteristische Sequenz, nämlich Tyr159XXXLys163.

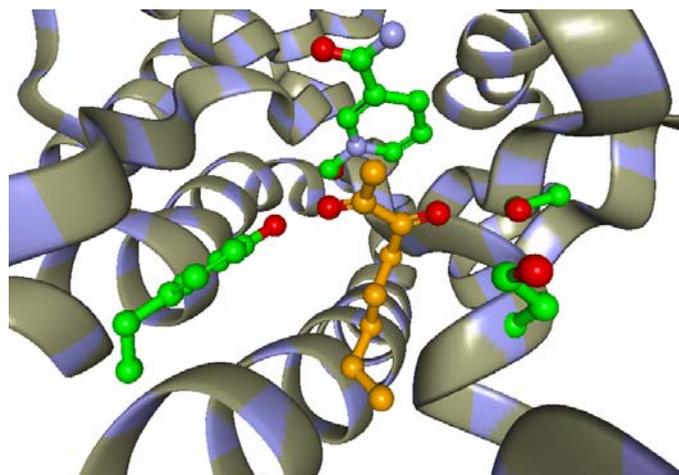


Abbildung 49: Aktives Zentrum der GatDH mit NADH (grün) und 2,3-Octandion (gelb) als Substrat.

Wie Abb. 49 und Abb. 50 zeigen, befinden sich sowohl ein Tyrosin- als auch ein Lysinrest in der Nähe des Nikotinamidringes des Cofaktors. Hierbei handelt es sich um Tyr159 und Lys163. Außerdem befinden sich zwei Serinreste, nämlich Ser 144 und Ser146, nahe am Substrat. Diese spielen aufgrund ihres Abstandes zu Substrat und Nikotinamidring sehr wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Katalyse.

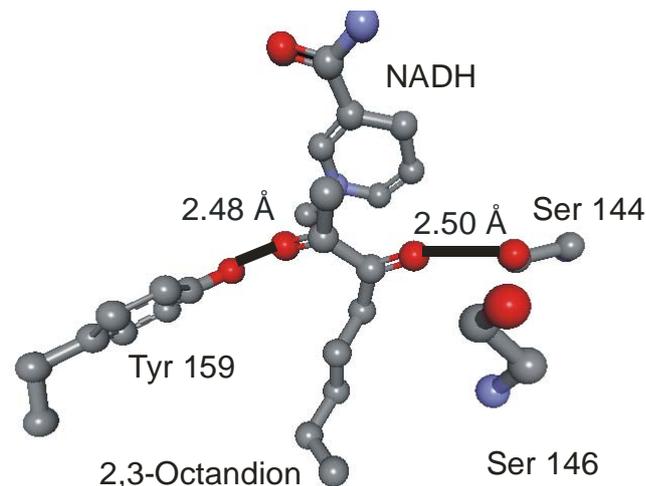
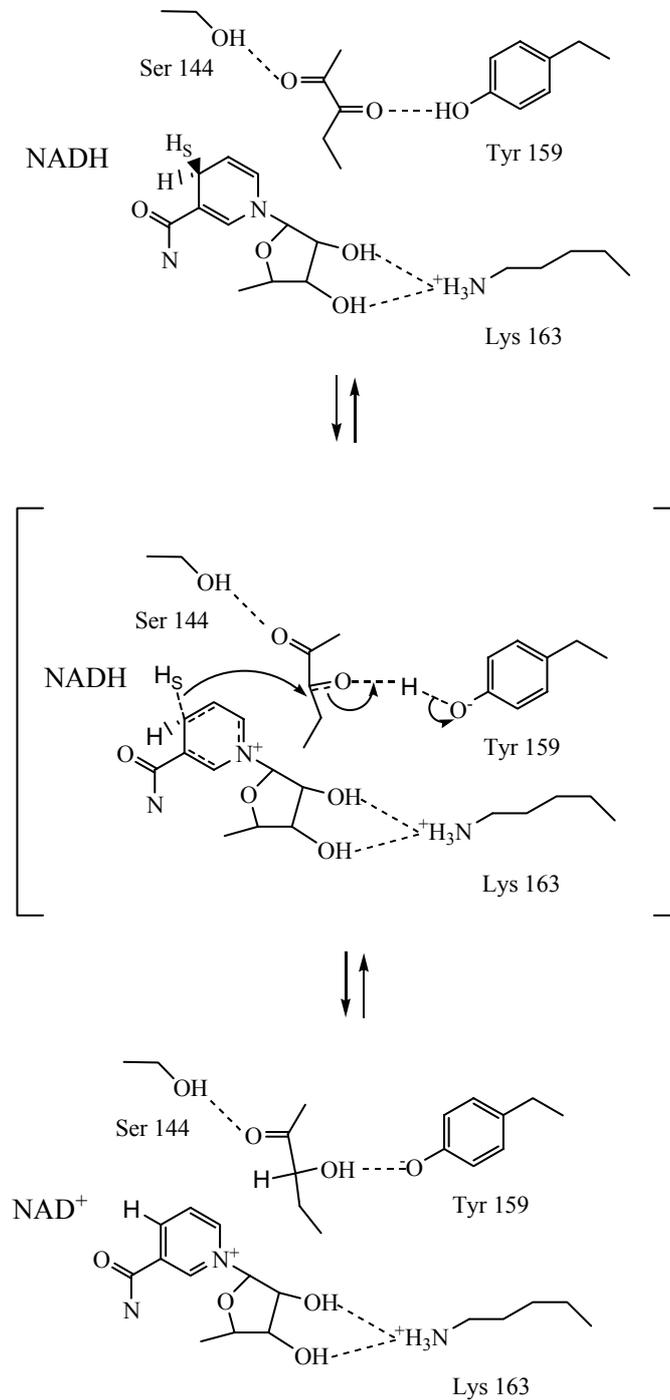


Abbildung 50: Aminosäurereste im aktiven Zentrum, die an der Bindung von Substrat und Coenzym beteiligt sind.

Dockingergebnisse mit dem von uns verwendeten Programm Ballview legen nahe, dass Tyr159, welches sich sehr nahe am Nikotinamidring befindet, direkt an der Katalyse beteiligt ist, während Ser144 anscheinend eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoffatom der benachbarten Carbonylgruppe des Substrates (im Falle eines α -Diketons) ausbilden kann und die Position des Substrates so stabilisiert. Tyr159 polarisiert mit seiner Hydroxygruppe wahrscheinlich die zu reduzierende Carbonylgruppe und erleichtert somit den Hydridtransfer vom NADH. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass der Tyrosinrest sein Hydroxylproton auf das katalytisch gebildete Alkoholat überträgt.

Die Aufgabe des Lysinrestes Lys163 als Teil der katalytischen Triade Ser-Tyr-Lys besteht nun zum einen darin, durch Wechselwirkung mit den

2'-und 3'-Hydroxylgruppen des Riboseresestes des Nikotinamids den Cofaktor in einer Position zu lokalisieren, in der ein Hydridtransfer auf das Substrat noch möglich ist^[15].



Schema 24: Vorgeschlagener Mechanismus der Reduktion eines 1,2-Diketons zum Hydroxyketon im aktiven Zentrum der GatDH.

Zum anderen erniedrigt Lys163 den pKa-Wert der Hydroxylgruppe des Tyr159, der normalerweise bei ungefähr 10 liegt, jedoch zur Übertragung eines Protons auf das gebildete Alkoholat niedriger sein sollte^[33].

Der von uns in Schema 24 vorgeschlagene katalytische Mechanismus ähnelt sehr stark dem von Tanaka et al. vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus für die Umsetzungen der 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, bei der es sich ebenfalls um eine short-chain-Dehydrogenase handelt^[15]. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass Tanaka die Oxidation eines Hydroxylrestes beschreibt, während wir praktisch die Rückreaktion beschreiben. Außerdem bildet der benachbarte Serinrest bei uns eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer benachbarten Carbonylgruppe aus und nicht zu der gleichen, die bereits von Tyr159 gebunden ist. Die Funktion des Serinrestes besteht jedoch, genau wie bei Tanaka beschrieben, darin, das Substrat in der Nähe des Nikotinamidringes zu fixieren und das Reaktionsintermediat zu stabilisieren.

Im ersten Reaktionsschritt bildet sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr159 und der Carbonylgruppe, an der die Reduktion erwartet wird, und zwischen der Hydroxylgruppe des Ser144 und der in α -Stellung befindlichen Carbonylgruppe des Substrates. Im zweiten Schritt kann der Hydridtransfer vom NADH auf die durch die Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr 159 polarisierte Carbonylgruppe erfolgen. Dabei wird das phenolische Proton des Tyrosinrestes auf das gebildete Alkoholat übertragen. Somit könnte auch das pH-Optimum von pH 6,5 für die Reduktionsreaktion erklärt werden. Die Rückreaktion, deren pH-Optimum bei pH 9 liegt, könnte wie bei Tanaka et al. beschrieben^[15] mit Tyr 159 als katalytischer Base ablaufen.

3.2 Das Substratspektrum der GatDH

Ausgehend von den bereits von Giffhorn et al.^[9] getesteten Substraten für die Reduktionsreaktion der GatDH, wurden nun verschiedene Substanzklassen als potentielle Substrate getestet. Hierzu gehören die Aldehyde, Ketone, 1,2-, 1,3- und 1,4-Diketone, sowie verschiedene Hydroxyketone, Ketoester und Zucker.

In erster Linie gelten die 1,2-Diketone als sehr viel versprechende Kandidaten. Für diese Verbindungsfamilie wurde durch vielfältige Variation der Kettenlänge und der Position der 1,2-Dicarbonylfunktionalität, sowie durch Einführung von Kettenverzweigungen und aromatischen Resten, das aktive Zentrum der GatDH praktisch kartiert.

Alle getesteten Aldehyde und Ketone wurden von der GatDH nicht umgesetzt, was den Schluss nahe legt, dass nur Verbindungen mit mindestens zwei zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigten Gruppen im aktiven Zentrum gebunden werden können. Mit Hilfe der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Docking-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass an der Bindung von Substraten im aktiven Zentrum mehrere Aminosäurereste beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um Tyr 159, Ser 144 und Ser 146. Die Serinreste scheinen hierbei besonders bei der Fixierung eines Substrates in der Nähe der Nikotinamidringes und des katalytisch aktiven Tyrosinrestes eine entscheidende Rolle zu spielen.

Von den getesteten aliphatischen α -Diketonen erwiesen sich fast alle als Substrate der GatDH, mit Ausnahme des kleinsten Vertreters, des Glyoxals.

Sämtliche verzweigten α -Diketone, die getestet wurden, konnten von der GatDH umgesetzt werden, wie auch 1,4-Dibrom-2,3-butandion mit seinen beiden sperrigen Bromsubstituenten. Hierbei wird deutlich, dass auch

sterisch recht anspruchsvolle Verbindungen wie z.B. 2-Methyl-4,5-octandion im aktiven Zentrum Platz finden, und dort gebunden werden können. Von den beiden getesteten cyclischen Verbindungen 3-Methylcyclopentan-1,2-dion und 1,2-Cyclohexandion wurde lediglich Letzteres von der GatDH umgesetzt. Der Grund hierfür ist nicht im sterischen Anspruch des 3-Methylcyclopentan-1,2-dion zu suchen, sondern eher in einer für die Bindung im aktiven Zentrum ungünstigen Ausrichtung der beiden Carbonylgruppen.

Stellvertretend für Verbindungen mit aromatischem Rest wurde ausgehend von 1-Phenylpropan 1,2-dion die homologe Reihe bis zum 1-Phenylhexan-1,2-dion getestet, wobei die Alkylkette jeweils um eine CH₂-Gruppe verlängert wurde. Ab 1-Phenylpentan-1,2-dion ist jedoch keine Umsetzung mehr zu beobachten, was vermutlich mit der Sperrigkeit des Phenylringes auf der einen Seite und derjenigen des Propylrestes auf der anderen Seite der Dicarboxylfunktionalität zusammenhängt. Auch Benzil mit seinen beiden Phenylsubstituenten wurde nicht von der GatDH umgesetzt. Im Falle der α -Diketone kann der sterische Anspruch also nur in einer Richtung beliebig erhöht werden, ohne eine Verringerung der katalytischen Effizienz des Enzyms zu verursachen.

Die α -Hydroxyketone stellen eine besondere Stoffklasse für die GatDH dar. Sie dienen dem Enzym als Substrate sowohl für die Oxidations- als auch für die Reduktionsreaktion. Außerdem werden sie, wie in Abschn. 3.6 noch ausführlicher beschrieben wird, als Zwischenprodukte bei der Reduktion von 1,2-Diketonen und vermutlich auch bei der Oxidation von 1,2-Diolen gebildet. Die Hydroxyketone besitzen alle eine reduzierbare Carbonylgruppe in direkter Nachbarschaft zu einer oder mehreren Hydroxygruppen und werden, wie Docking-Untersuchungen zeigen, genauso wie 1,2-Diketone über Tyr 159 und Ser 144 im aktiven Zentrum gebunden.

Von den getesteten Vertretern dieser Verbindungsklasse wurden die meisten von der GatDH umgesetzt. 3-Hydroxy-4-hexanon und D,L-Glycerinaldehyd zeigten keine Umsetzung mit dem Enzym. Da es sich bei diesen Verbindungen um sterisch nicht sehr anspruchsvolle Verbindungen handelt, liegt der Schluss nahe, dass sie zwar im aktiven Zentrum gebunden, jedoch dort nicht oder zumindest nur sehr langsam umgesetzt werden.

Der Grund hierfür könnte eine sehr feste Bindung dieser beiden Substanzen im aktiven Zentrum sein, durch welche die Abspaltung der bereits umgesetzten Substrate und damit die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit so stark herabgesetzt wird, dass die Umsetzung mit dem von uns angewendeten photometrischen Verfahren nicht mehr beobachtbar war.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass diese Hydroxyketone unproduktiv im aktiven Zentrum binden. Dies kann entweder durch Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Ankergruppen, wie z.B. den Serinresten oder durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen.

Tropolon wurde nicht von der GatDH umgesetzt, weil die Reduktion seiner Carbonylgruppe die Aufgabe des energetisch günstigen aromatischen Systems des Tropolon-Ringes zur Folge hätte.

Von den getesteten Zuckern, die auch zur Familie der Hydroxyketone gezählt werden können, erwies sich lediglich D-(-)-Erythrose als Substrat. Alle anderen getesteten Aldosen und Ketosen, zu denen neben D-(+)-Glucose, D-(+)-Galactose und D-(-)-Fructose auch D-(+)-Fucose, beta-D-Allose, L-(-)-Sorbose, D-(+)-Mannose, D-(-)-Tagatose, L-(+)-Arabinose, D-(-)-Lyxose, D-(-)-Ribose gehörten, wurden nicht umgesetzt. Vermutlich werden nur Zucker, die in offenkettiger Form vorliegen, wie z.B. die Tetrose Erythrose, von der GatDH reduziert, da nur in der ringoffenen Form die Aldehyd- bzw. Ketonfunktionalität zugänglich ist. Alle anderen getesteten Zucker gehören zur Familie der Pentosen oder Hexosen und liegen fast

ausschließlich in Ringform vor, in der die Aldehyd- bzw. die Ketogruppe das anomere Kohlenstoffatom darstellen, über welches der Ringschluss zum Halbacetal erfolgt.

Außer Acetylaceton und 2-Methyl-4,6-heptandion wurde keines der getesteten β -Diketone umgesetzt. Acetylaceton stellt den kleinsten Vertreter der 1,3-Diketone dar. Die nicht umgesetzten 3-Methyl-2,4-pentandion und 3-Ethyl-2,4-pentandion besitzen zwischen den beiden Carbonylgruppen jeweils einen Alkylrest, der aus sterischer Sicht die Bindung im aktiven Zentrum erschweren könnte. Allerdings handelt es sich bei jedem dieser drei Diketone um kompetitive Inhibitoren der GatDH, die zudem einen ähnlichen IC_{50} -Wert besitzen, wie in einem späteren Abschnitt noch ausführlicher beschrieben wird. Die geringe katalytische Aktivität der GatDH gegenüber den 1,3-Diketonen lässt sich daher eher über die Art der Bindung im aktiven Zentrum als durch sterische Hinderung erklären.

Die Docking-Untersuchungen mit 2,4-Hexandion ergaben, dass die Bindung im aktiven Zentrum der GatDH über die beiden Serinreste Ser 144 und Ser 146 erfolgt. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine mehr oder weniger unproduktive Bindung, weil an allen in der Literatur^[15] beschriebenen Reduktionen von Carbonylgruppen in SDR-Enzymen das Mitwirken eines Tyrosinrestes, hier Tyr 159, von Nöten ist. Entweder ist ein Serinrest nicht in der Lage, die Carbonylgruppe in gleicher Weise zu polarisieren wie ein Tyrosinrest, oder der Abstand der Carbonylgruppen zum Nikotinamidring ist durch die Fixierung an beiden Serinresten zu groß, um einen Hydridtransfer zu gewährleisten.

Unter den 1,4-Diketonen wurden nur die ersten drei Vertreter der homologen Reihe (2,5-Hexandion bis 2,5-Undecandion) sowie 1-Phenyl-1,4-pentandion von der GatDH umgesetzt. Ab einer gewissen Kettenlänge scheint die Bindung im aktiven Zentrum aus sterischer Sicht erschwert zu sein. Allerdings handelt es sich bei allen getesteten 1,4-Diketonen um sehr potente Inhibitoren (Abschnitt 2.6). Daher lässt sich auch hier die geringe

katalytische Aktivität der GatDH gegenüber dieser Verbindungsklasse, wie schon im Falle der 1,3-Diketone, eher durch die Bindungsart im aktiven Zentrum als durch die sterische Hinderung erklären.

Docking-Untersuchungen mit dem Programm Ballview zeigten, dass die Bindung von 1,4-Diketonen im aktiven Zentrum der GatDH über den Tyrosinrest Tyr 159 und den Serinrest Ser 146 erfolgt. Hierbei scheint es sich trotz der Beteiligung des Tyrosinrestes ebenfalls um eine recht unproduktive Bindung zu handeln, was durch den großen Abstand der beiden Carbonylgruppen und damit der Bindungsstellen im Enzym erklärt werden kann. Möglicherweise ist die Fixierung des Substrates in der Nähe des Nikotinamidringes nicht so effizient wie im Falle der 2,3-Diketone, weil durch die 1,4-Stellung dem Substrat ein höheres Maß an Bewegungsfreiraum zur Verfügung steht.

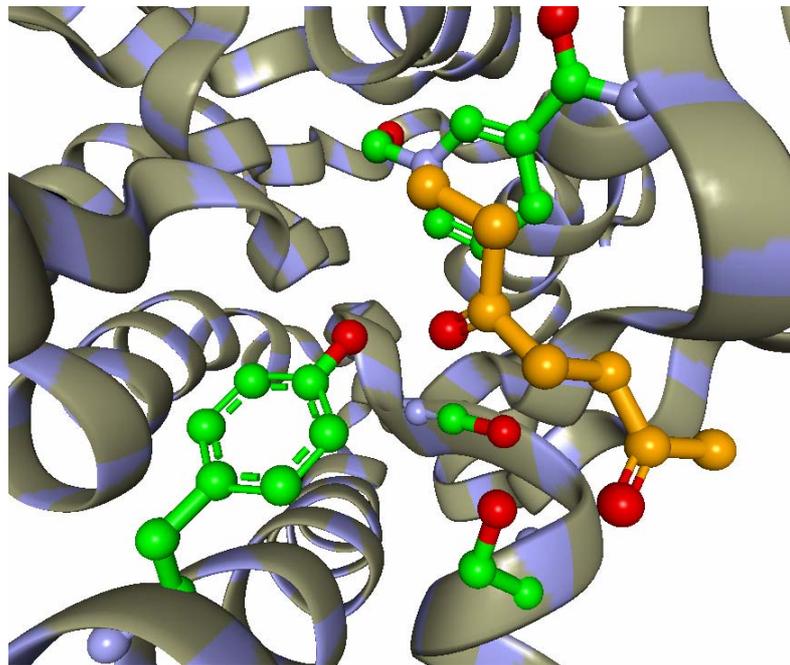


Abbildung 51: Docking eines 1,4-Diketons (hier: 2,5-Heptandion) im aktiven Zentrum.

Alle getesteten Ketoester, mit Ausnahme von Diethylketomalonat, erwiesen sich als Substrate der GatDH. Die Tatsache, dass Oxalsäurediethylester und auch L-(+)-Ascorbinsäure keine Substrat der GatDH sind, beweist, dass nur Carbonylgruppen, nicht aber Carbonsäureesterfunktionalitäten reduziert werden.

Bei kleineren Ketoestern, wie z.B. Methylpyruvat, kann die Bindung im aktiven Zentrum theoretisch auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Sowohl der Sauerstoff der Carbonsäureestergruppe als auch der Sauerstoff der Carbonylgruppe in α -Position können an den Tyrosinrest gebunden sein. Nur die Carbonylgruppe kann, wie bereits beschrieben, reduziert werden. Im Falle einer produktiven Bindung sollte also nach unserem Verständnis des Mechanismus (Abschnitt 3.1) die Carbonylgruppe über eine Wasserstoffbrückenbindung an Tyr 159 verbunden sein, da nur über den Tyrosinrest eine ausreichende Polarisierung erfolgen kann. Falls die Carbonsäureestergruppe mit dem Tyrosinrest verknüpft ist, kann von einer unproduktiven Bindung ausgegangen werden.

Darüber hinaus wurden noch weitere Verbindungsklassen, die Carbonylgruppen oder ähnliche Funktionalitäten besitzen, getestet. Glutaraldehyd wurde von der GatDH umgesetzt, obwohl die beiden Carbonylgruppen des 1,5-Dialdehyds sehr weit auseinander liegen. Die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum könnte hierbei ähnlich wie bei den 1,2-Deketonen erfolgen, also über Tyr 159 und Ser 144, was eine starke Faltung der Kohlenstoffkette voraussetzt. Außerdem ist eine Bindung denkbar, die derjenigen der 1,4-Deketone, also über Tyr 159 und Ser 146, ähnelt.

Weder Oxalsäure noch Brenztraubensäure dienten der GatDH als Substrat, weil sich die freie Säurefunktion wahrscheinlich störend im aktiven Zentrum auswirkt.

Auch Oximgruppen können von der GatDH scheinbar nicht umgesetzt werden. Sie scheinen sich zudem ähnlich wie Carbonsäuregruppen störend

im aktiven Zentrum auf die Umsetzung von benachbarten Carbonylgruppen auszuwirken, da auch Diacetylmonoxim kein Substrat der GatDH ist.

3.3 Die Substratspezifität der GatDH

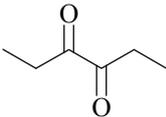
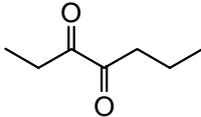
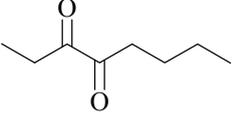
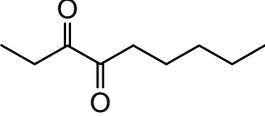
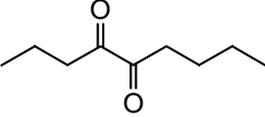
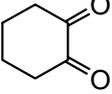
Mit Hilfe von Sättigungskinetiken wurden die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die spezifische Aktivität k_{cat} bestimmt, durch deren Verhältnis, k_{cat}/K_M , die Substratspezifität oder katalytische Effizienz eines Enzyms gegenüber einem Substrat beschrieben werden kann. Je größer der k_{cat}/K_M -Wert, desto besser wird ein Substrat vom jeweiligen Enzym umgesetzt.

Da jedoch alle 2,3-Diketone, einige α -Diketone sowie die meisten Ketoester nicht der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten, war es nicht möglich den K_M -Wert dieser Substanzen zu ermitteln. Der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit konnte für diese Substrate nicht in Form einer hyperbolischen Sättigungskurve beschrieben werden. Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, durchläuft die Reaktionsgeschwindigkeit ein Maximum bei einer bestimmten Substratkonzentration um danach wieder mit zunehmender Konzentration an Substrat kontinuierlich kleiner zu werden. Kinetische Parameter für diese Substrate wurden hier mit Hilfe eines über das Programm Dynafit ermittelten Modells, welches den Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit treffend beschreibt, bestimmt. Hierauf soll später in diesem Abschnitt noch näher eingegangen werden.

Betrachtet man die k_{cat}/K_M -Werte der aliphatischen α -Diketone, so wird zunächst deutlich, dass die 3,4-Diketone umso bessere Substrate darstellen, je länger die Alkylkette ist. Die K_M -Werte der 3,4-Diketone liegen hierbei alle in einem ähnlichen Bereich, nur der k_{cat} -Wert und damit auch die k_{cat}/K_M -Werte nehmen mit wachsender Kettenlänge zu. 3,4-Nonandion und 4,5-Nonandion hingegen sind recht schwache Substrate,

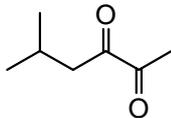
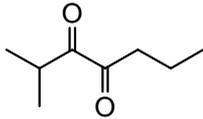
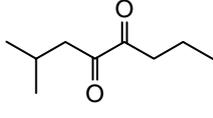
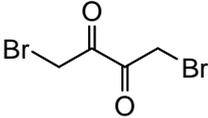
weil in diesem Fall die Länge der Alkylkette in beide Richtungen der Carbonylgruppen eine sterische Hinderung verursacht und damit die Bindung im aktiven Zentrum erschweren kann. 4,5-Dione werden generell schlechter umgesetzt als 3,4-Diketone, was vermutlich mit der sterisch ungünstigeren 4,5-Stellung der Carbonylgruppen zusammenhängt. Trotz seiner recht starren Konfiguration erfolgt die Umsetzung von 1,2-Cyclohexandion ebenso effizient, wie die der meisten aliphatischen Vertreter.

Tabelle 30: Kinetische Daten einiger 1,2-Diketone.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [(mM*sec) ⁻¹]
3,4-Hexandion		0.200 ± 0.003	1.2 ± 0.1	0.164
3,4-Heptandion		0.42 ± 0.03	1.2 ± 0.2	0.36
3,4-Octandion		3.06 ± 0.16	1.15 ± 0.14	2.11
3,4-Nonandion		0.050 ± 0.003	0.20 ± 0.07	0.25
4,5-Nonandion		0.050 ± 0.003	0.20 ± 0.07	0.24
1,2-Cyclohexandion		n.b.	n.b.	0.196 *

Die verzweigten 1,2-Diketone werden im Vergleich zu den aliphatischen etwas schlechter umgesetzt, was vermutlich mit dem erhöhten sterischen Anspruch dieser Substrate zu erklären ist. 2-Methyl-4,5-hexandion zeigt mit einem k_{cat} -Wert von 0.09 s^{-1} eine um mehr als zwei Zehnerpotenzen verringerte spezifische Aktivität im Vergleich zu seinem aliphatischen Verwandten 2,3-Hexandion (k_{cat} -Wert: 29.5 s^{-1}). Beide Diketone unterscheiden sich nur um einen Methylsubstituenten. Dieser jedoch erhöht durch die freie Drehbarkeit des Isopropylrestes den sterischen Anspruch von 2-Methyl-4,5-hexandion beträchtlich.

Tabelle 31: Kinetische Daten verzweigter 1,2-Diketone und von 1,4-Dibrom-2,3-butandion.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_{M} [mM]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [(mM*sec) ⁻¹]
2-Methyl-4,5-hexandion		0.090 ± 0.003	0.7 ± 0.1	0.13
2-Methyl-3,4-heptandion		0.44 ± 0.03	0.9 ± 0.2	0.09
2-Methyl-4,5-octandion		n.b.	n.b.	0.007 *
1,4-Dibrom-2,3-butandion		2.70 ± 0.16	0.35 ± 0.07	4.88

Ein ähnlicher Effekt ist im Falle des 2-Methyl-4,5-octandions ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $0.007 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) zu beobachten. Auch hier ist mit der Einführung eines

Methylrestes und der damit verbundenen Bildung eines frei drehbaren Methylisopropylrestes der sterische Anspruch enorm erhöht. Der Unterschied der katalytischen Effizienz bewegt sich hier ebenfalls im Bereich von zwei Zehnerpotenzen. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von 2-Methyl-3,4-heptandion ist hingegen im Vergleich zu 2-Methyl-4,5-octandion um eine Zehnerpotenz höher.

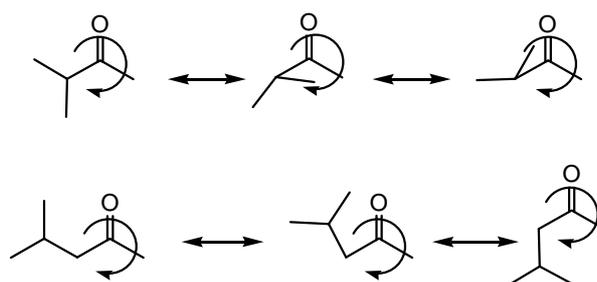


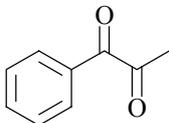
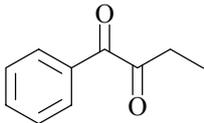
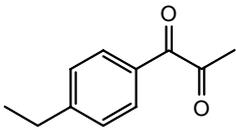
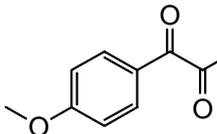
Abbildung 52: Sterischer Anspruch eines Isopropylrestes (oben) im Vergleich zu einem 2-Methylpropylrest (unten).

Der Grund hierfür ist, wie in Abb. 52 dargestellt, ein geringerer sterischer Anspruch eines Isopropylrestes, der im Vergleich zu einem 2-Methylpropylrest nur um eine C-C-Bindungsachse gedreht werden kann. Gegenüber 1,4-Dibrom-2,3-butandion wurde trotz der ziemlich sperrigen Bromsubstituenten in beide Richtungen eine erstaunlich hohe Spezifität ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $4.88 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) festgestellt.

Alle α -Diketone mit aromatischem Rest zeigen deutlich größere $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte als die aliphatischen 3,4- und 4,5-Diketone. Die Einführung eines Phenylrestes scheint keine Verringerung der Spezifität zur Folge zu haben. Darüber hinaus kann der aromatische Rest, wie an den $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten von 1-Phenylpropan-1,2-dion und Ethylphenylpropan-1,2-dion zu erkennen ist, durch zusätzliche Alkylsubstituenten sogar vergrößert werden, ohne die katalytische Effizienz zu verringern. Das Einführen einer Methoxygruppe am aromatischen Ring hingegen führt zu einer Abnahme der Spezifität etwa um Faktor zwei bis drei. Der Sauerstoff der Methoxygruppe als

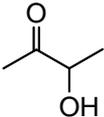
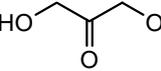
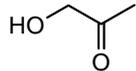
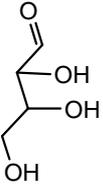
zusätzlicher Wasserstoffbrücken-Akzeptor kann im aktiven Zentrum zur Ausbildung unproduktiver Bindungen beitragen, was die Umsatzgeschwindigkeit verringern würde. Mit wachsender Kettenlänge des Alkylrestes sinkt der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert, wie der Vergleich zwischen 1-Phenylpropan 1,2-dion ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $5.23 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) und 1-Phenylbutan 1,2-dion ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $1.82 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) zeigt. Eine weitere Verlängerung der Alkylkette führt schließlich dazu, dass das Diketon nicht mehr von der GatDH umgesetzt wird, da hier der sterische Anspruch in beide Richtungen der Carbonylgruppen zu hoch ist und die Bindung im aktiven Zentrum erschwert.

Tabelle 32: Kinetische Daten von aromatischen 1,2-Diketonen.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_{M} [mM]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [(mM*sec) ⁻¹]
1-Phenylpropan 1,2-dion		2.20 ± 0.02	0.42 ± 0.01	5.23
1-Phenylbutan- 1,2-dion		1.4 ± 0.1	0.79 ± 0.15	1.82
1-(4-Ethyl- phenyl)-propan- 1,2-dion		6.00 ± 0.24	1.39 ± 0.08	5.17
1-(4-Methoxy- phenyl)propan- 1,2-dion		1.28 ± 0.08	0.59 ± 0.08	2.17

Die katalytische Effizienz gegenüber α -Hydroxyketonen ist deutlich geringer als gegenüber den 1,2-Diketonen. Während Acetoin und Dihydroxyaceton k_{cat}/K_M -Werte im Bereich der aliphatischen 3,4-Diketone aufweisen, ist die Aktivität der anderen Hydroxyketone um ca. eine Zehnerpotenz geringer. Vor allem die K_M -Werte, die bei den getesteten 1,2-Diketonen stets zwischen 0.2 mM und 2.0 mM lagen, nehmen bei den Hydroxyketonen sehr hohe Werte im Bereich von 10 mM bis 40 mM an.

Tabelle 33: Kinetische Daten einiger Hydroxyketone.

Substrat	Formel	k_{cat} [1/sec.]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [(mM*sec) ⁻¹]
Acetoin		2.19 ± 0.04	38.9 ± 3.0	0.17
Dihydroxyaceton		n.b.	n.b.	0.51 *
Hydroxyaceton		1.13 ± 0.14	36.8 ± 7.9	0.03
D-(-)- Erythrose		n.b.	n.b.	5.72 *

Gegenüber D-(-)-Erythrose ist eine unerwartet hohe Spezifität des Enzyms festzustellen, was mit einer gewissen strukturellen Analogie dieser Tetrose mit L-(-)-Tagatose, dem Umsetzungsprodukt der Oxidation von Galactitol durch die GatDH zusammenzuhängen scheint.

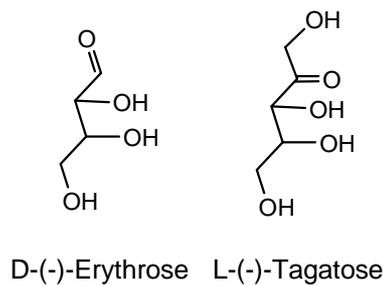
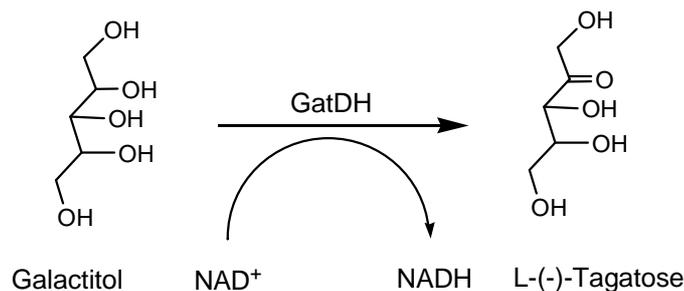


Abbildung 53: Strukturen der D-Erythrose und der L-(-)-Tagatose.

Die Oxidation von Galactitol stellt die Stoffwechselreaktion dar, durch welche die Mutante *Rhodobacter sphaeroides* D ihre Kohlenstoffquelle sichert.



Schema 25: Stoffwechselreaktion in *Rhodobacter sphaeroides* D.

Alle anderen getesteten Zucker, sogar D-(+)-Tagatose, wurden von der GatDH nicht umgesetzt. Allerdings handelte es sich bei diesen Zuckern ausschließlich um Pentosen und Hexosen, die in wässriger Lösung fast nur in Ringform vorliegen, in der die Aldehyd- bzw. Ketonfunktionalität nicht zugänglich ist. Die Carbonylkohlenstoffe stellen hier das anomere C-atom dar, über welches der Ringschluss zum Halbacetal erfolgt.

Die GatDH zeigt gegenüber dem α -Ketoester Ethylbromopyruvat eine katalytische Effizienz, die im Bereich der gegenüber den meisten aliphatischen 1,2-Diketone liegt ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $0.36 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ihre Spezifität

gegenüber dem β -Ketoester Acetessigester ist um eine Zehnerpotenz geringer, was mit der 1,3-Stellung der Carbonylgruppe zur Estergruppe und der damit im Vergleich zu den α -Diketonen und α -Ketoester veränderten Bindung im aktiven Zentrum der GatDH zu erklären ist.

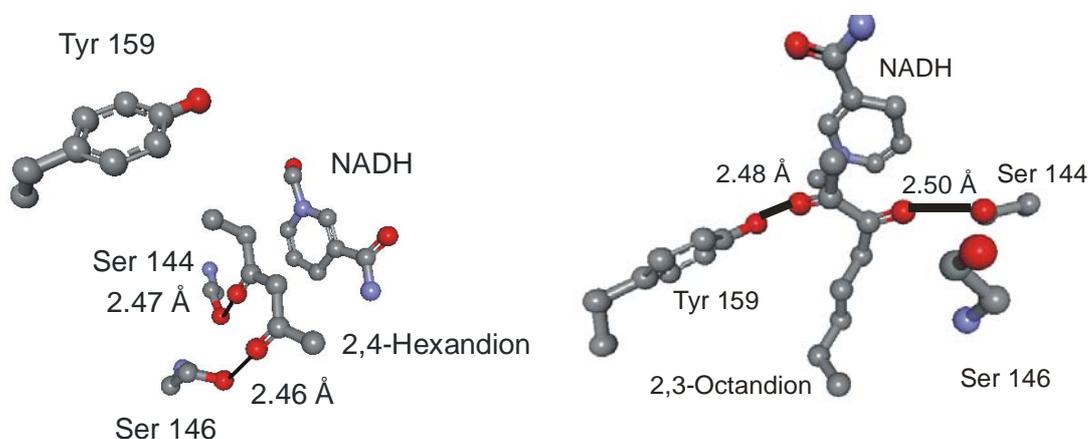


Abbildung 54: Docking eines 2,3-Diketons (rechts: 2,3-Octandion) und eines 2,4-Diketons (links: 2,4-Hexandion).

Die Bindung der β -Ketoester im aktiven Zentrum erfolgt wahrscheinlich in ähnlicher Weise, wie die der 1,3-Diketone, die in Abb 54 dargestellt ist.

Tabelle 34: Kinetische Daten von α - und β -Ketoestern und Glutaraldehyd.

Substrat	Formel	k_{cat}	K_M	k_{cat}/K_M
		[1/sec.]	[mM]	[(mM*sec) ⁻¹]
Ethylbromopyruvat	<chem>BrCC(=O)C(=O)OCC</chem>	1.64 ± 0.03	4.58 ± 0.21	0.36
Acetylaceton	<chem>CC(=O)CC(=O)C</chem>	0.35 ± 0.01	1.66 ± 0.11	0.21
Acetessigester	<chem>CC(=O)CC(=O)OCC</chem>	0.28 ± 0.01	4.1 ± 0.3	0.07
Glutaraldehyd	<chem>O=CCCCC=O</chem>	0.47 ± 0.02	10.5 ± 1.4	0.05

Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der beiden 1,3-Diketone, die umgesetzt wurden, liegen im Bereich der Werte für die aliphatischen 3,4-Diketone. Glutaraldehyd stellt ein deutlich schlechteres Substrat dar, da möglicherweise seine Fixierung in der Nähe des Nikotinamidrings durch die 1,5-Stellung der Carbonylgruppen ineffizienter ist.

Für einige Substrate, wie z.B. 2,3-Diketone, einige 1,4-Diketone und Ketoester konnte die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mit Hilfe eines hyperbolischen Fits treffend beschrieben werden. Diese Verbindungen gehorchten also nicht der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik. Für diese Substrate wurde mit Hilfe des Programmes *DynaFit* ein Mechanismus ermittelt, der den Reaktionsverlauf treffend beschreibt.

Hierzu wurden, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, verschiedene Modelle aufgestellt, die das Durchlaufen einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit und Verlangsamung bei steigender Substratkonzentration simulieren sollen.

Schema 26 zeigt den Mechanismus, der den Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeiten von allen getesteten Modellen am besten erklärt. Hierbei handelt es sich um eine Erweiterung des Michaelis-Menten-Modells, die besagt, dass der Enzymsubstratkomplex (ES) ein weiteres Substratmolekül binden kann und den Enzym-Substrat-Komplex (ESS) bildet, der katalytisch weiterhin aktiv ist und eines der gebundenen Substratmoleküle zum Produkt umsetzt.

Tabelle 35: Vergleich der k_{cat} -Werte des Fits nach Michaelis-Menten mit den k_{cat} -Werten des Fits über das Modell, das mittels Dynafit ermittelt wurde.

Substrat	k_{cat} [s^{-1}]	
	Michaelis-Menten	ESS-Modell (Schema 25)
2,3-Butandion	18.89 ± 0.51	24.0 ± 13
2,3-Heptandion	17.4 ± 0.87	29.5 ± 35
1,4-Dibrom-butan-2,3-dion	2.7 ± 0.16	5.6 ± 51
Ethylpyruvat	0.8 ± 0.05	1.8 ± 34

Der direkte Vergleich der k_{cat} -Werte, die nach Michaelis-Menten bestimmt wurden, mit den k_{cat} -Werten, die durch das Programm Dynafit über den postulierten Mechanismus berechnet wurden, in Tab. 35 zeigt, dass die k_{cat} -Werte nach dem Modell von Michaelis-Menten stets niedrigere Werte annehmen als die über *Dynafit* ermittelten Werte.

Der in dieser Arbeit postulierte Mechanismus (Schema 26) beschreibt den Umsatz des Enzym-Substrat-Komplexes zu dem Produkt P über zwei verschiedene Enzym-Substrat-Komplexe. Der erste k_{cat} -Wert entspricht dem aus der Michaelis-Menten-Gleichung. Er beschreibt den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes ES in Produkt und Enzym. Der zweite k_{cat} -Wert ($k_{\text{cat}2}$) beschreibt den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes ESS zu Produkt und Enzym-Substrat-Komplex ES. Das Modell berücksichtigt hiermit die mit steigender Substratkonzentration auftretende Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Erweiterung des Michaelis-Menten-Mechanismus. Daher nimmt der $k_{\text{cat}2}$ -Wert stets deutlich geringere Werte an als der k_{cat} -Wert. Der Fit nach Michaelis-Menten geht nur von einem k_{cat} -Wert aus und berücksichtigt die die Reaktionsgeschwindigkeit

verringerte Bildung des ESS-Komplexes nicht. Der über den Michaelis-Menten-Fit errechnete k_{cat} -Wert stellt daher eine Art Mittelwert der beiden k_{cat} -Werte dar, die über das hier postulierte Modell erhalten wurde. Auf diese Art und Weise wird versucht, die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substratkonzentration mitzuberücksichtigen, die das Michaelis-Menten-Modell aber eigentlich nicht erklären kann.

Tabelle 36: Kinetische Daten für einige Substrate, deren Sättigungskinetik mittels Dynafit gefittet wurde.

Substrat	$k_{\text{cat}1}$ [s^{-1}]	$k_{\text{cat}2}$ [s^{-1}]	$K_{\text{ES}} =$ $k_{\text{D}1}/k_{\text{S}1}$ [mM]	$K_{\text{ESS}} =$ $k_{\text{D}2}/k_{\text{S}2}$ [mM]
2,3-Butandion	24.0 ± 13	$10.0 \pm$ 0.0024	12.99	270.2
2,3-Pentandion	16.0 ± 3.6	1.9 ± 1.9	0.046	16.95
2,3-Heptandion	60.7 ± 1900	9.6 ± 31	2.70	0.34
2,3-Octandion	90 *	2.5 ± 66	0.43	1.16
Ethylpyruvat	1.8 ± 34	0.6 ± 0.32	3.03	0.98
1,4-Dibrombutan- 2,3-dion	5.6 ± 51	1 *	1.08	1.13
Acetonylaceton	0.08 ± 0.23	$0.017 \pm$ 0.001	2.56	6.66
2,5-Octandion	$1.24 \pm$ 0.0001	5.54 ± 800	0.87	769.2
1-Phenyl-1,4- pentandion	1 *	5.16 ± 0.2	0.58	2.27

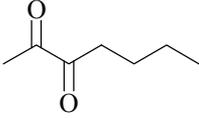
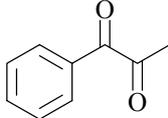
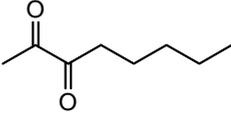
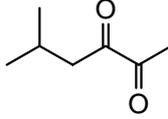
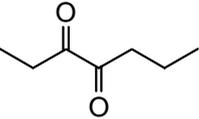
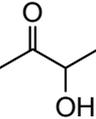
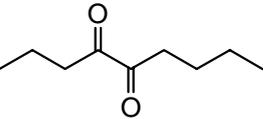
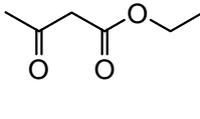
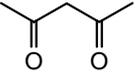
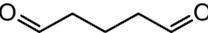
Die hierbei erhaltenen kinetischen Daten zeigen, dass alle k_{cat} -Werte, die den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes ES in Produkt und Enzym beschreiben, um ein vielfaches größer sind als die $k_{\text{cat}2}$ -Werte. Diese wiederum beschreiben den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes ESS in Produkt und Enzym-Substrat-Komplex ES. Die k_{cat} -Werte sind ein direktes Maß für die Geschwindigkeit der Umsetzung der im Enzym-Substrat-Komplex gebundenen Verbindung zum Produkt, weil es sich bei ihnen um Geschwindigkeitskonstanten handelt. Die Reduktion eines Substratmoleküls verläuft also wesentlich langsamer, wenn zusätzlich ein zweites Substratmolekül im aktiven Zentrum gebunden ist.

Bei den 2,3-Diketonen, die die höchsten k_{cat} -Werte aller getesteten Substanzen aufweisen, steigt der k_{cat} -Wert mit steigender Kettenlänge des Alkylrestes an, während sich ihre $k_{\text{cat}2}$ -Werte alle in einem Bereich von 2 s^{-1} – 10 s^{-1} bewegen. Für die Ketoester wurden k_{cat} -Werte ermittelt, die wesentlich niedriger sind als die der 2,3-Diketone. Die k_{cat} -Werte der getesteten 1,4-Diketone liegen zwischen 1 s^{-1} und 10 s^{-1} , wobei Acetylaceton einen enorm niedrigen Wert (0.08 s^{-1}) aufweist. Die k_{cat} -Werte von 2,5-Octandion und 1-Phenyl-1,4-pentandion bilden eine Ausnahme, da sie um den Faktor 5 kleiner sind als ihre $k_{\text{cat}2}$ -Werte.

Die hier ermittelten k_{cat} -Werte können mit denen verglichen werden, die durch den hyperbolischen Fit der Sättigungskurven der Substrate, die der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten, bestimmt wurden. Da die k_{cat} -Werte der 2,3-Diketone um zwei Zehnerpotenzen größer sind als die der 3,4-Diketone und sogar um drei Zehnerpotenzen über denen der 4,5-Diketone liegen, liegt der Schluss nahe, dass die Umsetzung der Substrate sehr viel schneller erfolgt, wenn sich die Carbonylgruppen in 2,3-Stellung befinden. Auch die verzweigten 1,2-Diketone, die umgesetzten 1,3-Diketone, Acetessigester und Glutaraldehyd werden wesentlich langsamer umgesetzt als die 2,3-Diketone. Die Hydroxyketone und Diketone mit aromatischem

Rest zeigen k_{cat} -Werte, die nur um eine Zehnerpotenz unter denen der 2,3-Diketone liegen, und gehören somit noch zu den relativ schnell umgesetzten Substraten.

Tabelle 37: Vergleich der k_{cat} -Werte verschiedener Substrate der GatDH.

Substrat	k_{cat} [s^{-1}]	Substrat	k_{cat} [s^{-1}]
	60.7 ± 1900		2.2 ± 0.02
2,3-Heptandion		1-Phenylpropan-1,2-dion	
	90		0.090 ± 0.003
2,3-Octandion		2-Methyl-4,5-Hexandion	
	0.42 ± 0.03		2.19 ± 0.04
3,4-Heptandion		Acetoin	
	0.05 ± 0.003		0.35 ± 0.01
4,5-Nonandion		Acetessigester	
	0.35 ± 0.01		0.47 ± 0.02
Acetylaceton		Glutaraldehyd	

Ethylbromopyruvat (k_{cat} : 1.64 s^{-1}) zeigt einen genauso schnellen Umsatz wie Ethylpyruvat (k_{cat} : 1.80 s^{-1}). Der Bromsubstituent scheint die Umsetzungsgeschwindigkeit also nicht zu beeinflussen.

Die mittels Dynafit ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_{D1} und k_{S1} , welche die Geschwindigkeit von Bildung und Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes wiedergeben, sind nach Gleichung 13 zu der Gleichgewichtskonstanten K_{ES} zusammengefasst. Diese Gleichgewichtskonstante stellt eine Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes ES dar und ist ein direktes Maß für die Bindungsstärke. Ebenso verhält es sich mit den Geschwindigkeitskonstanten k_{D2} und k_{S2} , die zur Gleichgewichtskonstanten K_{ESS} zusammengefasst sind und die Bindungsstärke des Enzym-Substrat-Komplexes ESS wiedergeben. Je kleiner die Dissoziationskonstante, desto stärker die Bindung des jeweiligen Enzym-Substrat-Komplexes.

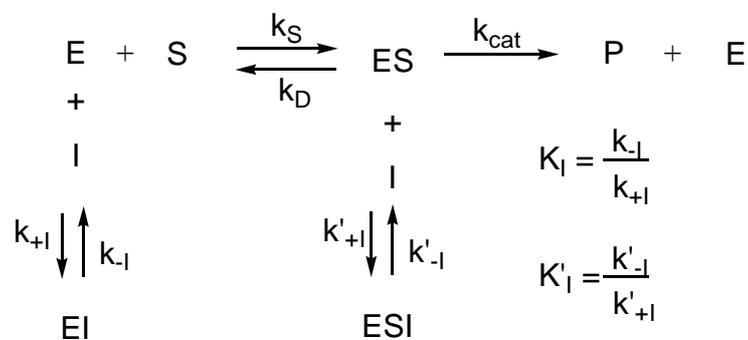
$$K_{ES} = \frac{k_{D1}}{k_{S1}} \quad \text{Gl. (13)}$$

$$K_{ESS} = \frac{k_{D2}}{k_{S2}} \quad \text{Gl. (14)}$$

Bei den 2,3-Diketonen ist außer im Falle des 2,3-Heptandions K_{ES} stets kleiner als K_{ESS} . Die Bindung von Substrat im Enzymmonosubstratkomplex ist also stärker, für 2,3-Pentandion sogar sehr viel stärker (ca. um den Faktor 100) als die Bindung eines zweiten Substratmoleküls im Enzymdisubstratkomplex. Die Ketoester zeigen eine stärkere Bindung des ESS-Komplexes, während für 1,4-Dibrom-2,3-butandion die Bindungsstärke beider Komplexe ungefähr gleich ist. In der Reihe der 2,3-Diketone liegen alle K_{ES} -Werte in einem Bereich zwischen 0.4 mM und 2.7 mM. Lediglich 2,3-Butandion zeigt einen ungewöhnlich hohen Wert (12.99 mM) und 2,3-Pentandion einen enorm niedrigen Wert (0.046 mM). Die Bindungsstärke aller anderen getesteten Substanzen liegt für den Enzymmonosubstratkomplex im Bereich der 2,3-Diketone. Eine Ausnahme

bildet 2,5-Heptandion mit einer sehr geringen Bindungsstärke von 166.6 mM. Dafür ist allerdings der K_{ESS} -Wert dieses 1,4-Diketons mit Abstand am niedrigsten. Alle anderen K_{ESS} -Werte liegen in einem Bereich zwischen 0.3 mM und 9 mM, wobei 2,3-Butandion, 2,3-Pentandion und 2,5-Octandion im Vergleich zu den anderen Verbindungen sehr niedrige Bindungsstärken, d.h. große Dissoziationskonstanten, für den ESS-Komplex zeigen.

3.4 Inhibitoren der GatDH



Schema 27: Reaktionsschema der nichtkompetitiven Hemmung bei $K_I' = K_I$; Kompetitive Hemmung bei $K_I' = 0$; Unkompetitive Hemmung bei $K_I = 0$.

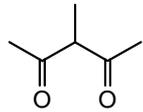
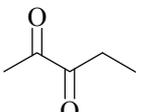
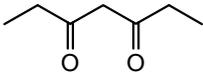
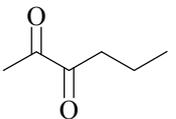
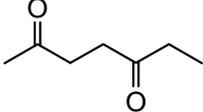
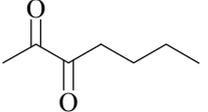
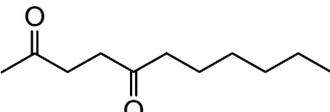
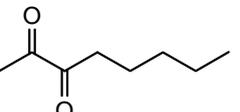
Für die Substrate, deren Sättigungskinetiken nicht der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten, wurde, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, mit Hilfe des Programmes *DynaFit* ein Mechanismus postuliert, der den Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit recht treffend beschreibt. Dieser Mechanismus ähnelt der unkompetitiven Hemmung (Schema 27), da auch hier der Enzym-Substrat-Komplex angegriffen wird, allerdings nicht von einem Inhibitor-Molekül, sondern von einem weiteren Substrat-Molekül. Die mittels *DynaFit* ermittelten K_{ESS} -Werte, die die Bindungsstärke des zweiten Substratmoleküls am ES-Komplex beschreiben, und auch die K_{ES} -Werte, die die Bindungskonstante des Enzym-Substrat-

Komplex darstellen, können mit den hier bestimmten K_I -Werten direkt verglichen werden. Alle drei Werte sind Dissoziationskonstanten und können Aufschluss über die Strukturen geben, die im aktiven Zentrum bevorzugt gebunden werden. Experimentell lässt sich dies durch den Vergleich des via Konkurrenzassay ermittelten K_I -Wertes von tert.-Butylacetoacetat (1.0 mM) mit dessen K_{ES} -Wert (1.26 mM) untermauern.

Als einziger Vertreter der 1,2-Diketone wurde das schwache Substrat 2-Methyl-4,5-octandion auf seine inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Für Substrate der GatDH kann von einem kompetitiven Hemmtyp ausgegangen werden. Das α -Diketon zeigt einen K_I -Wert von 1.0 (\pm 0.04) mM, der somit im Bereich der K_{ES} -Werte liegt, die für die 2,3-Diketone ermittelt werden konnten. Die Stärke der Bindung der 2,3-Diketone ist also unabhängig von der Struktur ungefähr gleich stark.

Die IC_{50} -Werte aller getesteten 1,3-Diketone lagen alle in einem recht engen Bereich zwischen 1.2 mM und 3.6 mM, was darauf schließen lässt, dass die Bindungsstärke durch kleinere Variationen der Alkylsubstituenten in α -Stellung zu einer der Carbonylgruppen unbeeinflusst bleibt. Bei allen 1,3-Diketonen handelte es sich um kompetitive Inhibitoren. Die gemessenen K_I -Werte lagen in einen Bereich von 0.6 mM–1.8 mM und damit ebenfalls im Bereich der K_{ES} -Werte liegt, die für die 2,3-Diketone ermittelt wurden. Die Bindung scheint für 1,2-Diketone und für 1,3-Diketone trotz der unterschiedlichen Bindungsart gleich stark zu sein.

Tabelle 38: Vergleich der K_I -Werte einiger 1,3- und 1,4-Diketone mit den K_{ES} -Werten der 2,3-Diketone.

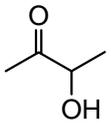
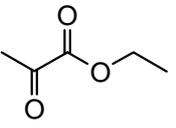
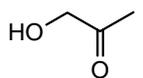
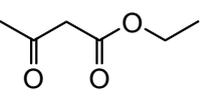
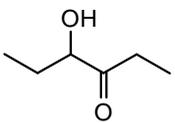
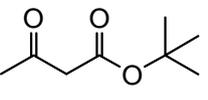
Inhibitor	K_I -Wert [mM]	2,3-Diketone	K_{ES} [mM]
 3-Methyl-2,4-pentandion	1.8 ± 0.1	 2,3-Pentandion	0.046
 3,5-Heptandion	1.0 ± 0.1	 2,3-Hexandion	1.59
 2,5-Heptandion	1.3 ± 0.2	 2,3-Heptandion	2.70
 2,5-Undecandion	1.7 ± 0.2	 2,3-Octandion	0.43

Alle getesteten 1,4-Diketone zeigen IC_{50} -Werte zwischen 0.5 mM und 5 mM. Eine Ausnahme bildet 1-Phenyl-1,4-pentandion mit seinem vergleichsweise niedrigen IC_{50} -Wert von 0.05 mM. Der Grund für diese sehr starke Bindung im aktiven Zentrum kann der in α -Stellung einer Carbonylgruppe befindliche Phenylrest sein. Dieser kann mit seinem mesomeren Effekt die Carbonylgruppe stärker polarisieren und dadurch die Voraussetzung für eine festere Wasserstoffbrückenbindung mit dem Serin- oder Tyrosinrest bilden. Die IC_{50} -Werte der 1,4-Diketone liegen in einem

ähnlichen Größenbereich, wie die der 1,3-Diketone. Die inhibitorische Wirkung der 1,4-Diketone ist also gleich stark.

Da fast alle α -Hydroxyketone Substrate der GatDH darstellen, kann ein kompetitiver Hemmtyp angenommen werden. Acetoin und Hydroxyaceton sind mit IC_{50} -Werten von ca. 40 mM bzw. 35 mM sehr schwache Inhibitoren im Vergleich zu den bisher untersuchten Verbindungen. Auch ihre hohen K_I -Werte zeigen, dass diese beiden Hydroxyketone wesentlich schwächer gebunden werden als die bisher untersuchten Diketone. 3-Hydroxy-4-hexanon (IC_{50} -Wert: 2.2 mM) hingegen wird deutlich besser gebunden.

Tabelle 39: Vergleich der K_I -Werte einiger Hydroxyketone und Ketoester.

Inhibitor	K_I -Wert [mM]	Inhibitor	K_I -Wert [mM]
	19.7 ± 1.6		0.1 ± 0.01
Acetoin		Ethylpyruvat	
	17.4 ± 2.4		5.3 ± 0.4
Hydroxyaceton		Acetessigester	
	1.1 ± 0.03		1.0 ± 0.06
3-Hydroxy-4-hexanon		tert-Butylacetoacetat	

Bei den Ketoestern liegen unterschiedliche Hemmtypen vor. Während die beiden β -Ketoester Acetessigester und tert.-Butylacetoacetat kompetitiv

inhibieren, zeigt der α -Ketoester Ethylpyruvat eine unkompetitive Inhibition der GatDH. Der Grund hierfür muss in der unterschiedlichen Bindung im aktiven Zentrum zu suchen sein. Die Bindung der α -Ketoester erfolgt wie bei den 1,2-Diketonen über Tyr 159 und über Ser 144 während die β -Ketoester unter Beteiligung der beiden Serinreste Ser 144 und Ser 146 gebunden werden.

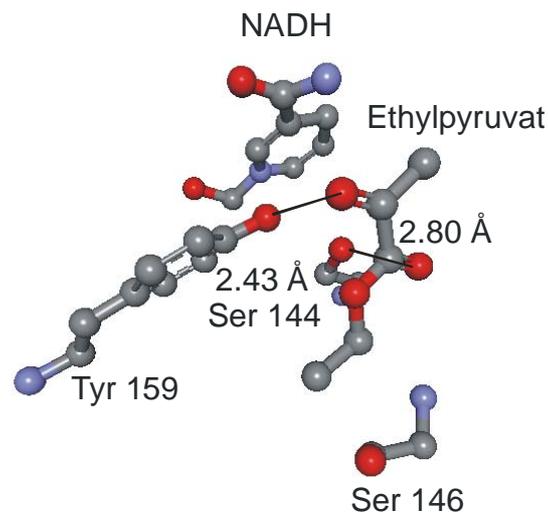


Abbildung 55: Bindung von Ethylpyruvat im aktiven Zentrum.

α -Ketoester, wie in unserem Fall das Ethylpyruvat, können als unkompetitive Inhibitoren also einen bestehenden Enzym-Substrat-Komplex (ES) angreifen und einen Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (EIS) bilden. Dies bestätigt den im vorherigen Kapitel postulierten Mechanismus der Umsetzung einiger 1,2-Diketone und α -Ketoester, bei dem zwei Substratmoleküle nebeneinander im aktiven Zentrum gebunden werden können. Die K_I -Werte der β -Ketoester liegen im Bereich der Werte der Diketone, während Ethylpyruvat einen um eine Zehnerpotenz niedrigeren K_I -Wert zeigt. Während die Bindung der β -Ketoester also ungefähr gleich stark ist wie die der meisten Diketone, werden α -Ketoester deutlich stärker gebunden.

Für Glutaraldehyd als schwaches Substrat mit einem k_{cat}/K_M von $0.05 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ konnte ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus angenommen werden. Der ermittelte K_I -Wert von 6.8 mM (IC_{50} -Wert: 13.6 mM) liegt deutlich über den K_I -Werten anderer Di-carbonylverbindungen. Der 1,5-Dialdehyd wird also deutlich schwächer gebunden, als die meisten anderen getesteten Verbindungen, was vermutlich mit der ungünstigen 1,5-Stellung der Carbonylgruppen zusammenhängt. Eine Bindung im aktiven Zentrum mit nur einer der beiden Aldehydgruppen erscheint sehr unwahrscheinlich, da in Abschnitt 2.2 gezeigt wurde, dass Aldehyde und Ketone nicht von der GatDH gebunden werden konnten. Eine Bindung im aktiven Zentrum ist also nur unter Beteiligung beider Aldehydfunktionen möglich.

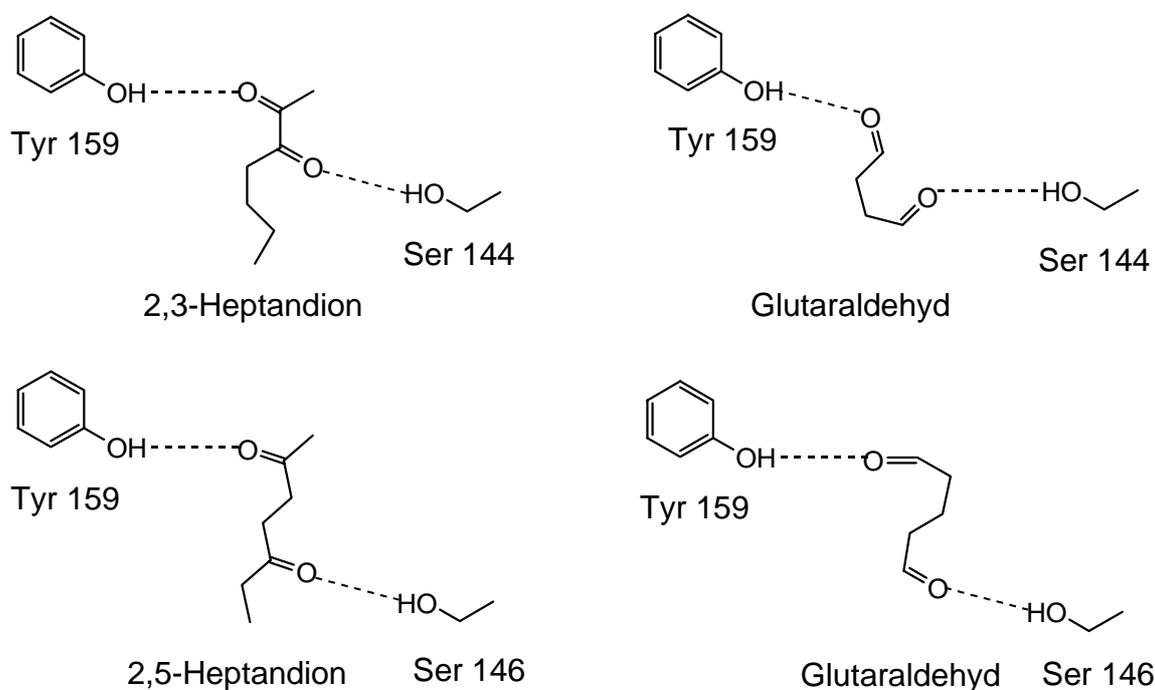


Abbildung 56: Mögliche Bindungsarten von Glutaraldehyd im aktiven Zentrum der GatDH.

Sowohl die Bindung über Tyr 159 und Ser 144, wie bei den 1,2-Deketonen, als auch die Bindung des Glutaraldehyds über Tyr 159 und Ser 146, wie bei den 1,4-Diketonen, erfordert, wie in Abb.56 dargestellt, eine

starke Faltung der Kohlenstoffkette. Dies könnte ein Grund für die relativ schwache Bindung des Glutaraldehyds sein.

Der für Benzoylacetoneitril ermittelte K_I -Wert ebenso wie der IC_{50} -Wert liegt im Bereich der anderen getesteten Substanzen. Die Bindung einer Cyanogruppe im aktiven Zentrum scheint also ebenso fest zu erfolgen wie die einer Carbonylgruppe.

3.5 Die Coenzympezifität

Die Galactitol-Dehydrogenase (GatDH) kann, wie bereits erwähnt, aufgrund ihrer charakteristischen Sequenz TyrXXXLys im aktiven Zentrum und dem am aktiven Zentrum befindlichen Serinrest 144 den short-chain-Dehydrogenasen (SDR) zugeordnet werden.

Genau wie alle anderen Mitglieder dieser Enzymfamilie ist die GatDH ein NADH- oder NADPH-abhängiges Enzym^[35]. Abb. 57 zeigt das in der Rossmann-fold gebundene NADH, dessen Nikotionamidring am aktiven Zentrum platziert ist, wo die Bindung mit Hilfe des Lysinrestes 163 durch Wasserstoffbrückenbindung mit den beiden Hydroxylgruppen des ersten Riboserestes des NADH erfolgt.

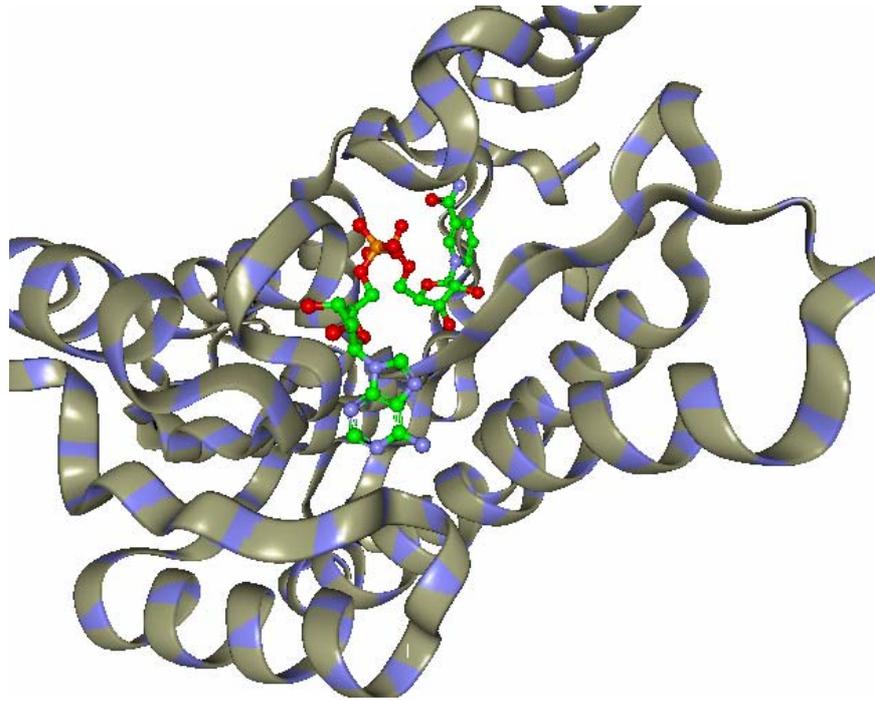


Abbildung 57: NADH in der Rossmann-fold einer GatDH-Untereinheit.

Die Bindung des Coenzym erfolgt auch im N-terminalen Teil des Enzyms, wo die für die Rossmann-fold^[32] charakteristische GlyXXXGlyXGly-Sequenz vorliegt (X kann jede beliebige Aminosäure sein). Mit Hilfe der von Scheidig et al. erstellten Röntgenkristallstruktur der GatDH kann man erkennen, dass die Bindung des zweiten NADH-Riboserestes, wie in Abb. 58 dargestellt, durch Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxylgruppen mit dem Asparaginsäurerest 42 erfolgt (Abstände 2.60 Å bzw. 2.72 Å).

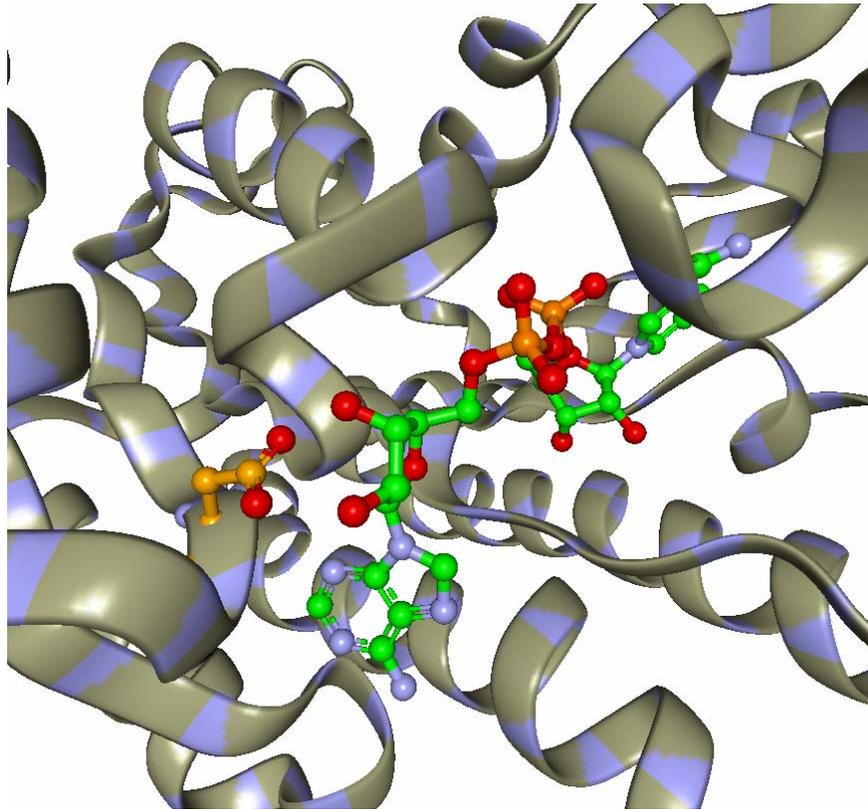


Abbildung 58: Bindung von NADH durch Asp 42.

Die Bestimmung der K_M -Werte für NADH und NADPH sollte nun zeigen, welches der beiden Coenzyme besser von der GatDH gebunden wird.

Es zeigte sich, dass der K_M -Wert von NADH so klein ist, dass er mit Hilfe einer normalen Sättigungskinetik und photometrischer Bestimmung nicht erfasst werden kann, d.h. er liegt im nanomolaren Bereich. Der K_M -Wert von NADPH wurde zu $0.68 (\pm 0.1)$ mM bestimmt. Die GatDH bevorzugt also NADH gegenüber NADPH. Der Grund hierfür ist in der Struktur des N-Terminus zu suchen. Hier erfolgt die Bindung des Cofaktors wie bereits erwähnt durch den negativ geladenen Asparaginsäurerest 42. Zusätzlich befindet sich der ebenfalls negativ geladene Glutaminsäurerest 44 in der Nähe der Bindungsregion des Coenzym. Die Bindung des NADPH, welches sich vom NADH durch einen zusätzlichen Phosphatrest am Ribosering unterscheidet, ist durch elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen

diesem Phosphatrest und den beiden Carboxylatresten von Asp 42 und Glu 44 erschwert.

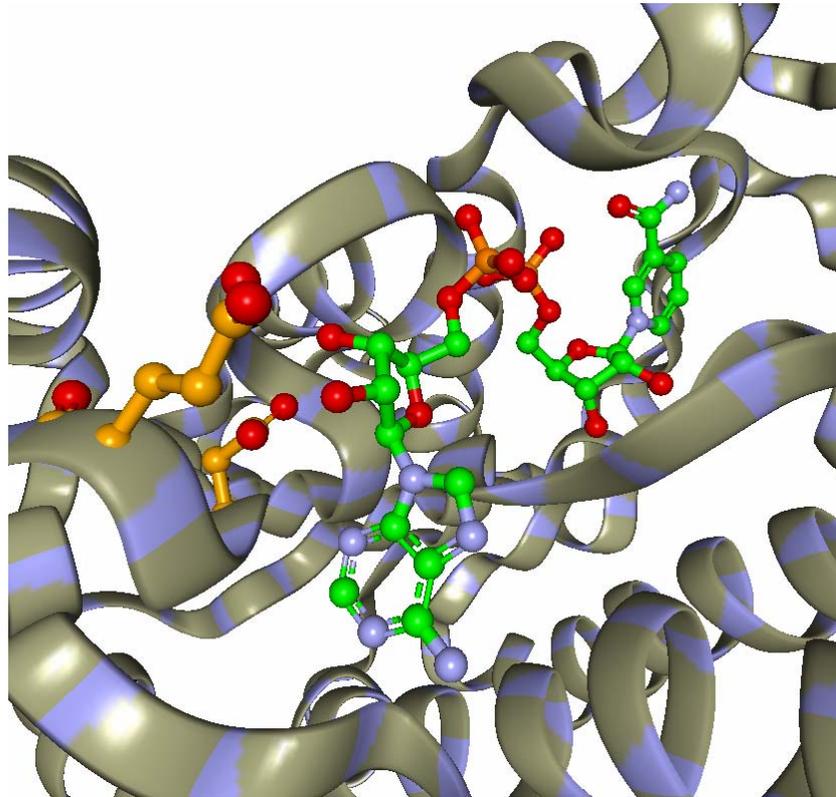


Abbildung 59: Asp 42 und Glu 44 in der Nähe der Riboseeinheit des NADH.

3.6 Zwischenproduktakkumulierung

Die Verfolgung des Reaktionsverlaufs der quantitativen enzymatischen Reduktionen mittels HPLC sollte Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Zeit die beiden Substrate komplett reduziert werden. Für die Umsetzung eines Diketons kann zudem geklärt werden, ob sich im Verlauf der Reaktion ein Zwischenprodukt anreichert.

Hierzu wurde stellvertretend für die beiden gängigsten Substratspezies der GatDH die Umsetzung von 2,3-Butandion für die 1,2-Diketone und die Umsetzung von Acetoin für die α -Hydroxyketone untersucht. Die Reduktion

des Acetoins erfolgte wie schon durch ^1H - und ^{13}C -NMR bestätigt vollständig bis zu 2,3-Butandiol.

Auch 2,3-Butandion wurde vollständig zum Diol reduziert, wobei allerdings zunächst ein starker Anstieg der Acetoinkonzentration beobachtet werden konnte. Nach Durchlaufen eines Maximums bei einer Reaktionsdauer von 3 h nahm die Acetoin-Konzentration ab und die Zunahme an 2,3-Butandiols wurde beobachtet.

Die Akkumulierung des Zwischenproduktes Acetoin ist ein Beweis für die Zweistufigkeit der enzymatischen Umsetzung von 1,2-Diketonen. Das Auftreten eines Zwischenproduktes wurde bereits mit Hilfe der Gaschromatographie bei der Umsetzung des 1,3-Diketons 2,4-Pentandion beobachtet. Im ersten Reaktionsschritt wird das Diketon zunächst nur an einer Carbonylgruppe reduziert. Das gebildete Hydroxyketon wird abgespalten, verlässt das aktive Zentrum und liegt nun ebenso wie das Diketon als Substrat vor. Wie in Abschnitt 2.4 bereits gezeigt wurde, stellen die Hydroxyketone allerdings schlechtere Substrate dar als die meisten 1,2-Diketone. In diesem Fall ist Acetoin mit einem k_{cat} -Wert von 2.19 s^{-1} ein sehr viel schlechteres Substrat als 2,3-Butandion mit einem k_{cat} -Wert von 24.0 s^{-1} . Seine Umsetzung verläuft daher merklich langsamer, was zur beobachteten Akkumulation des Acetoins führt.

3.7 Die Stereospezifität der GatDH

Durch Gaschromatographie an einer chiralen Säule wurde die Enantiomerenreinheit der enzymatisch synthetisierten 1,2-Diole überprüft.

Um die mechanistischen Gründe der Stereoselektivität der GatDH verstehen zu können, bietet es sich an, zunächst die Umsetzung von Substraten näher zu betrachten, bei denen die Reduktion nur an einem Reaktionszentrum erfolgt.

Die Umsetzung von Methylpyruvat führte ausschließlich zu (R)-Methylactat. Diese (R)-Selektivität lässt sich dadurch begründen, dass das Methylpyruvat, ausschließlich so gebunden wird, dass der Hydridtransfer in der Weise stattfinden kann, wie in Abb. 60 dargestellt ist.

Das aktive Zentrum wird hierbei in zwei Regionen unterteilt, die fortan als „große“ und „kleine Tasche“ bezeichnet werden. Alle unsymmetrischen Substrate können auf zwei Arten gebunden werden. In der energetisch günstigsten Konformation werden die Substrate so gebunden, dass sich der große Rest in der „großen Tasche“ und der kleine Rest in der „kleinen Tasche“ befindet. Bereits bei der Betrachtung der Substratspezifität konnte beobachtet werden, dass der sterische Anspruch der Substratstruktur nicht beliebig in beide Richtungen der Carbonylgruppen erhöht werden kann, ohne einen Verlust an katalytischer Effizienz des Enzyms gegenüber dem entsprechenden Substrat zu bewirken. Der Grund hierfür ist in der Struktur des aktiven Zentrums zu suchen, in welcher in dem Bereich, der als „kleine Tasche“ bezeichnet wird, nur relativ kleine Alkylreste platziert werden können, ohne eine sterische Hinderung durch die Aminosäurekette zu erfahren.

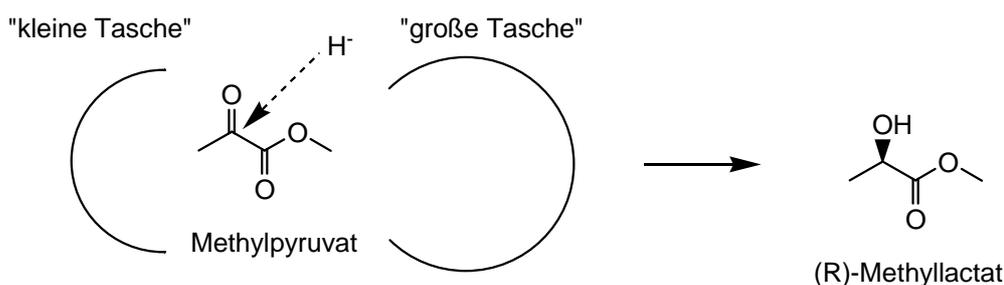


Abbildung 60: (R)-selektive Umsetzung von Methylpyruvat.

Auch im Falle des Methylpyruvats ist das Substrat in der energetisch günstigsten Konformation im aktiven Zentrum gebunden. In dieser befindet sich die sterisch weniger anspruchsvolle Methylgruppe, die sich in α -

Position zu der Carbonylgruppe befindet, die reduziert wird, in dem Bereich des aktiven Zentrums, der als „kleine Tasche“ bezeichnet werden kann.

1-Hydroxy-2-propanon hingegen wird enantioselektiv zu (S)-1,2-Propandiol reduziert. Hierbei dirigiert vermutlich durch die primäre OH-Gruppe das Substrat in die energetisch günstigste Konformation im aktiven Zentrum.

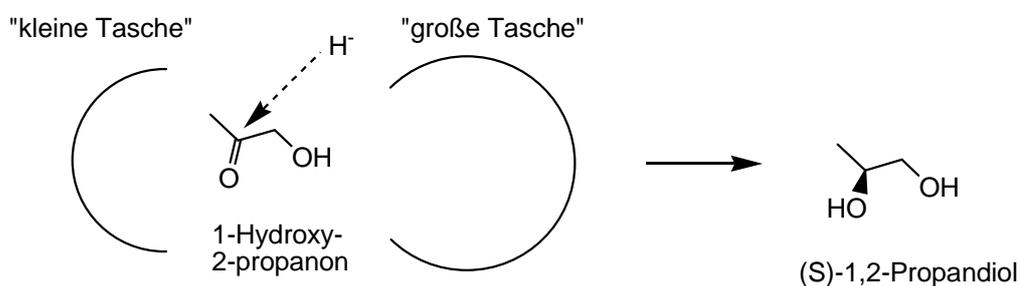


Abbildung 61: Umsetzung von 1-Hydroxy-2-propanon.

Als Vertreter der 2,3-Diketone wurden die Enantiomerenreinheit der Produkte der enzymatischen Reduktionen von 2,3-Butandion, 2,3-Heptandion und 1-Phenyl-1,2-propandion zu den entsprechenden Diolen überprüft. Im Falle von 2,3-Heptandion und 1-Phenyl-1,2-propandion wurde nur ein Enantiomer, nämlich das (R,S)-Diol, gebildet. Die Reduktion von 2,3-Butandion führte allerdings zu einem Enantiomergemisch, in dem die meso-Form mit einem prozentualen Anteil von 79 % vorliegt. Das (R,R)-Enantiomer mit 3 % und das (S,S)-Enantiomer mit 18 % sind lediglich Nebenprodukte. Die geringe Stereoselektivität der Umsetzung des Butandions kann dadurch erklärt werden, dass dieses sehr kleine und zudem symmetrische Substrat ein hohes Maß an Bewegungsfreiraum im aktiven Zentrum genießt, während 2,3-Heptandion und 1-Phenyl-1,2-propandion mit ihren sterisch anspruchsvolleren Resten nur eine mögliche Orientierung an der Bindungsstelle einnehmen können. Durch diese wird

die (R,S)-Selektivität bei der Reduktion unsymmetrischer 1,2-Diketone erzwungen.

Im Falle der Diketone, die vollständig zu den entsprechenden Diolen reduziert werden, müssen zwei Teilreaktionen, nämlich die Reduktion des Diketons zu Hydroxyketon und dessen Reduktion zum Diol, betrachtet werden.

Für die im ersten Reaktionsschritt erfolgende Reduktion des Diketons (hier: 2,3-Heptandion) zum Hydroxyketon wird angenommen, dass die Bindung eines asymmetrischen 2,3-Diketons in der energetisch günstigsten Konformation erfolgt, genauso wie bei Methylpyruvat. Auch hier befindet sich die sterisch weniger anspruchsvolle Methylgruppe in der „kleinen Tasche“ des aktiven Zentrums. Der erste Hydridtransfer sollte also in 2-Position erfolgen (Abb.62), was dessen (R)-Selektivität erklären würde.

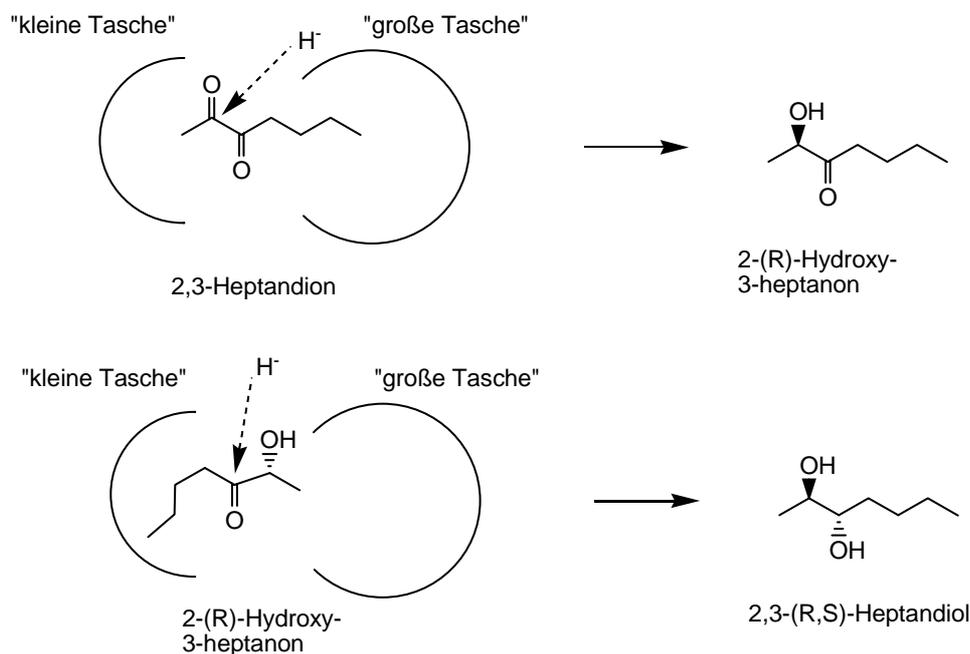


Abbildung 62: (R)-selektive Umsetzung von 2,3-Heptandion zu 2-(R)-Hydroxy-3-heptanon und dessen (S)-selektive Reduktion zu 2,3-(R,S)-Heptandiol.

Die (S)-Selektivität des zweiten Reduktionsschrittes, also der Reduktion des gebildeten 2-(R)-Hydroxy-3-heptanons zu 2,3-(R,S)-Heptandiol, lässt sich nur dadurch erklären, dass das Hydroxyketon, wie in Abb.62 dargestellt, in der Weise gebunden wird, dass sich der sterisch anspruchsvollere Butylrest in der „kleinen Tasche“ des aktiven Zentrums befindet. Hierbei wird die (R)-konfigurierte Hydroxygruppe des intermediär gebildeten Hydroxyketons im Enzym so gebunden, dass eine Dirigierung der zu reduzierenden Carbonylgruppe in eine Position erfolgt, in der die Hydridübertragung vom Coenzym (S)-selektiv erfolgt.

Die Umsetzung von 2,4-Pentandion führte ausschließlich zu (S,S)-2,4-Pentandiol. Für die 1,3-Diketone liegt also eine andere Stereospezifität vor als für die 1,2-Diketone, was wiederum mit der unterschiedlichen Bindungsart der beiden Spezies im aktiven Zentrum erklärt werden kann. Außerdem zeigt sich hier ein mit hohem Anteil gebildetes Nebenprodukt, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um das als Zwischenprodukt gebildete Hydroxyketon handelt. Trotz der recht langen Reaktionszeit von 3 d wurde nur ein geringer Teil des eingesetzten 1,3-Diketons vollständig zum Diol reduziert. Die Umsetzung stoppte überwiegend auf der Stufe des Hydroxyketons. Dieser Befund unterstreicht, dass die 1,3-Diketone, wie schon in einem vorherigen Abschnitt festgestellt, sehr schlechte Substrate sind.

Stellvertretend für die 1,4-Diketone wurde das Umsetzungsprodukt von 2,5-Hexandion auf seine Diastereomerenzusammensetzung untersucht. Hierbei wurde ausschließlich das (R,R)-Enantiomer festgestellt. Die im Vergleich zu 1,2- und 1,3-Diketonen unterschiedliche Bindungsart der 1,4-Diketone im aktiven Zentrum bedingt wohl auch in diesem Fall den Unterschied in der Stereoselektivität. Der erste Reaktionsschritt, der zur Bildung des 2-(R)-Hydroxy-5-hexanons führt, erfolgt hier in der gleichen Weise, wie bei der Reduktion der 2,3-Diketone. Im Falle des 2,5-Hexandions handelt es sich um eine symmetrische Verbindung, daher spielt die Größe der Reste hier nur eine untergeordnete Rolle.

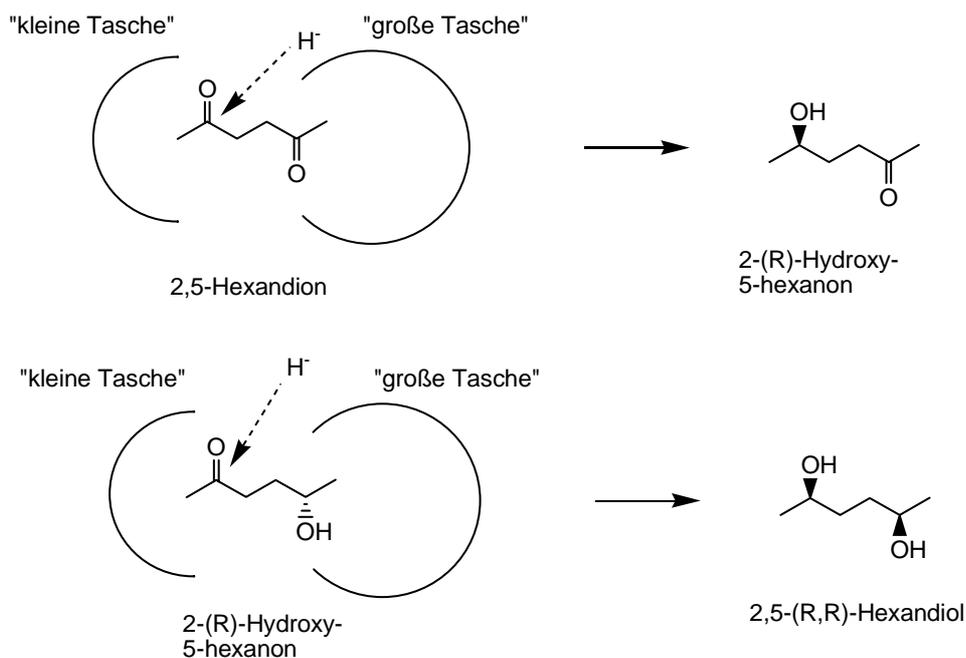


Abbildung 63: (R)-selektive Umsetzung von 2,5-Hexandion zu 2-(R)-Hydroxy-5-hexanon und dessen (R)-selektive Reduktion zu 2,5-(R,R)-Hexandiol.

Zur (R)-selektiven Reduktion des Hydroxyketons muss das Substrat wie in Abb. 63 dargestellt im aktiven Zentrum gebunden sein. Durch die Bindung der (R)-konfigurierten Hydroxygruppe des intermediär gebildeten Hydroxyketons wird die zu reduzierende Carbonylgruppe in eine Position dirigiert, in der die Hydridübertragung vom Coenzym (R)-selektiv erfolgt.

3.8 Zusammenfassung und Ausblick

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse war es möglich, einen sehr detaillierten Einblick in den katalytischen Mechanismus und in die Bindungsverhältnisse von Substraten im aktiven Zentrum der GatDH zu erhalten. Anhand von Docking-Untersuchungen konnte die experimentell bestimmte Substratspezifität erklärt werden. Außerdem

konnte die Stereospezifität des Enzyms für die verschiedenen Substratklassen ermittelt werden.

Zusammenfassend ergeben sich aus der Interpretation der in dieser Arbeit ermittelten Daten folgende Schlussfolgerungen:

1. Aufgrund charakteristischer Abschnitte der Aminosäuresequenz kann die GatDH eindeutig der Familie der short-chain-Dehydrogenasen zugeordnet werden. Der bereits für andere Vertreter der SDR-Familie postulierte katalytische Mechanismus der Reduktion von Dicarbonylverbindungen kann, wegen der für diese Enzymklasse typischen Aminosäurereste im aktiven Zentrum, in leicht abgewandelter Form auch auf die GatDH angewendet werden.
2. Das Substratspektrum der GatDH wurde systematisch erweitert. Es erstreckt sich von 1,2-Diketonen und Hydroxyketonen über 1,3-1,4-Diketone sowie α - und β -Ketoester. Verbindungen mit nur einer Carbonylgruppe, wie Aldehyde und Ketone, wurden von der GatDH genau wie fast alle Pentosen und Hexosen nicht umgesetzt. Die 1,2-Diketone stellen die bevorzugten Substrate des Enzyms dar. Besonders aliphatische 2,3-Diketone werden von der GatDH äußerst effektiv reduziert, während die Umsetzung von 3,4- und 4,5-Diketonen sowie solchen mit Kettenverzweigungen deutlich langsamer abläuft. Die als Zwischenprodukt gebildeten Hydroxyketone wurden um ein vielfaches langsamer umgesetzt. Sind die beiden Carbonylgruppen nicht direkt benachbart, verringert sich die katalytische Effizienz drastisch. 1,3- und 1,4-Diketone stellten sich zwar als sehr schwache Substrate, aber als recht effektive Inhibitoren der GatDH heraus. Dies spricht für eine starke Bindung in einer nicht produktiven Konformation. Während die 1,3-Diketone kompetitive Inhibitoren darstellten, war bei den 1,4-Diketonen darüber hinaus ein nichtkompetitiver Anteil

festzustellen. Die unterschiedlichen Eigenschaften der α -, β - und γ -Diketone resultieren aus Unterschieden ihrer Bindungen im aktiven Zentrum. Hierbei wurde festgestellt, dass die Bindungsstärke, d.h. die Dissoziationskonstanten der entsprechenden Enzym-Substrat-Komplexe, für die meisten Substrate in einem ähnlichen Größenbereich liegen. Zwar werden alle drei Substratfamilien über Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum gebunden, jedoch mittels unterschiedlicher Ankergruppen des Enzyms, wie Docking-Untersuchungen ergaben. Hierdurch lässt sich auch die für jede Substanzklasse eigene Stereospezifität erklären. Aus den kinetischen Daten ist allerdings ersichtlich, dass die Bindung der 1,2-, 1,3- und 1,4-Diketone im aktiven Zentrum trotz der unterschiedlichen Bindungsarten gleich stark erfolgt.

3. Für einige Substrate konnte der Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten nicht mit Hilfe einer herkömmlichen Michaelis-Menten-Kinetik erklärt werden. Für diese Fälle konnte ein Mechanismus postuliert werden, der besagt, dass mit steigender Konzentration an Substrat eine „quasi-Substrathemmung“ eintritt. Hierbei handelt es sich um einen Hemmtyp, der dem unkompetitiven Fall recht ähnlich ist. Im aktiven Zentrum werden zwei Substratmoleküle gebunden, was dem Umsatz von Substrat zu Produkt mit steigender Substratkonzentration langsamer werden lässt. Gestützt wird das Postulat durch die Tatsache, dass dieser kinetische Verlauf ausschließlich bei 2,3-Diketonen, 2,5-Diketonen und α -Ketoestern auftritt. Hierbei handelt es sich um Verbindungen, bei denen aufgrund ihres sterischen Anspruchs die Bindung zweier Moleküle an den Ankerplätzen im aktiven Zentrum denkbar ist. Die Ankerstellen im aktiven Zentrum liegen recht nahe zusammen,

daher können nur solche Substrate doppelt gebunden werden, die in einer Richtung keinen hohen sterischen Anspruch besitzen.

4. Die Galaktitdehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D zeigte für verschiedene Substratklassen unterschiedliche Stereospezifitäten, welche mittels Gaschromatographie an einer chiralen Festphase untersucht wurden. Während die 1,2-Diketone überwiegend zu dem entsprechenden (R,S)-Diol umgesetzt wurden, zeigten die 1,3-Diketone (S,S)- und die 1,4-Diketone (R,R)-Spezifität bei ihren Umsetzungen. α -Ketoester wurden hingegen (R)-spezifisch reduziert. Die gravierenden Unterschiede in der Stereospezifität können durch die Bindung der jeweiligen Substanzklassen im aktiven Zentrum und durch die sterische Orientierung der Alkylgruppen erklärt werden.
5. Die enzymkatalysierte Reduktion von 1,2-Diketonen zu 1,2-Diolen verläuft nicht in einem Reaktionsschritt, sondern über die Bildung eines Zwischenproduktes. Bei diesem handelt es sich um ein Hydroxyketon. Hierdurch ist bewiesen, dass die Umsetzung, hier die Reduktion einer Carbonylgruppe, zunächst nur an einer funktionellen Gruppe stattfindet.
6. Präparative Ansätze zur Reduktion eines Hydroxyketons und eines 1,2-Diketons, die mit Hilfe eines Cosubstratregenerierungssystems durchgeführt wurden, zeigten nach 20 h einen vollständigen Umsatz.
7. Als Cofaktor bevorzugt die GatDH NADH vor NADPH. Diese Coenzympezifität konnte durch die Struktur der N-terminalen Bindungsregion erklärt werden.

Anhand der hier gewonnenen Erkenntnisse über die Galaktitdehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D könnte der Einfluss von gezielten Variationen der Proteinstruktur auf die Substrat- und Stereospezifität des Enzyms untersucht werden. Außerdem sind

Modifizierungen der Enzymstruktur zur Immobilisierung an Oberflächen denkbar, welche bereits Bestandteil aktueller Arbeiten sind.

Die Möglichkeiten der Anwendung der GatDH als Biokatalysator bei der Synthese chiraler Diole sind sehr begrenzt, da ausschließlich die Umsetzung aliphatischer 2,3-Diketone ausreichend schnell erfolgt. Gerade gegenüber diesen Substraten aber zeigt die GatDH eine Substratinhibition, welche die Umsetzung in einem großtechnischen Maßstab äußerst schwierig gestalten würde. Alle anderen Substrate der GatDH werden zu langsam umgesetzt, um quantitative Umsetzungen in einem wirtschaftlichen Maßstab zu rechtfertigen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Arbeitsmaterialien

Das in dieser Arbeit verwendete Enzym Galaktitoldehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter sphaeroides* D^[5] wurde von der Arbeitsgruppe GIFFHORN aus *E. coli* BL21 (DE3) Gold überexprimiert.

Der Verlauf der Substratumsetzungen sowie die Reinheit der Produkte wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelfolie (Kieselgel auf TLC PET-Folie der Firma Fluka) kontrolliert.

Für die Säulenchromatographie wurde als stationäre Phase Kieselgel (Korngröße 0.035-0.070 mm) der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet.

Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und ABCR (Karlsruhe) erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach gängigen Labormethoden gereinigt und getrocknet. Lösungsmittel für spektroskopische Untersuchungen wurden in spektroskopischer Reinheit erworben. Pufferlösungen wurden mit frisch entionisiertem Wasser (MilliQ-Qualität) angesetzt, welches über eine Simplicity Anlage der Firma Millipore Corp. Erhalten wurde.

Zur Herstellung des Puffers für die kinetischen Untersuchungen dienten Kalium-dihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat und Magnesiumchlorid der Qualität „p.a.“.

NADH (Dinatriumsalz) und NAD⁺ wurden von der Firma Gerbu (Geiberg) bezogen.

Die NAD-spezifische FDH wurde von der Firma Jülich Chiral Solutions (Jülich) bezogen.

(S,S)-2,5-Hexandiol und (S)-Methylactat wurden von der Firma ABCR (Karlsruhe), (S,S)-2,4-Pentandiol, meso-, (R,R)- und (S,S)-2,3-Butandiol wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

4.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

4.2.1 Isolierung der GatDH

Die *E. coli*-Zellen, die die native Variante der GatDH exprimieren, wurden in einem 10 l – Fermenter kultiviert und nach 18-stündigem Wachstum durch Zentrifugation bei 6000 rpm, 4°C für 30 min geerntet. Anschließend erfolgte ein Waschschriff, in dem das Pellet in 100 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert wurde (6000 rpm, 4°C, 15 min). In einem zweiten Waschschriff wurde das Pellet in 80 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (6000 rpm, 4°C, 15 min). Vor dem Aufschluss wurden die Zellen in 5 ml Waschpuffer pro Gramm Pellet resuspendiert und mit 20 µl DNase versetzt. Das Zellpellet wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen (20 microns, 3 * 1 min), wobei zwischen den Ultraschallintervallen eine Regenerations- und Abkühlphase von jeweils 2 min lag. Um die Zelltrümmer abzutrennen, wurde die Probe bei 14000 rpm, bei 4°C für 1.5 h abzentrifugiert

Zur Entfernung von Fremdproteinen wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, wobei Ammoniumsulfat langsam und unter Rühren bis zu einer Sättigung von 30 % zugegeben wurde. Die Fällung erfolgte über

Nacht auf Eis. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4°C, 1.5 h) werden die gefällten Proteine abgetrennt.

Zur weiteren Anreicherung wurde eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Phenyl-Sepharose CL-4B durchgeführt, welche auf dem Prinzip hydrophober Wechselwirkungen in Kombination mit dem Aussalzeffekt von Proteinen beruht. Durch ein stark hydratisierendes Salz wird dem Protein die Hydrathülle entzogen. Hierdurch verringert sich die Löslichkeit und das Protein bindet durch van-der-Wals-Kräfte an ebenfalls apolare (hydrophobe) Gruppen an der Gelmatrix. Die verschiedenen Proteinfractionen werden durch einen absteigenden Salzgradienten eluiert, wobei Proteine mit wenigen apolaren Gruppen als erste eluiert werden. Das Gelmaterial wurde in einem zu 30 % mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesättigtem 20 mM Bistris-HCl-Puffer, pH 6.5, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM DDT, aufgenommen, entgast und in die Chromatographiesäule (C 40/26, Fa. Pharmacia, Freiburg) gefüllt. Das Volumen der gepackten Säule betrug 48 ml. Nach Spülen mit 4-fachem Säulenvolumen des zu 30 % mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesättigtem 20 mM Bistris-HCl-Puffers (pH 6.5, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM DDT) und Äquilibrieren der HIC-Säule wurde die Probe aufgetragen. Die GatDH wurde mit einem linearen Gradienten von 30-0 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gesättigten 20 mM Bistris-HCl-Puffer, pH 6.5, 1 mM MgCl_2 über insgesamt 250 ml eluiert. Die Chromatographie lief mit einer Flussrate von 10 ml/min. Die Fraktionen wurden auf Aktivität getestet, anschließend wurden die Fraktionen mit der höchsten Aktivität gepoolt und auf 50 ml eingengt.

Als letzter Anreicherungsschritt wurde eine Gelfiltration an Sephacryl S-300 durchgeführt, bei der die Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Die Gelfiltration basiert auf einer unterschiedlichen Permeation der zu trennenden Moleküle in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Ab einer bestimmten Größe können die Proteine nicht mehr in

die Poren des Trenngels eindringen und erscheinen im Eluat zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen. Kleinere Moleküle dringen in die Poren der stationären Phase ein und erfahren dadurch eine Verzögerung in der Wanderungsgeschwindigkeit. Die kleinsten Moleküle haben die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden als letzte eluiert. Das Gelmaterial wurde mit Bistris-HCl-Puffers (pH 6.5, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM DDT) äquilibriert, entgast und in eine Chromatographiesäule (C 100/26, Fa. Pharmacia, Freiburg) gefüllt. Das Volumen der gepackten Säule betrug 500 ml. Die Säule wurde bis zur Aufreinigung in 20 % Methanol gelagert. Nach Äquilibrieren der Säule mit 20 mM Bistris-HCl-Puffer (pH 6.5, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM DDT) wurde die abzentrifugierte und filtrierte Probe mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min aufgetragen. Nach dem Lauf der Chromatographie wurden die aktiven Proteinfractionen gepoolt und eingeengt.

4.2.2 Ultraviolett- und Visible-Spektroskopie (UV/VIS)

Die UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit dem computergesteuerten Spektralphotometer Lambda9 von Perkin und Elmer (Überlingen) und der dazugehörigen Software UV winlab durchgeführt. Für die UV/VIS-spektroskopischen Messungen wurden Einwegküvetten der Firma Roth (1.5 ml, PS, halbmikro) mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1.5 ml verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *SigmaPlot* 9.0.

4.2.3 Bestimmung des K_M - und v_{\max} -Wertes

Zur Bestimmung der K_M - und v_{\max} -Werte wurden UV/VIS-spektroskopische Messungen wie unter 4.2.2 beschrieben durchgeführt, durch welche der Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Substratkonzentration ermittelt wurde. Hierbei konnten die Entstehung des Umsetzungsproduktes und der Verbrauch des Eduktes nicht direkt spektroskopisch beobachtet werden. Allerdings wird für jedes umgesetzte Substratmolekül mindestens ein Äquivalent des Coenzym NADH verbraucht, welches ein Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt. Daher kann der Reaktionsverlauf durch die Absorptionsänderung bei 340 nm, die der Konzentrationsänderung von NADH entspricht, verfolgt werden.

Die K_M - und v_{\max} -Werte wurden nun mit Hilfe von Steady-State-Kinetiken ermittelt, welche allerdings nur ein Näherungsverfahren darstellen. Hierbei wird die Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion während eines kurzen Zeitraumes als konstant angesehen. Man geht davon aus, dass die Konzentration aller Intermediate und des Substrates innerhalb des Beobachtungszeitraumes konstant bleibt und die Umsatzgeschwindigkeit (v) ausschließlich von den Totalkonzentrationen an Substrat ($[S]$) und Enzym ($[E_0]$) und der Sättigung des Enzyms mit dem Substrat abhängig ist. Mit steigender Substratkonzentration erhält man eine Sättigungskinetik, bei der ein oberer Grenzwert der Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) erreicht wird. Dieses Verhalten wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben, die eine hyperbolische Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration liefert:

$$v = \frac{[E_0] \cdot [S] \cdot k_{\text{cat}}}{(K_M + [S])} \quad (\text{Gl. 1})$$

Wobei:
$$v_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E_0] \quad (\text{Gl. 2})$$

v_{\max} entspricht der maximalen Umsatzrate, während der K_M -Wert die Substratkonzentration angibt, bei der eine halbmaximalen Umsatzrate erreicht wird.

Zur Bestimmung dieser Werte wurden Aktivitätsmessungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt, wobei alle anderen Parameter (pH-Wert, Temperatur, Enzymkonzentration und Pufferkonzentration) konstant gehalten wurden um die Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten. Als Messgröße diente die Absorptionsänderung bei 340 nm, die der Konzentrationsänderung von NADH entspricht. Alle Messungen wurden bei 25°C, in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, 1mM MgCl₂, pH 6.5) mit einer NADH-Anfangskonzentration von 0.25 mM in 1.5 ml Einwegküvetten durchgeführt. Puffer, Substrat und Coenzym waren in den Küvetten vorgemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet, wobei jede Messung 2-3 mal wiederholt wurde. Zur Berechnung der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeit diente die Anfangssteigung des aufgezeichneten Kurvenverlaufs. Die Auftragung dieser Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration ergab in den meisten Fällen einen hyperbolischen Kurvenverlauf, aus dem K_M - und k_{cat} -Wert durch nicht-lineare Regression bestimmt werden konnten. Aufgrund schlechter Wasserlöslichkeit konnten für einige Substanzen die Messungen nicht bis in den Sättigungsbereich der Reaktionsgeschwindigkeit durchgeführt werden. Für $[S] \ll K_M$ ergibt sich eine lineare Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration. Für die Substanzen, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit nur im linearen Bereich bestimmt werden konnte, wurde die Steigung durch lineare Regression ermittelt.

$$v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl. 3}) \text{ vereinfacht sich f\u00fcr } [S] \ll K_M \text{ zu: } v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M} \quad (\text{Gl. 4})$$

Der lineare Bereich der S\u00e4ttigungskurve beschreibt eine Reaktion pseudo-zweiter Ordnung. Damit stellt die Steigung v_{\max}/K_M dar.

Ansatz zur Messung des K_M - und v_{\max} -Wertes f\u00fcr die Reduktionsreaktion der GatDH:

Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, MgCl ₂ , pH 6.5)	x μ l
Substratl\u00f6sung (y mM in Kaliumphosphatpuffer)	z μ l
NADH-l\u00f6sung (20 mM in bidest. Wasser)	10 μ l
GatDH-l\u00f6sung (0.1 mM in 20 mM Bistris-HCl-Puffer, 1 mM MgCl ₂ , pH 8.0)	10 μ l

$$x + z = 800 \mu\text{l}$$

Um den Einfluss lagerungsbedingter Ver\u00e4nderungen der Enzymaktivit\u00e4t auszuschlie\u00dfen wurden alle Bestimmungen kinetischer Parameter f\u00fcr unterschiedliche Substrate auf ein „Monitorsubstrat“ bezogen. Dabei handelte es sich um 2,3-Butandion, dessen Umsatz bei einer Konzentration von 100 mM, was dem Dreizehnfachen seines K_M -Wertes entspricht, gemessen wurde.

Ansatz zur Bestimmung der GatDH-Aktivit\u00e4t f\u00fcr die Reduktionsreaktion der GatDH:

Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, MgCl ₂ , pH 6.5)	600 µl
2,3-Butandion (Stammlösung 400 mM in Kaliumphosphatpuffer)	200 µl
NADH-lösung (20 mM in bidest. Wasser)	10 µl
GatDH-lösung (0.1 mM in 20 mM Bistris-HCl-Puffer, 1 mM MgCl ₂ , pH 8.0)	10 µl

Zur Bestimmung des jeweiligen v_{\max} -Wertes diene auch hier die Anfangssteigung der aufgezeichneten Kurvenverlaufs. Durch dieses Vorgehen wurden alle Reaktions-geschwindigkeiten relativ zur Umsatzgeschwindigkeit des Monitorsubstrats bestimmt.

4.2.4 Activesite-Titration

Da quantitative Proteinbestimmungen zur Bestimmung von Enzymkonzentrationen Werte ergeben, die nicht berücksichtigen, ob das Enzym aktiv ist oder nicht, kommt es zu großen Problemen beim Vergleich kinetischer Parameter, die mit Enzymproben unterschiedlicher Chargen oder Lagerzeiten erhalten wurden. Daher wurde zur Standardisierung die Activesite-Titration eingesetzt, die eine quantitative Bestimmung der Konzentration an aktivem Enzym erlaubt.

Die Umsatzgeschwindigkeit (v) bei 100 mM 2,3-Butandion (Sättigungskonzentration) wurde mit der gleichen Menge an Enzymlösung ermittelt und konnte mit Hilfe von Gleichung 2 in eine scheinbare Wechselzahl k_{app} umgerechnet werden.

$$v_{\max} = k_{\text{app}} \cdot [E_0] \quad (\text{Gl.2})$$

Da alle anderen kinetischen Untersuchungen relativ zur Umsatzgeschwindigkeit von 2,3-Butandion durchgeführt wurden, war es so möglich für alle Substrate kinetische Parameter, d.h. k_{cat} - und K_M -Werte, zu berechnen, die von der jeweils verwendeten Enzymkonzentration unabhängig sind.

Für die Fluoreszenztitration wurde das Fluoreszenzspektrometer Fluoromax 2 von Jobin Y von Spex, sowie eine Präzisionsküvette der Firma Hellma aus dem Quarzglas Suprasil mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 3 ml verwendet.

Die Bindung von NADH an das freie Enzym quencht die Intensität der Tryptophanfluoreszenz des Proteins. Die Tryptophanreste der GatDH wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Gemessen wurde die Emission für 340 nm, die in Abhängigkeit der hinzutitrierten Menge an NADH abnimmt. Die Auftragung der Emission bei 340 nm gegen die zugegebene NADH-Konzentration ergab so eine Titrationskurve, deren Äquivalenzpunkt der Totalkonzentration an aktivem Enzymmonomer entspricht. Der Äquivalenzpunkt ist erreicht, wenn alle vorhandenen Bindungsstellen mit NADH gesättigt sind. Er kann als Knick der Titrationskurve identifiziert werden.

4.2.5 Modelle zur Beschreibung von Nicht-Michaelis-Menten-Kinetiken

Zur Ermittlung eines Mechanismus, der die Umsetzung von Substraten, die nicht der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten, passend beschreibt, das Programm *Dynafit*^[26] verwendet. Hierzu wird für die nicht-lineare Regression der Levenberg-Marquardt-Algorithmus^[36], ein numerisches Integrationsverfahren, verwendet, mit dessen Hilfe ermittelt werden kann, welcher Mechanismus den Geschwindigkeitsverlauf am besten beschreibt. Außerdem können der k_{cat} -Wert sowie alle anderen am Reaktionsmechanismus beteiligten Geschwindigkeitskonstanten durch den Fit bestimmt werden. Das Programm benutzt sieben numerische und fünf graphische Tests zur Überprüfung der Güte der Fits^[26].

4.2.6 Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Zur Bestimmung der K_I -Werte wurden analog zur Bestimmung von v_{max} - und K_M -Werten UV/VIS-spektroskopische Messungen, wie unter 4.2.2 beschrieben, durchgeführt. Die Inhibitionskonstanten (K_I -Werte) wurden mit Hilfe von Inhibitionskinetiken mit 2,3-Butandion als Substrat ermittelt. Bei $[S] = K_m$ wurde die Konzentration des Inhibitors solange erhöht wurde, bis eine Sättigung erkennbar war. Aus der Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Inhibitorkonzentration ergab sich ein hyperbolischer Kurvenverlauf. Für die meisten der untersuchten Substanzen konnte ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus zugrunde gelegt werden. In diesen Fällen konnte der K_I -Wert durch nicht-lineare Regression mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$v = \frac{[E_0] \cdot [S] \cdot k_{cat}}{\left(K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S] \right)} \quad (\text{Gl.5})$$

für $[S] = K_M$ vereinfacht sich Gleichung (5) zu:

$$v = \frac{v_{max}}{\left(2 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (\text{Gl.6})$$

Handelt es sich bei den auf inhibitorische Eigenschaften getesteten Verbindungen selbst um schwache Substrate der GatDH, dann muss dies in der Regressionsgleichung berücksichtigt werden, wie in Gl.7 gezeigt wird. v_0 stellt hierbei die Restaktivität des Inhibitors dar.

$$v = v_0 + \frac{v_{max} - v_0}{\left(2 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (\text{Gl.7})$$

Der IC_{50} -Wert gibt für standardisierte Reaktionsbedingungen an, bei welcher Inhibitorkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit auf 50 % der uninhibierten Geschwindigkeit reduziert ist. Für die Fälle, in denen kein kompetitiver Inhibitionsmechanismus angenommen werden konnte, wurde der jeweilige IC_{50} -Wert durch nicht-lineare Regression mit Gleichung (8) bestimmt:

$$v_i = v_0 + \frac{v_u}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}} \right)^c} \quad (\text{Gl.8})$$

v_0 = Restaktivität, $v_0 + v_u$ = nicht-inhibierte Geschwindigkeit, $[I]$ = Inhibitorkonzentration, c = Exponent, der bei rein kompetitiver Inhibition den Wert 1 besitzt.

Um alle Inhibitoren direkt vergleichen zu können, wurden alle K_I -Werte für die kompetitive Hemmung durch Gleichung (9) in die entsprechenden IC_{50} -Werte umgerechnet:

$$IC_{50} = K_I * \left(\frac{[S]}{K_M} + 1 \right) \quad (\text{Gl.9})$$

da in unseren Messungen $[S] = K_M$ war, vereinfacht sich die Formel zu

$$IC_{50} = 2 * K_I \quad (\text{Gl.10})$$

Dieses Verfahren ist allerdings nur für kompetitive Hemmung zulässig^[27]. Als Messgröße diente genau wie bei den Sättigungskinetiken die Absorptionsänderung bei 340 nm, aus der sich die Konzentrationsänderung von NADH ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$) ergibt. Alle Messungen wurden bei 25°C, in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, 1 mM MgCl_2 , pH 6.5) mit einer NADH-Anfangskonzentration von 0.25 mM in 1.5 ml Einwegküvetten durchgeführt. Puffer, Substrat, Inhibitor und Coenzym waren in den Küvetten vorgemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet, wobei jede Messung zweimal wiederholt wurde.

Ansatz zur Messung des K_I -Wertes für die Reduktionsreaktion der GatDH:

Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, MgCl_2 , pH 6.5)	x μl
Substratlösung (a mM in Kaliumphosphatpuffer)	15 μl
Inhibitorlösung (b mM in Kaliumphosphatpuffer)	y μl
NADH-Lösung (20 mM in bidest. Wasser)	10 μl

GatDH-Lösung

10 μ l

$$x + z = 785 \mu\text{l}$$

Zur Bestimmung des Hemmtyps wurden jeweils drei Sättigungskinetiken mit 2,3-Butandion als Substrat bei verschiedenen jeweils konstant gehaltenen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration ergab hyperbolische Kurvenverläufe. Die doppelt reziproke Auftragung $1/v$ gegen $1/[S]$ nach Lineweaver und Burk resultiert in der Linearisierung der Sättigungskurven nach Gleichung (8).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (\text{Gl. 11})$$

Für unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen werden Geraden unterschiedlicher Steigungen und/oder Achsenabschnittpunkte erhalten.

Schneiden sich die Geraden auf der x-Achse, liegt eine nicht-kompetitive Hemmung vor. Im Falle der kompetitiven Hemmung besitzen die Geraden einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der y-Achse, während ein paralleler Verlauf auf eine unkompetitive Hemmung hindeutet.

Es sind auch Fälle der gemischten Inhibition bekannt, bei der sich die Geraden in einem gemeinsamen Punkt schneiden, der jedoch auf keiner der beiden Achsen liegt.

4.2.7 Bestimmung der Coenzympezifität

Die Coenzympezifität wurde, ebenfalls UV/VIS-spektroskopisch, mit Hilfe einer Sättigungskinetik bei ansteigender Konzentration des Cofaktors ermittelt. Hierbei wurde die Konzentration des eigentlichen Substrates

(hier 2,3-Butandion) bei 100 mM fixiert, während die Anfangsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Konzentrationen an Coenzym, also NADH oder NADPH, gemessen wurden. Auf diese Weise kann mit Hilfe eines hyperbolischen Fits der K_M -Wert des jeweiligen Cofaktors bestimmt werden.

Ansatz zur Bestimmung der Coenzympezifität für die Reduktionsreaktion der GatDH:

Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, MgCl ₂ , pH 6.5)	x μ l
2,3-Butandion (Stammlösung 400 mM in KP-puffer)	200 μ l
NADH- oder NADPH-lösung (20 mM in bidest. Wasser)	y μ l
GatDH-lösung	10 μ l

$$x + y = 600 \mu\text{l}$$

4.2.8 Docking-Untersuchungen

Um genauere Informationen über die Bindung der Substrate im aktiven Zentrum der GatDH zu erhalten, wurden Docking-Studien mit dem Programm *Ballview 1.2*^[28] durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Programm, das zur Simulation und zum molekularen Modellieren von Makromolekülen entwickelt wurde. Außerdem enthält es Methoden, um Berechnungen der Sekundärstruktur von Wirt-Gast-Komplexen durchzuführen. Das Programm wurde von Lenhof et al.^[28] entwickelt und ist als „open-source-software“ im Internet erhältlich.

Mit Hilfe der von Scheidig et al. ermittelten Röntgenstruktur des Enzyms sollten mit verschiedenen Substraten, die im aktiven Zentrum platziert wurden, Energieminimierungen durchgeführt werden. Ballview sollte hierzu das Kraftfeld „MMFF94“ und den Algorithmus „L-BFGS“ verwenden.

Die Röntgenstruktur der GatDH musste vor der Durchführung der Docking-Untersuchungen auf den Bereich des aktiven Zentrums reduziert werden, um die Rechenkapazität des verwendeten Computers nicht zu überlasten. Hierdurch ergaben sich u.a. freie CO- und NH-Reste durch getrennte Peptidbindungen, die in dieser Form natürlich in der Enzymstruktur nicht vorhanden sind. Daher war es notwendig, die Substrate, die im aktiven Zentrum gedockt werden sollten, vorher in der Nähe der potentiellen Bindungsstellen zu platzieren, um Wechselwirkungen mit den artifiziellen Resten auszuschließen.

4.2.9 NMR-Spektroskopie

Die Reinheit der synthetisierten Substrate und Inhibitoren, sowie der Produkte der enzymatischen Umsetzungen wurde mit Hilfe der ^1H - und der ^{13}C -NMR-Spektroskopie überprüft.

Die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an den Geräten DRX 500 und Magnet System 400 der Firma Bruker in Deuteriochloroform aufgenommen.

4.2.10 Chirale Gaschromatographie

Durch die chirale Gaschromatographie wurde die Enantiomerenreinheit der enzymatisch synthetisierten 1,2-Diole überprüft, wodurch wichtige

Aussagen über die Stereoselektivität der GatDH getroffen werden können. Das Trennprinzip beruht auf unterschiedlich starken Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Enantiomeren und der stationären Phase.

Die gaschromatographischen Untersuchungen erfolgten an einer von der Arbeitsgruppe SCHURIG hergestellten chiralen Säule (Lipodex E, 6-Butanoyl-2,3-o-pentyl- γ -Cyclodextrin) mit einem Innendurchmesser von 250 μm , die in einen Gaschromatograph der Firma Shimadzu (GC-14 A, Kyoto, Japan) eingebaut war. Zur Detektion diente ein Flammeninjektionsdetektor (FID), an den der Integrator Chromatopac C-R6A der Firma Shimadzu (Kyoto) angeschlossen war.

Alle Messungen wurden mit Wasserstoff als Trägergas und Stickstoff als make-up-Gas in einer auf 50°C bis 70°C temperierten Säule durchgeführt. Zur Identifizierung der Substanzen diente der Vergleich der Retentionszeiten mit denen derivatisierter Standards. Als Vergleichssubstanzen wurden käuflich erworbene Enantiomere oder durch enantioselektive Sharpless-Dihydroxylierung synthetisierte 1,2-Diole verwendet

Um eine bessere Trennleistung zu erzielen, wurden alle Proben mit TFAA derivatisiert.

Die Derivatisierung erfolgte in Eppendorfgefäßen, wobei jeweils 10 mg Probe in 200 μl Dichlormethan gelöst, mit 100 μl TFAA versetzt wurde und 2 h in geschlossenen Gefäß inkubiert wurden. Danach wurde das Gefäß solange offen im Abzug stehengelassen, bis Dichlormethan und TFAA weitestgehend verdunstet waren und die Probe in 300 μl wasserfreiem Diethylether aufgenommen.

4.2.11 Messung der optischen Aktivität

Durch die Messung der optischen Aktivität kann bei Molekülen mit einem Chiralitätszentrum durch Vergleich mit ermittelt werden, ob es sich um das (R)- oder (S)-Enantiomer handelt, sofern Literaturwerte der jeweiligen Substanz vorliegen. Die Messungen der optischen Aktivität wurde mit dem Polarimeter 241 der Firma Perkin und Elmer (Überlingen) bei 20°C und einer Wellenlänge von 589 nm, welche der Natrium-D-Linie entspricht, durchgeführt. Die Meßküvette hatte eine Schichtdicke von 10 cm, die Konzentration der Probe lag bei 5-10 mg/ml.

Die spezifische Drehung berechnet sich nach folgender Formel:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c} \quad (\text{Gl.12})$$

$[\alpha]$	spezifische Drehung
T	Temperatur [°C]
l	Schichtdicke [cm]
c	Konzentration [g/100ml Lösung]
α	gemessener Drehwinkel [°]
λ	Wellenlänge des eingestrahnten Lichts [nm]

4.2.12 Quantitative Umsetzung von Diketonen mit GatDH

Die für die Biokonversion eingesetzte GatDH wurde wie unter 4.2.1 beschrieben gereinigt.

Bei der Reduktion von 1,2-Diketonen wird der Cofaktor NADH in doppelter molarer Menge verbraucht. Um eine ökonomischere Reaktionsführung gestalten zu können, wurde NADH kontinuierlich durch das FDH/Formiat-System regeneriert.

Vor jeder Umsetzung wurde die FDH-Aktivität kontrolliert.

Ansatz zur Kontrolle der FDH-Aktivität:

Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, MgCl ₂ , pH 6.5)	600 µl
Na-formiat (Stammlösung 500 mM in Kaliumphosphatpuffer)	200 µl
NAD ⁺ -lösung (20 mM in bidest. Wasser)	10 µl
FDH-lösung	10 µl

Alle Umsätze erfolgten bei RT auf einer Rührplatte. Die Umsätze wurden im Maßstab 0.1-0.4 g Substrat durchgeführt.

Beispielansatz für eine quantitative Umsetzung:

Puffer (Kaliumphosphat 100 mM, MgCl ₂ , pH 6.5)	20 ml
2,3-Butandion (0.34 g, 3.95 mmol)	197 mM
Natriumformiat (0.54 g, 7.94 mmol)	397 mM
NADH (0.01 g, 0.013 mmol)	0.67 mM
NAD ⁺ (0.05 g, 0.075 mmol)	3.77 mM

GatDH-lösung (0.75 ml)	1.73 U/ml
FDH-lösung (0.25 ml)	2.4 U/ml

Die Reaktionszeit betrug jeweils 3 d. Danach wurde die wässrige Lösung dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase und Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die Produktanalyse mittels ^1H - und ^{13}C -NMR und über chirale Gaschromatographie.

4.2.13 Verfolgung der quantitativen Umsetzungen der GatDH mittels HPLC

Zur quantitativen und qualitativen Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurde eine Ionen-Verteilungschromatographie mit einer Ca^{2+} -Ionen-Austauschersäule (Nucleogel Sugar 810 Ca, 300 x 7.8 mm, Fa. Machery & Nagel) durchgeführt. Die Säule wurde bei einer Temperatur von 80 °C gehalten und die Elution erfolgt bei einer Flussrate von 0.75 ml/min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ als Eluent. Die Detektion erfolgt mit einem Brechungsindexdetektor (Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Knauer, Berlin), an den ein Integrator (Chromatopac C-R6, Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) angeschlossen ist.

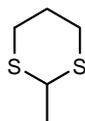
Die Identifizierung der Substanzen erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten mit käuflichen Standards. Konzentrationen werden durch Aufnahme von Kalibrierkurven bestimmt.

4.3 Synthese der Substrate

4.3.1 Synthese von 2-Methyl-1,3-dithian

Eine Lösung von 1 g (23 mmol) Acetaldehyd und 2.5 g (23 mmol) 1,3-Propandithiol in 120 ml Chloroform wird auf -20°C gekühlt. Anschließend werden 0.33 g (2.3 mmol) Bortrifluoridetherat zugegeben. Man lässt die Lösung auf RT aufwärmen und rührt 24 h bei RT. Die Aufarbeitung erfolgt durch Waschen mit Wasser, 10 %iger KOH-Lösung und nochmals mit Wasser. Nach Trocknen über K_2CO_3 wird das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgt durch Destillation.

Ausbeute: 2.66 g (19.8 mmol), 86 %



1

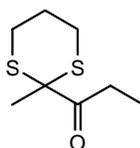
CAS-Nummer: 6007-26-7

4.3.2 Synthese von 1-(2-Methyl-1,3-dithian-2-yl)-propan-1-on

Zu einer Lösung von 1.34 g (10 mmol) 2-Methyl-1,3-dithian in wasserfreiem THF werden bei -30°C 6.0 ml (15 mmol) n-BuLi gegeben. Man rührt weitere 20 min bei -30°C und kühlt dann auf -70°C ab. Nach Zugabe von 0.92 g (10 mmol) Propionsäurechlorid wird 0.5 h bei -70°C gerührt, anschließend lässt man die Lösung auf RT erwärmen. Zu dem Reaktionsgemisch werden je 50 ml Wasser und n-Hexan gegeben. Die organische Phase wird abgetrennt während die wässrige zweimal mit Dichlormethan gewaschen wird. Die vereinigten organischen Phasen

werden mit 10 %iger KOH-Lösung und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wird das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgt durch Destillation.

Ausbeute: 0.21 g (1.1 mmol), 11 %



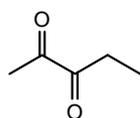
2

Cas-Nummer: 124004-45-1

4.3.3 Synthese von 2,3-Pentandion

0.19 g (1 mmol) 1-(2-Methyl-1,3-dithian-2-yl)-propan-1-on werden zu einer Lösung aus 0.53 g (4 mmol) NCS und 0.68 g (4 mmol) Silbernitrat in wässriger 80% Acetonitrillösung gegeben. Nach 20 min wird die Lösung mit je 1 ml einer gesättigten Na_2S -Lösung und einer Na_2CO_3 -Lösung behandelt. Eine 1:1-Mischung aus Dichlormethan und n-Hexan wird zugegeben und der Niederschlag abfiltriert. Nach Trocknen wird das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 0.055 g (0.55 mmol), 55 %



3

CAS-Nummer: 600-14-6

4.3.4 Synthese der Phosphoniumsalze

Die Phosphoniumsalze wurden ausgehend von den entsprechenden Bromalkanen und Triphenylphosphin über eine S_{N2} -Reaktion hergestellt. Da die Synthesebedingungen in allen Fällen gleich gewählt wurden, wird hier lediglich eine allgemeine Synthesevorschrift für einen 100 mmol Ansatz (bezogen auf Bromalkan) angegeben.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Phosphoniumsalze

1 eq. Bromalkan und 1 eq. Triphenylphosphin werden 24 h in 150 ml Toluol unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene, weiße Feststoff wird abgesaugt und zweimal mit je 50 ml Diethylether gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet.



4-9

Triphenylethylphosphoniumbromid 4



4

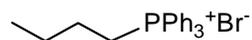
CAS-Nummer: 1530-32-1

Triphenylpropylphosphoniumbromid 5

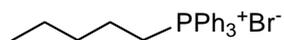


5

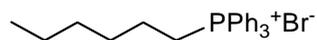
CAS-Nummer: 6228-47-3

Triphenylbutylphosphoniumbromid 6**6**

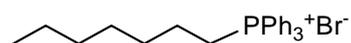
CAS-Nummer: 1779-51-7

Triphenylpentylphosphoniumbromid 7**7**

CAS-Nummer: 21406-61-7

Triphenylhexylphosphoniumbromid 8**8**

CAS-Nummer: 4762-26-9

Triphenylheptylphosphoniumbromid 9**9**

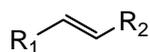
CAS-Nummer: 13423-48-8

4.3.5 Synthese der Olefine

Die Olefine wurden ausgehend von den entsprechenden Phosphoniumsalzen und Aldehyden über eine Wittig-Reaktion hergestellt. Da die Synthesebedingungen in allen Fällen gleich gewählt wurden, wird hier lediglich eine allgemeine Synthesevorschrift für einen 10 mmol Ansatz (bezogen auf Aldehyd) angegeben.

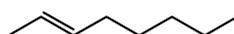
Allgemeine Synthesevorschrift für die Olefine

Zu 1 eq. Phosphoniumsalz in 150 ml Diethylether werden 1.2 eq. Kaliumtertiärbutanolat gegeben. Anschließend gibt man 0.9 eq. Aldehyd langsam (Wärmeentwicklung) zu der orangefarbenen Lösung und rührt 1 h bei RT. Nach Zugabe von 200 ml Wasser trennt man die organische Phase ab und wäscht zweimal mit jeweils 100 ml Wasser. Die Reinigung erfolgt nach Trocknen der organischen Phase mit MgSO_4 und Entfernen des Lösungsmittels durch Schnellfiltration an Kieselgel mit CH_2Cl_2 :n-Hexan 1:1 als Laufmittel.



10-26

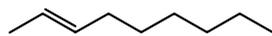
2-Octen 10



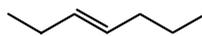
10

CAS-Nummer: 111-67-1

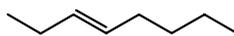
2-Nonen 11

**11**

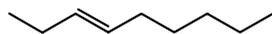
CAS-Nummer: 2216-38-8

3-Hepten 12**12**

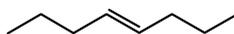
CAS-Nummer: 592-78-9

3-Octen 13**13**

CAS-Nummer: 592-98-3

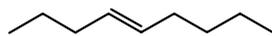
3-Nonen 14**14**

CAS-Nummer: 20063-77-8

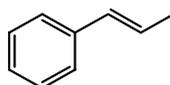
4-Octen 15**15**

CAS-Nummer: 592-99-4

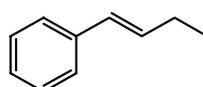
4-Nonen 16

**16**

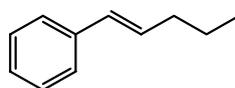
CAS-Nummer: 2198-23-4

1-Phenyl-1-propen 17**17**

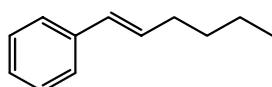
CAS-Nummer: 637-50-3

1-Phenyl-1-buten 18**18**

CAS-Nummer: 824-90-8

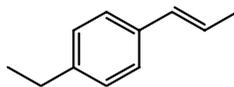
1-Phenyl-1-penten 19**19**

CAS-Nummer: 826-18-6

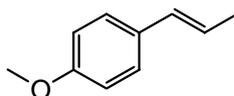
1-Phenyl-1-hexen 20

20

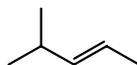
CAS-Nummer: 828-15-9

1-(4-Ethylphenyl)-1-propen 21**21**

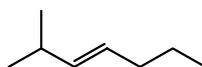
CAS-Nummer: 74532-89-1

1-(4-Methoxyphenyl)-1-propen 22**22**

CAS-Nummer: 104-46-1

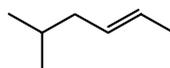
4-Methyl-2-penten 23**23**

CAS-Nummer: 4461-48-7

2-Methyl-3-hepten 24**24**

CAS-Nummer: 17618-76-7

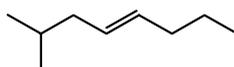
5-Methyl-2-hexen 25



25

CAS-Nummer: 3403-62-4

2-Methyl-4-octen 26



26

CAS-Nummer: 64501-77-5

4.3.6 Synthese der 1,2-Diole durch racemische Dihydroxylierung nach Sharpless

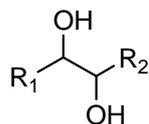
Die 1,2-Diole wurden ausgehend von den entsprechenden Olefinen über eine racemische Sharpless-Dihydroxylierung mit DABCO als nicht-chiralem Ligand hergestellt. Da die Synthesebedingungen in allen Fällen gleich

gewählt wurden, wird hier lediglich eine allgemeine Synthesevorschrift für einen 10 mmol Ansatz (bezogen auf Olefin) angegeben.

Allgemeine Synthesevorschrift für die 1,2-Diole

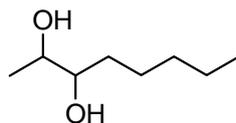
1 eq. des Olefins, 1 eq. Methansulfonamid und 0.05 eq. 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]-octan werden in 100 ml THF gelöst, zu einer Lösung aus 3 eq. Kaliumcarbonat, 3 eq. Kaliumhexacyanoferrat (III) mit einer Spatelspitze Kaliumosmat in 100 ml Wasser gegeben und 24 h bei RT gerührt.

Nach Zugabe einer Lösung aus Natriumdithionit (100 mg) und 20 ml Wasser wird weitere 30 min gerührt. Man extrahiert dreimal mit je 50 ml Diethylether, trocknet die organische Phase über MgSO_4 und entfernt das Lösungsmittel. Die Reinigung erfolgt durch Schnellfiltration über Kieselgel mit CHCl_3 :EtOAc 3:1 als Eluens.



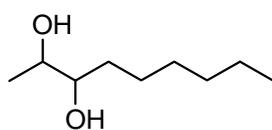
27-43

2,3-Octandiol 27

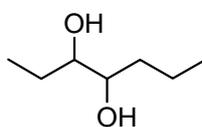


27

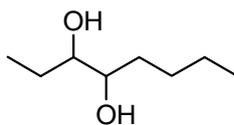
CAS-Nummer: 20653-90-1

2,3-Nonandiol 28**28**

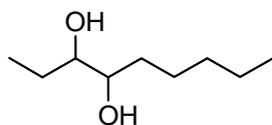
CAS-Nummer: 124006-55-9

3,4-Heptandiol 29**29**

CAS-Nummer: 62593-33-3

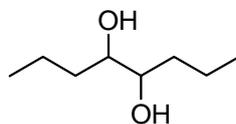
3,4-Octandiol 30**30**

CAS-Nummer: 99799-31-2

3,4-Nonandiol 31**31**

CAS-Nummer: 204987-20-2

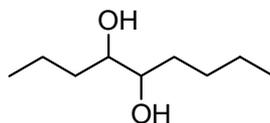
4,5-Octandiol 32



32

CAS-Nummer: 22607-10-9

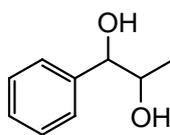
4,5-Nonandiol 33



33

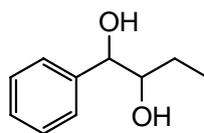
CAS-Nummer: 58159-12-9

1-Phenyl-1,2-propandiol 34

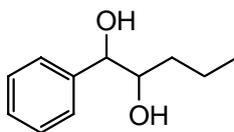


34

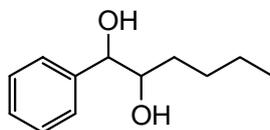
CAS-Nummer: 1855-09-0

1-Phenyl-1,2-butandiol 35**35**

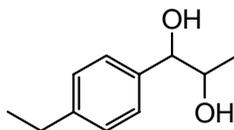
CAS-Nummer: 22607-13-2

1-Phenyl-1,2-pentandiol 36**36**

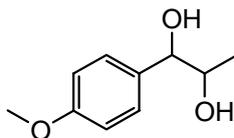
CAS-Nummer: 858839-14-0

1-Phenyl-1,2-hexandiol 37**37**

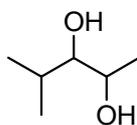
CAS-Nummer: 17814-18-7

1-(4-Ethylphenyl)-1,2-propandiol 38**38**

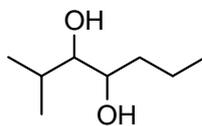
CAS-Nummer: 51410-48-1

1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandiol 39**39**

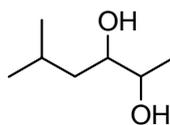
CAS-Nummer: 178035-22-8

4-Methyl-2,3-pentandiol 40**40**

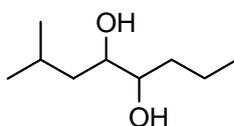
CAS-Nummer: 7795-79-1

2-Methyl-3,4-heptandiol 41**41**

CAS-Nummer: 84248-90-8

5-Methyl-2,3-hexandiol 42**42**

CAS-Nummer: 151750-70-8

2-Methyl-4,5-octandiol 43**43**

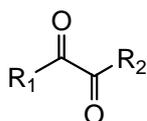
CAS-Nummer: 803713-13-9

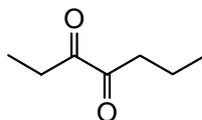
4.3.7 Oxidation der 1,2-Diole mittels NBS

Die 1,2-Dione wurden ausgehend von den entsprechenden 1,2-Diolen durch Oxidation mit NBS^[19] hergestellt. Da die Synthesebedingungen in allen Fällen gleich gewählt wurden, wird hier lediglich eine allgemeine Synthesevorschrift für einen 10 mmol Ansatz (bezogen auf 1,2-Diol) angegeben.

Allgemeine Synthesevorschrift für die 1,2-Dione

1 eq. Diol, 4 eq. NBS und 1 eq. trockenes Pyridin in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff werden 2 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend gibt man 100 ml Wasser hinzu und trennt die organische Phase ab und extrahiert die wässrige Phase mit 50 ml Chloroform. Nach Trocknen über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels erfolgt die Reinigung chromatographisch über Kieselgel mit CH₂Cl₂:n-Hexan 7:3.

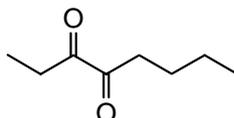
**44-49**

3,4-Heptandion 44**44**

CAS-Nummer: 57733-23-0

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 2.7-2.8 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$),
1.6-1.7 (m, 2 H, CH_2)
1.08 (t, $J = 7.25$ Hz, 3 H, CH_3)
0.93 (t, $J = 7.57$ Hz, 3 H, CH_3)

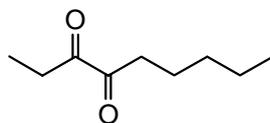
$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 200.0, 190.8, 38.0, 29.5, 16.5, 13.7, 6.9

3,4-Octandion 45**45**

CAS-Nummer: 3457-39-4

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 2.7-2.8 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
1.5-1.6 (m, 2 H, CH_2)
1.3-1.4 (m, 2 H, CH_2)
1.06 (t, $J = 7.25$ Hz, 3 H, CH_3)
0.89 (t, $J = 7.41$ Hz, 3 H, CH_3)

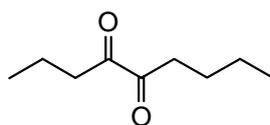
$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 200.2, 199.6, 35.6, 29.3, 24.9, 22.0, 13.5, 6.6

3,4-Nonandion 46**46**

CAS-Nummer: 6124-64-7

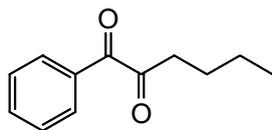
$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	2.6-2.7	(m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
	1.5-1.6	(m, 2 H, CH_2)
	1.3-1.4	(m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
	1.03	(t, $J = 7.25$ Hz, 3 H, CH_3)
	0.85	(t, $J = 7.41$ Hz, 3 H, CH_3)

$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 200.0, 199.4, 35.4, 29.0, 28.5, 24.6, 22.1, 13.2, 6.4

4,5-Nonandion 47**47**

CAS-Nummer: 24610-09-1

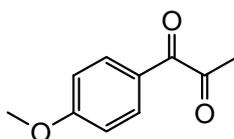
$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 199.9, 199.7, 37.7, 35.5, 24.9, 22.0, 16.3, 13.5, 13.4

1-Phenyl-1,2-hexandion 85**48**

CAS-Nummer: 33720-29-5

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	7.95	(m, 2 H, Ar-H)
	7.62	(m, 1 H, ArH)
	7.48	(m, 2 H, Ar-H)
	2.86	(t, $J = 7.41$ Hz, 1 H, CH_2)
	1.6-1.8	(m, 2 H, CH_2)
	1.3-1.4	(m, 2 H, CH_2)
	1.88	(t, $J = 7.25$ Hz, 3 H, CH_3)

$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 203.5, 192.6, 134.5, 132.0, 130.1, 128.8, 38.5, 24.9, 22.3, 13.8,

1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandion 49**49**

CAS-Nummer: 99865-21-1

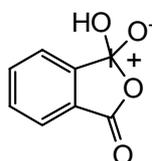
$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	8.01	(d, $J = 8.83$ Hz, 2 H, Ar-H)
	6.96	(d, $J = 8.82$ Hz, 2 H, Ar-H)
	4.38	(s, 3 H, CH_3)
	3.89	(s, 3 H, OCH_3)

^{13}C .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 191.7, 188.1, 165.00, 132.7, 124.6, 114.1, 55.4, 30.7

4.3.8 Synthese von IBX

Zu einer Lösung von 27.16 g (109.5 mmol) 2-Iod benzoessäure in 400 ml entionisiertem Wasser werden 101 g (164.3 mmol) Oxone zugegeben. Innerhalb von 20 min wird die Lösung auf 70°C erwärmt und 3 h bei dieser Temperatur belassen. Anschließend wird die Lösung auf 5°C gekühlt und 1.5 h bei dieser Temperatur belassen. Der entstandene, weisse Feststoff wird über eine Glasfritte abfiltriert und 3 mal mit je 50 ml Wasser, einmal mit 50 ml Aceton gewaschen und 1 d bei RT getrocknet.

Ausbeute: 29.5 g (103.3 mmol) 94 %



50

CAS-Nummer: 61717-82-6

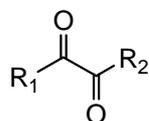
4.3.9 Oxidation der 1,2-Diole mittels IBX

Die 1,2-Dione wurden ausgehend von den entsprechenden 1,2-Diolen durch Oxidation mit IBX^[20] hergestellt. Da die Synthesebedingungen in allen Fällen gleich gewählt wurden, wird hier lediglich eine allgemeine

Synthesevorschrift für einen 10 mmol Ansatz (bezogen auf 1,2-Diol) angegeben.

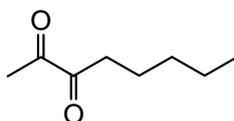
Allgemeine Synthesevorschrift für die 1,2-Diketone

Zu einer Suspension aus 1 eq. IBX in 80 ml THF werden 0.4 eq. Diol gegeben und 24 h bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren des weißen Niederschlags und Entfernen des Lösungsmittels aus dem Filtrat erfolgt die Reinigung chromatographisch über Kieselgel mit CH₂Cl₂:n-Hexan 1:1.



51-61

2,3-Octandion 51

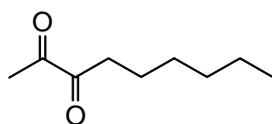


51

CAS-Nummer:585-25-1

¹ H.NMR (CDCl ₃): δ [ppm]=	2.72	(t, <i>J</i> = 7.41 Hz, 2 H, CH ₂)
	2.32	(s, 3 H, CH ₃)
	1.5-1.6	(m, 2 H, CH ₂)
	1.1-1.4	(m, 4 H, CH ₂ -CH ₂)
	0.88	(t, <i>J</i> = 6.90 Hz, 3 H, CH ₃)

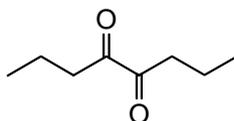
¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 199.6, 197.7, 35.7, 31.3, 23.7, 22.7, 22.3, 13.8

2,3-Nonandion 52**52**

CAS-Nummer: 57644-90-3

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	2.71	(t, $J = 7.41$ Hz, 2 H, CH_2)
	2.31	(s, 3 H, CH_3)
	1.5-1.6	(m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
	1.2-1.4	(m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$)
	0.86	(t, $J = 6.90$ Hz, 3 H, CH_3)

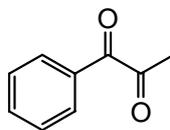
$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 199.3, 197.3, 35.4, 31.2, 28.5, 23.4, 22.7, 22.1, 13.7

4,5-Octandion 53**53**

CAS-Nummer: 7275-17-4

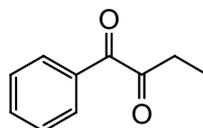
$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	2.69	(t, $J = 7.25$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
	1.5-1.6	(m, 4 H, CH_2CH_2)
	0.91	(t, $J = 7.41$ Hz, 6 H, CH_3)

$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 199.7, 37.6, 16.3, 13.4

1-Phenyl-1,2-propandion 54**54**

CAS-Nummer: 647864-30-0

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	7.99	(d, $J = 8.53$ Hz, 2 H, Ar-H)
	7.63	(m, 1 H, ArH)
	7.50	(t, $J = 7.77$ Hz, 2 H, Ar-H)
	2.52	(s, 3 H, CH_3)

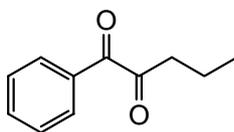
 $^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): \square [ppm]= 200.3, 191.1, 134.3, 130.1, 128.6, 26.1**1-Phenyl-1,2-butandion 55****55**

CAS-Nummer: 3457-55-4

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]=	8.00	(m, 2 H, Ar-H)
	7.65	(t, $J = 7.41$ Hz, 1 H, ArH)
	7.51	(t, $J = 7.88$ Hz, 2 H, Ar-H)
	5.35	(q, $J = 6.62$ Hz, 1 H, CH_2)
	1.88	(d, $J = 6.93$ Hz, 3 H, CH_3)

^{13}C .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 191.7, 191.5, 134.6, 132.0, 130.0, 128.6, 42.6, 18.1

1-Phenyl-1,2-pentandion 56



56

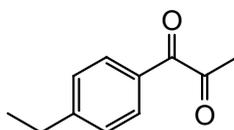
CAS-Nummer: 20895-66-3

^1H .NMR (CDCl_3): δ [ppm]=

7.96	(m, 2 H, Ar-H)
7.65	(m, , 1 H, ArH)
7.51	(m, 2 H, Ar-H)
2.85	(t, $J = 7.28$ Hz, 1 H, CH_2)
1.74	(m, 2 H, CH_2)
1.00	(t, $J = 7.40$ Hz, 3 H, CH_3)

^{13}C .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 203.7, 192.9, 134.8, 132.3, 130.4, 129.2, 40.9, 16.7, 14.0

1-(4-Ethylphenyl)-1,2-propandion 57



57

CAS-Nummer: 10557-27-4

^1H .NMR (CDCl_3): δ [ppm]=

7.90	(d, $J = 8.28$ Hz, 2 H, Ar-H)
7.25	(d, $J = 8.28$ Hz, 2 H, Ar-H)

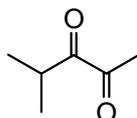
2.69 (q, $J = 7.66$ Hz, 2 H, ArCH₂)

2.49 (s, 3 H, CH₃)

1.24 (t, $J = 7.53$ Hz, 3 H, CH₃)

¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 200.8, 191.2, 151.9, 130.5, 129.4, 128.4, 29.7, 26.4, 15.0

4-Methyl-2,3-pentandion 58



58

CAS-Nummer: 54073-38-0

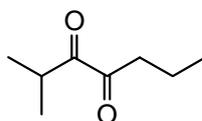
¹H.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 3.3-3.4 (m, 1 H, CH)

2.32 (s, 3 H, CH₃)

1.07 (d, $J = 7.03$ Hz, 6 H, CH₃)

¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 202.7, 198.1, 33.4, 24.5, 17.4

2-Methyl-3,4-heptandion 95



59

CAS-Nummer: 19060-25-4

¹H.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 3.3-3.4 (m, 1 H, CH)

2.69 (t, $J = 7.26$ Hz, 2 H, CH₂)

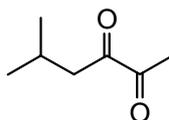
1.6-1.7 (m, 2 H, CH₂)

1.07 (d, $J = 6.93$ Hz, 6 H, CH₃)

0.92 (t, $J = 7.41$ Hz, 3 H, CH₃)

¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 203.6, 200.9, 38.9, 33.9, 17.6, 16.8, 13.9

5-Methyl-2,3-hexandion **60**



60

CAS-Nummer: 54073-36-8

¹H.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 2.59 (d, $J = 6.93$ Hz, 2 H, CH₂)

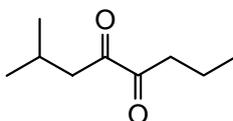
2.30 (s, 3 H, CH₃)

2.1-2.2 (m, 1 H, CH)

0.92 (d, $J = 6.62$ Hz, 6 H, CH₃)

¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 199.2, 197.7, 44.3, 24.2, 23.6, 22.5

2-Methyl-4,5-octandion **61**



61

CAS-Nummer: 6485-01-4

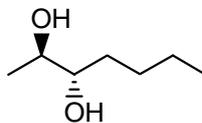
¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 199.1, 198.1, 43.7, 36.8, 23.2, 21.5, 15.6, 12.6

4.3.10 Asymmetrische Dihydroxylierung von cis-2-Hepten nach Sharpless

1.29 g (9.8 mmol) des cis-Olefins und 15.1 g α -AD-mix in 100 ml Wasser/tert.-Butanol 1/1 werden 24 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe einer Lösung aus Natriumdithionit (100 mg) und 20 ml Wasser wird weitere 30 min gerührt. Man extrahiert dreimal mit je 50 ml Diethylether, trocknet die organische Phase über MgSO₄ und entfernt das Lösungsmittel. Die Reinigung erfolgt durch Schnellfiltration über Kieselgel mit CHCl₃:EtOAc 3:1 als Laufmittel.

Ausbeute: 1.33 g (8.05 mmol) = 82 % d. Th.

(R,S)-2,3-Heptandiol 62



62

CAS-Nummer: 202831-28-5

¹ H.NMR (CDCl ₃): δ [ppm]= 3.7-3.8	(m, 1 H, CHOH)
3.5-3.6	(m, 1 H, CHOH)
2.21	(breites s, 2 H, OH)
1.2-1.5	(m, 6 H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂)
1.12	(d, <i>J</i> = 6.27 Hz, 3 H, CH ₃)
0.89	(s, 3 H, CH ₃)

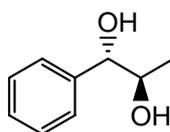
¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 74.9, 70.4, 31.5, 28.2, 22.7, 16.5, 14.0

4.3.11 Asymmetrische Dihydroxylierung von cis-1-Phenylpropen nach Sharpless

1 eq. des cis-Olefins und 15.1 g β -AD-mix in 100 ml Wasser/tert.-Butanol 1/1 werden 24 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe einer Lösung aus Natriumdithionit (100 mg) und 20 ml Wasser wird weitere 30 min gerührt. Man extrahiert dreimal mit je 50 ml Diethylether, trocknet die organische Phase über $MgSO_4$ und entfernt das Lösungsmittel. Die Reinigung erfolgt durch Schnellfiltration über Kieselgel mit $CHCl_3:EtOAc$ 3:1 als Eluens.

Ausbeute: 1.33 g (8.05 mmol) = 82 % d. Th.

(S,R)-1-Phenyl-1,2-propandiol **63**



63

CAS-Nummer: 91177-72-9

1H .NMR ($CDCl_3$): δ [ppm]= 7.2-7.4	(m, 5 H, Ar-H)
4.66	(d, $J = 4.27$ Hz, 1H, CHOH)
4.00	(t, $J = 5.27$ Hz, 1 H, CHOH)
2.54	(beites s, 1 H, OH)
2.02	(beites s, 1 H, OH)

1.06 (d, $J = 6.53$ Hz, 3 H, CH₃)

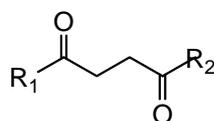
¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 128.4, 127.8, 126.8, 77.5, 71.3, 17.3

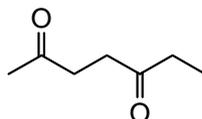
4.3.12 Synthese der 1,4-Diketone nach Stetter

Die 1,4-Diketone wurden ausgehend von den entsprechenden Aldehyden über eine Stetter-Reaktion synthetisiert. Da die Synthesebedingungen in allen Fällen gleich gewählt wurden, wird hier lediglich eine allgemeine Synthesevorschrift für einen 10 mmol Ansatz (bezogen auf Aldehyd) angegeben.

Allgemeine Synthesevorschrift für die 1,4-Diketone

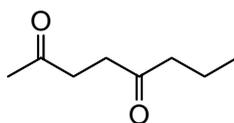
Zu 1 eq. Methylvinylketon, 1 eq. Aldehyd und 0.1 eq. 3-Benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumchlorid werden in einem Dreihalskolben unter N₂-Atmosphäre 0.6 eq. Triethylamin zugegeben und 8 h bei 50°C gerührt. Nach Zugabe von 20 ml 1 %-iger Schwefelsäure wird dreimal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Hydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt die Reinigung über Destillation i. Vak..



64-71**2,5-Heptandion 64****64**

CAS-Nummer: 1703-51-1

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 2.6-2.7	(m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
2.43	(q, $J = 7.41$ Hz, 2 H, CH_2)
2.14	(s, 3 H, CH_3)
1.01	(t, $J = 7.40$ Hz, 3 H, CH_3)

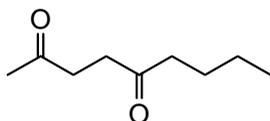
 $^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 210.2, 207.5, 37.1, 35.9, 30.1, 8.0**2,5-Octandion 65****65**

CAS-Nummer: 3214-41-3

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 2.6-2.7	(m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
2.40	(q, $J = 7.41$ Hz, 2 H, CH_2)
2.16	(s, 3 H, CH_3)
1.58	(m, 2 H, CH_2)
0.89	(t, $J = 7.40$ Hz, 3 H, CH_3)

^{13}C .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 209.5, 207.2, 44.6, 36.8, 36.0, 29.8, 17.2, 13.6

2,5-Nonandion **66**



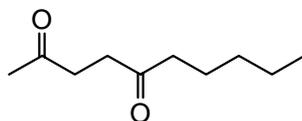
66

CAS-Nummer: 25234-82-6

^1H .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 2.6-2.7 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
2.43 (q, $J = 7.53$ Hz, 2 H, CH_2)
2.16 (s, 3 H, CH_3)
1.54 (m, 2 H, CH_2)
1.28 (m, 2 H, CH_2)
0.88 (t, $J = 7.40$ Hz, 3 H, CH_3)

^{13}C .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 209.6, 207.3, 42.5, 36.9, 36.0, 29.8, 25.9, 22.3, 13.8

2,5-Decandion **67**



67

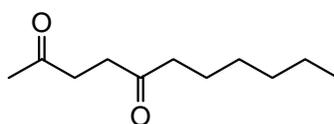
CAS-Nummer: 51575-16-7

^1H .NMR (CDCl_3): δ [ppm]= 2.6-2.7 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
2.43 (q, $J = 7.40$ Hz, 2 H, CH_2)

2.17	(s, 3 H, CH ₃)
1.5-1.6	(m, 2 H, CH ₂)
1.2-1.3	(m, 4 H, CH ₂ -CH ₂)
0.87	(t, $J = 7.02$ Hz, 3 H, CH ₃)

¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 209.3, 207.0, 42.45, 36.5, 35.7, 31.0, 29.6, 23.2, 22.1, 13.5

2,5-Undecandion 68



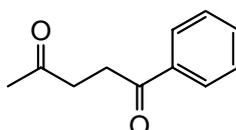
68

CAS-Nummer: 7018-92-0

¹ H.NMR (CDCl ₃): δ [ppm]= 2.6-2.7	(m, 4 H, CH ₂ -CH ₂)
2.43	(q, $J = 7.41$ Hz, 2 H, CH ₂)
2.14	(s, 3 H, CH ₃)
1.5-1.6	(m, 2 H, CH ₂)
1.2-1.3	(m, 6 H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂)
0.85	(t, $J = 7.02$ Hz, 3 H, CH ₃)

¹³C.NMR (CDCl₃): δ [ppm]= 209.9, 207.5, 43.1, 37.2, 36.3, 31.8, 29.1, 24.1, 22.7, 22.1, 14.3

1-Phenyl-1,4-pentandion 69

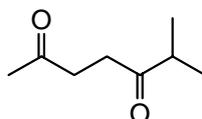


69

CAS-Nummer: 583-05-1

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 7.94	(m, 2 H, Ar-H)
7.52	(m, 1 H, Ar-H)
7.42	(m, 2 H, Ar-H)
3.24	(t, $J = 6.52$ Hz, 2 H, CH_2)
3.24	(t, $J = 6.52$ Hz, 2 H, CH_2)
2.22	(s, 1 H, CH_3)

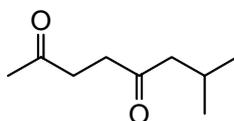
$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 207.3, 198.5, 136.6, 133.1, 128.5, 128.0, 37.0, 32.4, 30.0

2-Methyl-3,6-Heptandion 70**70**

CAS-Nummer: 13901-85-4

$^1\text{H.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 2.6-2.7	(m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
2.60-2.65	(m, 1 H, CH)
2.17	(s, 3 H, CH_3)
1.09	(t, $J = 6.78$ Hz, 3 H, CH_3)

$^{13}\text{C.NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm]= 213.2, 207.3, 40.8, 36.9, 33.8, 29.9, 18.2

7-Methyl-2,5-octandion 71

71

CAS-Nummer: 53626-90-7

$^1\text{H.NMR (CDCl}_3\text{): } \delta \text{ [ppm]} = 2.6\text{-}2.7$	(m, 4 H, CH ₂ -CH ₂)
2.30-2.35	(m, 2 H, CH ₂)
2.17	(s, 3 H, CH ₃)
2.10-2.15	(m, 1 H, CH)
0.89	(t, $J = 6.77$ Hz, 3 H, CH ₃)

$^{13}\text{C.NMR (CDCl}_3\text{): } \delta \text{ [ppm]} = 209.3, 207.0, 42.2, 36.6, 35.7, 29.6, 25.6, 22.0,$
13.5

5 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angstrom, 10^{-10} m
Abb.	Abbildung
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carbonsäureterminus
d	Tag
D ₂ O	deutერიertes Wasser
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-octan
d.h.	das heißt
(DHQ) ₂ PHAL	Dihydroquininphthalazin
(DHQD) ₂ PHAL	Dihydroquinidinphthalazin
DDT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	enantiomeric excess, Enantiomerenüberschuß
eq.	Äquivalent
ES	Enzymsubstratkomplex
EtOAc	Ethylacetat
FDH	Formiatdehydrogenase
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie

GatDH	Galactitoldehydrogenase
Gl.	Gleichung
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IBX	o-Iodoxybenzoesäure
k_{app}	apparente Wechselzahl
k_{cat}	Wechselzahl
kDa	kiloDalton
K_I	Inhibitionskonstante
KP	Kaliumphosphat
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
M	molar
MDR	medium-chain-dehydrogenase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mM	millimolar
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NBS	N-Bromsuccinimid
n-BuLi	n-Butyllithium
NCS	N-Chlorsuccinimid
nm	Nanometer

NMR	Kernresonanzspektroskopie
N-Terminus	Aminoterminus
pH	pH-Wert
ppm	parts per million
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
[S]	Substratkonzentration
SDR	short-chain-dehydrogenase
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
Trp	Tryptophan
v	Geschwindigkeit
v.a.	vor allem
v_{\max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6 Literaturverzeichnis

- [1] G.D.Hegemann, S.L.Rosenberg, *Ann.Rev.Microbiol.* **1970**, *24*, 429.
- [2] B.G.Hall, *Biochemistry* **1981**, *20*, 4042.
- [3] R.I.Beacham, *FEMS Microbiol. Rev.* **1987**, *46*, 409.
- [4] P.W.J.Rigby, B.D.Burleigh, B.S.Hartley, *Nature* **1974**, *251*, 200.
- [5] H.Rode, F.Giffhorn, *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *45*, 716.
- [6] K.H.Schneider, *Dissertation Uni Göttingen* **1990**.
- [7] C.Kahle, K.H.Schneider, F.Giffhorn, *J. Gen. Microbiol.* **1992**, *138*, 1277.
- [8] K.H.Schneider, F.Giffhorn, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 15.
- [9] K.H.Schneider, G.Jäkel, R.Hoffmann, F.Giffhorn, *Microbiologie* **1995**, *141*, 1865.
- [10] G.W.Kohring, P.Wiehr, M.Jeworski, F.Giffhorn, *Comm. Agr. Appl. Biol.Sci.* **2003**, *68*, 209.
- [11] C.Zimmer, *Dissertation Saarbrücken* **2007**.
- [12] B.Gerratana, W.W.Cleland, P.A.Frey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9187.
- [13] D.Gosh, V.Pletnev, D.Zhu, Z.Wawrak, W.Duax, W.Pangborn, F.Labrie, S.Lin, *Structure* **1995**, *3*, 503.
- [14] B.Persson, M.Krook, H.Jörnvall, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 537.
- [15] N.Tanaka, T. Nonaka, T. Tanabe, Y. Mitsui, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7715.
- [16] D.Seebach, E.Corey, *J.Org.Chem.* **1975**, *40*, 231.
- [17] D.Seebach, *Synthesis* **1969**, 17.
- [18] J.Eames, H.J.Mitchell, A.Nelson, P.O'Brian, S.Warren, P.Wyatt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **1999**, 1095.
- [19] J.M. Khurana, B.M.Kandpal, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 4909.
- [20] M.Frigerio, M.Santagostini, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 8019.
- [21] M.Frigerio, M.Santagostini, S.Sputore, *J.Org.Chem.* **1999**, *64*, 4537.
- [22] B.Sharpless, W.Amberg, Y.L.Bennani, G.A.Crispino, J.Hartung, K.Jeong, H.Kwong, K.Morikawa, Z.Wang, D.Xu, X. Zhang, *J.Org.Chem.* **1992**, *57*, 2768.
- [23] H.C.Kolb, M.S.VanNieuwenhze, B.Sharpless, *Chem. Reviews* **1994**, *94*, 2483.
- [24] H.Stetter, *Angewandte Chemie* **1976**, *15*, 639.
- [25] M.T.Jernignan, E.L.Eliel, *J.A.Che.Soc.* **1995**, *117*, 9638.
- [26] P.Kuzmic, *Anal.Biochem.* **1996**, *237*, 260.
- [27] L.Olsen, S.Jost, H.W.Adolph, I.Pettersson, L.Hemmingsen, F.S.Jorgensen, *Boorg. Med. Chem.* **2005**, *14*, 2627.

-
- [28] A.Moll, H.P.Lenhof, *J. Computeraided Molecular Design* **2005**, *19*, 791.
- [29] J.Bonnefoy, J.Moiroux, J.M.Laval, C.Bourdillon, *J.Chem.Soc., Faraday Trens. 1* **1988**, *84*, 941.
- [30] D.Westernhausen, S.Herrmann, W.Hummel, E.Steckhan, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1496.
- [31] R.Wichmann, C.Wandrey, A.Bückmann, M.R.Kula, *Biotechnology and Bioengineering* **1981**, *23*, 2789.
- [32] H.Jörnvall, B.Persson, M.Krook, S.Atrian, R.Gonzales.Duarte, J.Jeffery, D.Gosh, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6003.
- [33] Z.Chen, J.C.Jiang, Z.Lin, W.R. Lee, M.Baker, S.Chang, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3342.
- [34] N.Cols, G.Marfany, S.Atrian, R.Gonzales.Duarte, *FEBS* **1993**, *319*, 90.
- [35] N.H.Schlieben, K.Niefind, J.Müller, B.Riebel, W.Hummel, D.Schomburg, *JMB* **2005**, *349*, 801.
- [36] G. A. F. Seber, C. J. Wild, *Wiley, New York* **1989**, 624.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. G. Wenz danke ich für die interessante Themenstellung und dafür, dass er diese Arbeit durch stete Diskussionsbereitschaft, praktische Ratschläge sowie die Durchsicht des Manuskripts gefördert hat. Außerdem möchte ich ihm an dieser Stelle auch für die Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. H.W. Adolph für die Übernahme des Koreferats, die Durchsicht des Manuskripts sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen praktischen Ratschläge, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. F. Giffhorn und Herrn Dr. G.W. Kohring danke ich für die Zurverfügungstellung von GC und HPLC.

Herrn Dr. G.W. Kohring danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Birgit Hasper möchte ich mich für die Isolierung und Reinigung der GatDH und für die Einweisung auf diesem Gebiet und dem Gebiet der HPLC-Analytik bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Schurig und seinem Arbeitskreis für die chiralen GC-Säule sowie für viele praktische Ratschläge auf dem Gebiet der Gaschromatographie.

Gerti Radünz danke ich für die Erledigung von Verwaltungsangelegenheiten, Joachim Kriesamer und Thomas Scherer für zahlreiche Reparaturen und für ihre Hilfsbereitschaft.

Walid Munief danke ich für seine präparative Unterstützung.

Bei allen Mitgliedern und Ehemaligen des AK Wenz bedanke ich mich für das hervorragende Arbeitsklima und für viele konstruktive und unterhaltsame Diskussionen: Axel Müller, Anja Kasten, Nadine Koch, Manuel Keil, Thomas Stauner, Walid Munief, Carolin Thiele, Christian Straßnig, Christoph Michel, Thomas Stöhr, Thomas Albuzat, Irina Grasmück, Ronny Heisel, Tobias Bernard, Tobias Schulz, Melanie Schnabel, Kathrin Ohliger, Mathias Großer, Anne Engelke und Jutta Ganz.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und mir das Chemiestudium ermöglicht haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Lebensgefährtin Nicole Blum für ihre Unterstützung und ihre Geduld während des Studiums und während dieser Arbeit.

