

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DEPARTMENT CHEMIE

BIOMIMETISCHE KATALYSE

**Biokatalytische Halogenierung:
Studien zu neuartigen Vanadium-abhängigen
Haloperoxidasen und deren Anwendung**

Catharina Julia Seel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Dr. Corinna R. Hess

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Tanja Gulder

2. Prof. Dr. Thomas Brück

3. Prof. Dr. Markus Nett (externes Gutachten)

Prof. Dr. Michael Groll (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 13.12.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 31.01.2019 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2015 bis November 2018 in der Fachgruppe Biomimetische Katalyse an der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Tanja Gulder angefertigt.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von Publikationen:

C. J. Seel*, A. Frank*, M. Groll, T. Gulder, Characterization of a Cyanobacterial Haloperoxidase and Evaluation of its Biocatalytic Halogenation Potential, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2028-2032.

C. J. Seel, A. Králík, M. Hacker, A. Frank, B. König, T. Gulder, Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 3960-3963.

*gleichwertiger Beitrag der Autoren

Diese Arbeit enthält außerdem unveröffentlichte Inhalte:

C. J. Seel, T. Gulder, Biocatalysis Fueled by Light: On the Versatile Combination of Photocatalysis and Enzymes *ChemBioChem* **2018** invited review, *submitted*.

FÜR MARTIN

„Rien ne se perd, rien ne se crée: tout se transforme.“

– Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794) –

I Inhaltsverzeichnis

I	Theoretischer Teil	1
1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	6
2.1	Vanadium-abhängige Haloperoxidasen (VHPOs).....	6
2.1.1	Substratumsetzungen eukaryotischer VHPOs	10
2.1.2	Substratumsetzungen bakterieller VHPOs aus <i>Streptomyces</i> sp.....	15
2.2	Photobiokatalyse.....	20
2.2.1	Chancen und Limitierungen für die industrielle Anwendbarkeit der Biokatalyse.....	20
2.2.2	Anwendung der Photobiokatalyse für die <i>in situ</i> H ₂ O ₂ -Erzeugung	21
3	Zielsetzung	27
4	Ergebnisse und Diskussion	30
4.1	Charakterisierung der neuartigen <i>Am</i> VHPO.....	30
4.2	Kombination der VHPOs mit photokatalytischer, atomökonomischer <i>in situ</i> Erzeugung von H ₂ O ₂	37
4.3	Unveröffentlichte Ergebnisse.....	44
5	Zusammenfassung und Ausblick	56
6	Summary and Outlook	60
II	Experimenteller Teil	64
1	Experimentelle Details zu unveröffentlichten Ergebnissen	64
1.1	Medien	64
1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	65
1.3	Co-Expression mit Chaperonen	65
1.4	Solubilisierung von Mcl40 aus dem unlöslichen Pellet nach der Zell-Lyse.....	66
1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	67
1.6	Klonierung der Mcl40-MBP- und SUMO-Konstrukte	67
1.7	Expressionstests	68
1.8	Heterologe Produktion von Mcl40MBP	68

1.9	Heterologe Produktion von Mcl21	69
1.10	Heterologe Produktion von Mcl24	69
1.11	Kristallisation von <i>holo</i> -Mcl24 und Co-Kristallisation	69
1.12	Bradford Assay	70
1.13	Kultivierung von <i>Streptomyces</i> CNH-189	70
1.14	Naturstoff-Isolierung	71
1.15	Enzymatische Assays	72
1.16	MCD Assay	72
1.17	Assays mit Mcl21	73
1.18	Kaskadenreaktionen	73
1.19	Fütterungsexperiment	73
III	Abkürzungsverzeichnis	74
IV	Danksagung	77
V	Literaturverzeichnis	80
VI	Erlaubnisscheine der Verlage	84
VII	Anhang	85

I Theoretischer Teil

1 Einleitung

Die Entdeckung neuer halogener Naturstoffe hat innerhalb der letzten Jahrzehnte rasant zugenommen: von weniger als 50 beschriebenen halogenierten Naturstoffen im Jahre 1968, bis hin zu mehr als 5000 heute bekannten Vertretern.^[1] Die Mehrzahl halogener Naturstoffe entstammt marinen Organismen wie Algen, Schwämmen, Cyanobakterien sowie anderer mariner Bakterien. Für den Produzentenorganismus selbst bieten diese Naturstoffe einen Überlebensvorteil, indem sie eine Kommunikations- oder Verteidigungsrolle übernehmen. Interessanterweise überwiegt der Anteil bromierter Naturstoffe, obwohl die Konzentration von Chlorid (Cl⁻) in Meerwasser um fast drei Zehnerpotenzen höher liegt als die von Bromid (Br⁻). Sowohl chlorierte, als auch bromierte Naturstoffe sind jedoch mit jeweils über 1000 Vertretern weit verbreitet, wohingegen iodierte (ca. 180 beschriebene Verbindungen) und fluorierte Naturstoffe (nur 5 Beispiele)^[2] eher selten auftreten.^[3] Die Halogensubstitution ist häufig essentiell für die Bioaktivität eines Naturstoffes (Abbildung 1). Beispielsweise ist der Naturstoff Salinosporamid A (**1**) aus dem marinen Bakterium *Salinospora tropica*^[4-5] derzeit als vielversprechender Proteasominhibitor (anticancerogen) in Phase III der klinischen Prüfung. Der Wirkmechanismus beruht hierbei direkt auf der Halogensubstitution, da die Chlorid-Abgangsgruppe die Bildung eines kovalenten Addukts zwischen **1** und einer Threonin Seitenkette im aktiven Zentrum des 20S Proteasoms ermöglicht. Auch Naturstoffe mit antiviralen Eigenschaften konnten isoliert werden, wie das Tetrahydroquinolonalkaloid Benzastatin C (**2**) aus *Streptomyces nitrosporeus*,^[6-7] welches antiviral gegen Herpes simplex Virus Typ 1 und 2, sowie gegen das Vesicular stomatitis Virus wirkt. Das vierfach Iodsubstituierte Hormon Thyroxin T4 (**3**) wird in der Schilddrüse von Säugetieren gebildet und fungiert als Prohormon für das eigentlich hormonell wirksame dreifach iodierte Thyroxin T3.

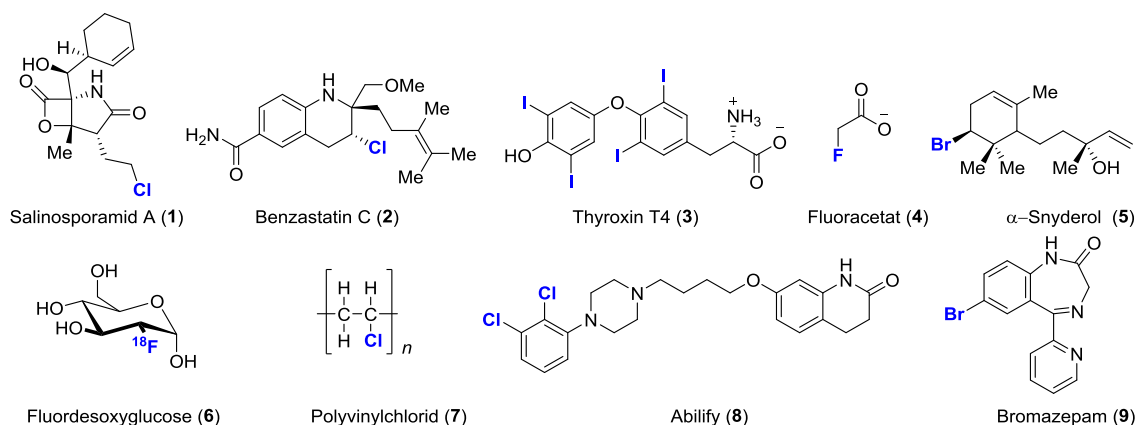


Abbildung 1. Beispiele verschiedener halogener Naturstoffe **1 - 5**. Die halogenierten Verbindungen **6 - 9** finden Anwendung als Materialien, als PET-Diagnostika, sowie als zugelassene Pharmazeutika.

Bei Schilddrüsenunterfunktion kann **3** zur Hormontherapie verabreicht werden. Der toxische fluorierte Naturstoff Fluoracetat (**4**) ist in Pflanzen vieler Länder wie Australien, Brasilien und Südafrika weit verbreitet und dient den Pflanzen vermutlich als Abwehrstoff gegen Herbivoren.^[8] Das monozyklische Sesquiterpen α -Snyderol (**5**) aus der marinen Rotalge *Laurencia obtusa* Lamouroux^[9] ist ein Vertreter bromierter Naturstoffe.

Aufgrund ihrer interessanten biologischen Aktivitäten erlangten halogenierte Naturstoffe, wie auch davon abgeleitete synthetische Derivate große Bedeutung in der pharmazeutischen Industrie. Im Jahre 2016 beinhalteten mehr als 20% der umsatzstärksten Medikamente mindestens ein Halogenatom.^[10] Die Einführung von Halogenen in pharmazeutische Leitstrukturen bewirkt häufig eine Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften wie erhöhte Lipophilie, Bioverfügbarkeit sowie metabolische Stabilität. Zudem können Halogensubstituenten durch eine spezielle Interaktion mit der Zielstruktur ("halogen bonding") die Affinität zum Wirkort verstärken.^[11-13] Das Antipsychotikum Abilify® (**8**) war beispielsweise 2014 das meistverkaufte Medikament. Auch das Sedativum Bromazepam (**9**) weist eine Halogensubstitution auf. Aber auch in anderen Sektoren, wie z.B. im Bereich der bildgebenden Diagnosetechniken (Positron-Emissions-Tomographie (PET)) finden radioaktiv markierte Organohalogen-Verbindungen wie das Diagnostikum **6**^[14] Anwendung. Der Polymer Polyvinylchlorid (**7**, PVC), sowie auch andere handelsübliche Kunststoffe und Beschichtungen (z.B. Teflon) beinhalten ebenfalls häufig Halogensubstituenten.

Trotz der unbestrittenen Bedeutsamkeit halogener Verbindungen sollten bei deren Verwendung auch stets potentielle Gefahren für die Umwelt abgewogen werden. Nicht alle Organo-Halogenverbindungen sind *per se* umwelttoxisch, allerdings gibt es einige Vertreter, welche für Mensch und Umwelt verheerende Auswirkungen haben. Als Beispiele seien hier die Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) genannt.^[15] Diese leicht flüchtigen Substanzen wurden früher als Kühlmittel, Treibgase und Lösemittel verwendet. Sie gelangen in die Stratosphäre und können dort photochemisch in Radikale gespalten werden, die wiederum Ozonmoleküle spalten. Da diese Radikale in einem katalytischen Zyklus stets zurückgebildet werden, können mehrere tausend Ozonmoleküle zerstört werden (Abbildung 2). Die FCKWs besitzen eine hohe Verweildauer, diese beträgt beispielsweise für Halon 1301 (CF₃Br) 110 Jahre. Ebenfalls sehr starke Umweltgifte sind chlorierte Dibenzo-*para*-dioxine, die auch als Dioxine bezeichnet werden.^[16] Diese entstehen als unerwünschte Nebenprodukte bei der Synthese von Halogenkohlenwasserstoffen und bei deren Entsorgung, z.B. bei der Verbrennung des Kunststoffs PVC. Dioxine sind schwer abbaubare, lipophile Substanzen, die sich im Fettgewebe einlagern können. Über die Nahrungskette kann es zu einer sehr starken Anreicherung dieser Stoffe kommen, die dann zur Ausprägung der gesundheitsschädlichen Wirkung führt. Auch langlebige, halogenierte Polymere wie PVC (**7**) stellen wegen der geringen biologischen Abbaubarkeit eine Gefahr für die Umwelt dar. Nicht sachgemäß entsorgter Plastikmüll bildet im pazifischen Ozean ganze

"Plastikinseln". Meerestiere und Vögel verwechseln die Plastikteile mit Futter und sterben daran, dass keine natürliche Nahrung mehr in den Magen aufgenommen werden kann.

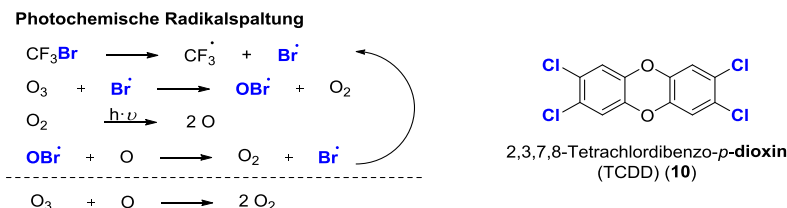
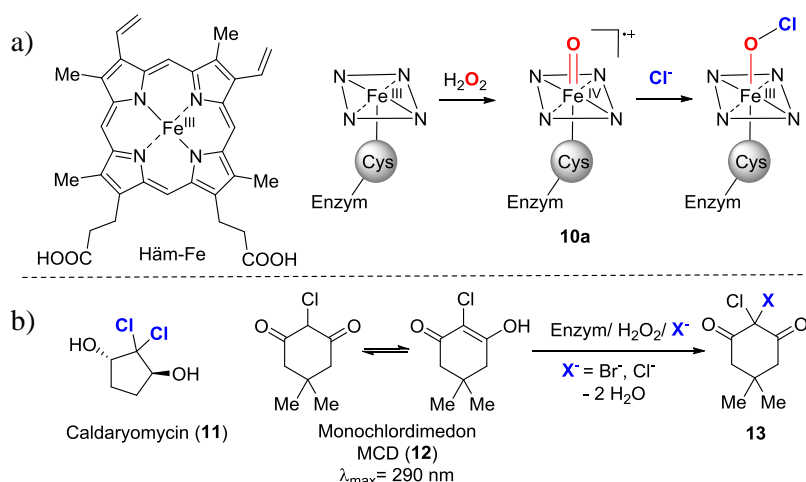


Abbildung 2. Beispiele für umweltgefährliche halogenierte Verbindungen: Halon 1301 (CF_3Br) und dessen Radikalspaltung, sowie das giftigste Dioxin TCDD (**10**).

Die Natur stellt sowohl zur Installation von Halogensubstituenten als auch zur Dehalogenierung vielseitige Enzyme bereit. Das erste Halogenierungsenzym wurde im Jahre 1963 von Hager *et al.* aus dem filamentösen Pilz *Caldariomyces fumago* isoliert.^[17] Der vom Pilz in großen Mengen (g/L) produzierte Naturstoff Caldariomycin (**11**) deutete auf das Vorliegen eines Halogenierungsenzyms hin. Es handelt sich dabei um ein Häm-Eisen abhängiges Enzym, welches als Chlorperoxidase (CPO) bezeichnet wurde (Schema 1). Der Katalysezyklus ähnelt dem der Häm-Eisen abhängigen Cytochrom P450 Enzyme (im Detail beschrieben in 2.2.2). Das an Porphyrin chelatisierte und an ein Cystein im aktiven Zentrum gebundene Eisen wird durch Wasserstoffperoxid zur oxo-Fe(IV)-Spezies (**10a**) oxidiert. Durch nukleophile Addition eines Halogenids wird in einer Umpfoungsreaktion die elektrophile Halogenierungsspezies (Hypohalogenit) generiert. Abgeleitet von dem natürlichen Substrat **11** wurde Monochlordimedon (MCD, **12**) als Nachweisreagenz für die enzymatische Generierung



Schema 1. Die Entdeckung des ersten Halogenierungsenzyms in *C. fumago* (CPO). a) Häm-Eisen im aktiven Zentrum der CPO und vereinfachter katalytischer Zyklus zur Generierung von Hypochlorit als elektrophile Chlorierungsspezies. b) Der von *C. fumago* sekretierte Naturstoff Caldaryomycin (**11**) und der davon abgeleitete photometrische MCD-Assay zum Nachweis von Hypohalogeniten.

von Hypohalogeniten etabliert.^[18] Der entsprechende Assay basiert auf einer Abnahme der Absorption von **12** bei 290 nm durch die elektrophile Chlorierung oder Bromierung des α -Kohlenstoffatoms zwischen den beiden Carbonylfunktionalitäten in **12** und daraus resultierender Unterbrechung der Konjugation im dihalogenierten Produkt **13**. Dieser generelle Assay machte schließlich die Entdeckung einer weiteren Klasse von Halogenierungsenzymen, den Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen (VHPOs), möglich. Mehr als 20 Jahre später gelang somit de Boer *et al.*^[19] die Identifizierung und Isolierung der ersten VHPO aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum* (AnVHPO). Seither haben enorme Fortschritte in der Sequenzierung und bioinformatischen Auswertung der Genome von Mikroorganismen die Identifizierung weiterer Klassen von Halogenierungsenzymen ermöglicht. In Anbetracht der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Halogene sind dementsprechend verschiedene enzymatische Halogenierungsstrategien erforderlich. Insgesamt reichen diese von elektrophiler und nukleophiler Substitution bis hin zu radikalischer Halogenübertragung (Tabelle 1). Gemäß des verwendeten Oxidationsmittels können Halogenierungsenzyme in die zwei Unterklassen der Halogenasen (Sauerstoff) und Haloperoxidasen (Wasserstoffperoxid) unterteilt werden. Diese oxidativen Enzyme sind nicht in der Lage, die Übertragung eines Fluoratoms zu katalysieren, da Fluor aufgrund seiner hohen Elektronegativität nicht zum entsprechenden Hypohalogenit oxidierbar ist. Dementsprechend unterliegt die biokatalytische Fluorierung einem nukleophilen Mechanismus. Diverse Kofaktoren wie Flavin (FADH₂), α -Ketoglutarat oder Vanadat sind an den verschiedenen Halogenübertragungsmechanismen beteiligt.

Tabelle 1. Überblick über die verschiedenen Klassen der Halogenierungsenzyme.

	Halogenasen	Haloperoxidasen	Fluorinasen
Kofaktor	- Nicht-Häm-Fe (Fe (II), α -Ketoglutarat)	- Vanadat - Häm-Fe	(S)-Adenosyl-methionin (SAM)
	- FADH ₂		
Mechanismus	radikalisch X [•]	elektrophil "X ⁺ "	nukleophil X ⁻
	elektrophil "X ⁺ "		
Oxidationsmittel	O ₂	H ₂ O ₂	

Der Arbeitskreis um Prof. Dr. Tanja Gulder nutzt die Konzepte und Prinzipien natürlicher Halogenierungen, um davon in einem biomimetischen Ansatz generelle Strategien zur selektiven und milden C-X-Funktionalisierung abzuleiten. Die klassische, organisch-synthetische Methode zur Installation einer C-X-Bindung ist die elektrophile Halogenierung. Hierzu kann beispielsweise elementares Brom genutzt werden. Diese Methode weist jedoch viele Nachteile wie geringe Chemo- und Regioselektivität, sowie Toxizität und Umweltbedenk-

lichkeit auf. Trotz der großen Bedeutung des *C-X*-Strukturmotivs für Pharmazeutika, Agrochemikalien, Materialien und als synthetische Intermediate für Folgechemie (z.B. Suzuki-Kupplung, Heck-Reaktion) sind selektive Halogenierungsmethoden rar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Identifizierung eines neuartigen Halogenierungsenzyms und der Untersuchung der Determinanten für Selektivität. Durch ein erweitertes Verständnis der Funktionsweise der VHPOs im Allgemeinen soll die Basis für zukünftige Studien bereitet werden, in denen beispielsweise vereinfachte Vanadium-Komplexe als Enzymmimetika abgeleitet werden. Überdies bietet die gezielte Suche nach Genen, die für Halogenierungsenzyme kodieren, nicht nur die Möglichkeit, neuartige Enzyme zu identifizieren, sondern auch die Identifizierung gesamter Biosynthesegencluster halogener Naturstoffe zu erleichtern. Die charakteristischen Isotopenmuster halogener Verbindungen sind zudem nützliche Indikatoren für die Auffindung neuartiger, halogener Naturstoffe in Extrakten mikrobieller Kulturen.

2 Kenntnisstand

2.1 Vanadium-abhängige Haloperoxidasen (VHPOs)

Marine Algen sind bekannt für die Freisetzung von halogenierten, flüchtigen Verbindungen wie Bromoform (CHBr_3) und Dibrommethan (CH_2Br_2). Auch iodierter Kohlenwasserstoffe und elementares Iod werden von Makroalgen abgesondert.^[20] Die Produktion dieser Verbindungen beeinflusst maßgeblich den Ozonabbau in der Troposphäre und Stratosphäre.^[21] Die Bildung der Halogenkohlenwasserstoffe wird auf Haloperoxidasen zurückgeführt, obwohl dieser Zusammenhang bislang noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Als Mechanismus der Bildung von Halogenkohlenwasserstoffen wird die Bildung einer elektrophilen HOBr-Spezies postuliert, welche mit Ketonen innerhalb der Alge reagiert. Die bromierten Ketone würden dann in einer Haloform-Reaktion unter Bildung der Halogenkohlenwasserstoffe zerfallen. Ein alternativer Entstehungsweg wäre die Freisetzung von HOBr, welches dann gelöste, organische Materie halogeniert, die z.B. dem Eintrag toten organischen Materials in die Ozeane entstammt. Die VHPOs sind Metalloenzyme und gehören neben den Häm-Eisen-abhängigen Vertretern der Klasse der Haloperoxidasen an. Das als Metall-Kofaktor genutzte Vanadium ist ein weit verbreitetes Spurenelement (0.014% der Erdkruste).^[22] Es wird angenommen, dass VHPOs für die Produzenten selbst eine biologische Abwehrfunktion einnehmen, da HOBr gegen parasitäre Bakterien und Pilze sowie gegen Herbivoren wirkt. Allerdings sind nicht alle VHPOs auf der Oberfläche der Algen lokalisiert. Für die VHPOs aus Pilzen ergibt sich möglicherweise die biologische Bedeutung durch gebildetes HOCl die Kutikula und/oder Ligninschicht^[23] der Wirtspflanze zu zerstören, um dem Pilz die Nährstoffe der darunterliegenden Zellen zugänglich zu machen.

Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens spielt die Erforschung der Klasse der Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen eine zentrale Rolle. VHPOs kommen sowohl in Organismen aus marinen wie auch terrestrischen Lebensräumen vor (Algen, Pilze, Bakterien und Flechten). Eine weitere Einteilung der VHPOs gemäß des elektronegativsten Halogenids, welches sie in der Lage sind zu oxidieren, unterscheidet Chlorperoxidase (CPOs, alle drei Halogenide), Bromperoxidase (BPOs, oxidieren nur Br^- und I^-) und Iodperoxidase (IPOs, oxidieren nur I^-).^[24] Innerhalb der Enzymklasse sind zwei Sequenzmotive (i) PxYxSGHA und (ii) $\text{LxxxxAxxRxxxGxHxxxD}$ konserviert,^[25] welche auch die Vanadat-Bindestelle im aktiven Zentrum beinhalten (Abbildung 3d). Allerdings finden sich auch in diesen Motiven einige Abweichungen in den VHPOs aus unterschiedlichen Spezies. Der Vanadat-Kofaktor ist kovalent über ein Histidin gebunden. Zusätzlich stabilisieren umliegende Aminosäuren mittels Wasserstoffbrücken (zwei Arginine und jeweils ein Lysin, Serin und Glycin) die equatorialen Sauerstoffatome (Kristallstruktur der *Ci*VHPO, Abbildung 3a-b). Das apikale Sauerstoffatom geht eine H-Brücke mit einer Histidin-Seitenkette ein. Das Vanadat nimmt im Ruhezustand eine

trigonal-bipyramidale Geometrie ein, welche sich mit Beginn des katalytischen Zykluses durch seitliche Bindung des H_2O_2 und Ausbildung des Peroxokomplexes zu einer quadratisch pyramidalen Anordnung verschiebt. Im nächsten Schritt erfolgt die zwei-Elektronen Oxidation des Halogenids durch den Peroxokomplex und somit die Umpolung des nukleophilen Halogenids zu einer reaktiven, elektrophilen X^+ -Spezies (Abbildung 3c).^[26-27] Aus diesem zweistufigen Mechanismus ergibt sich eine bi-bi-Ping-Pong Kinetik. Die Oxidationsstufe des Vanadiums (V) bleibt im katalytischen Zyklus erhalten, somit bleibt der Kofaktor redox-neutral und es ist keine Regenerierung erforderlich.

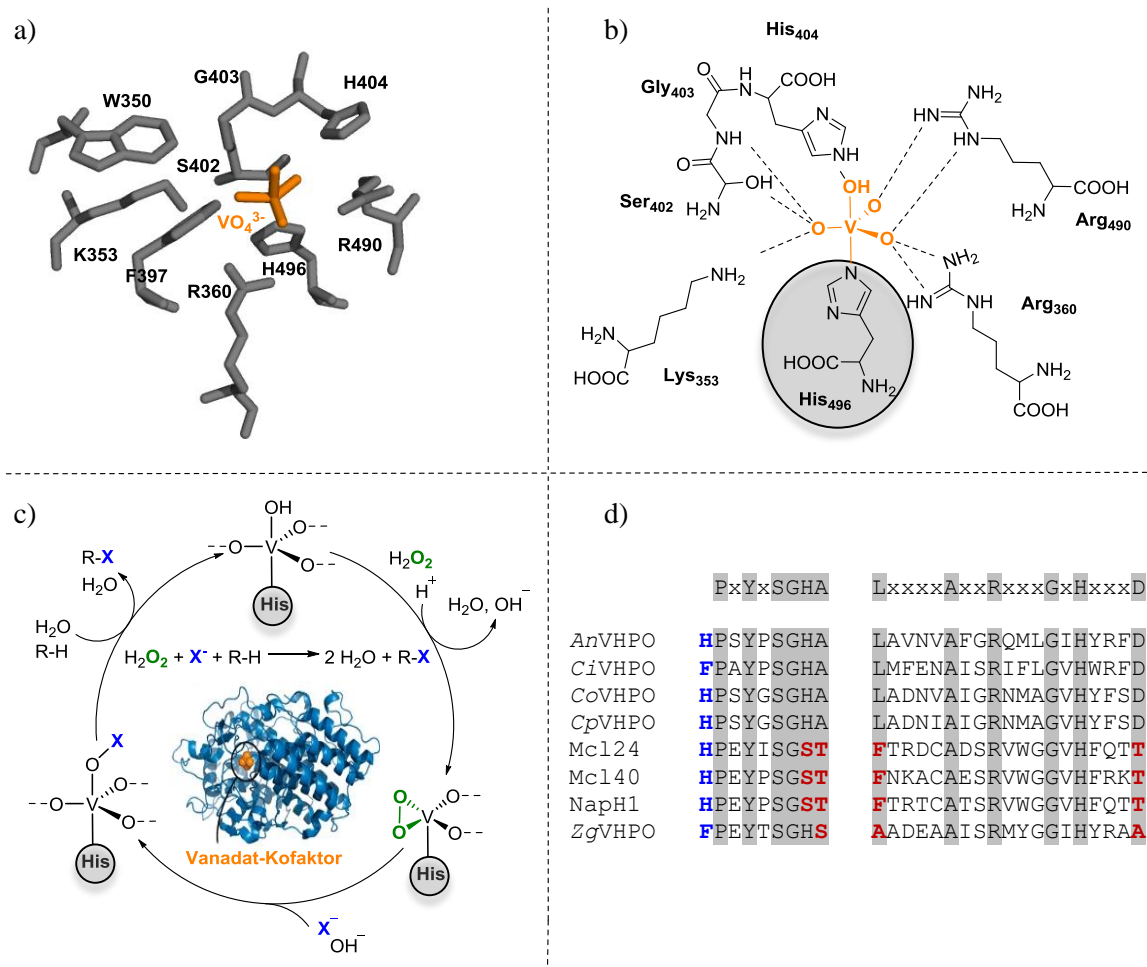
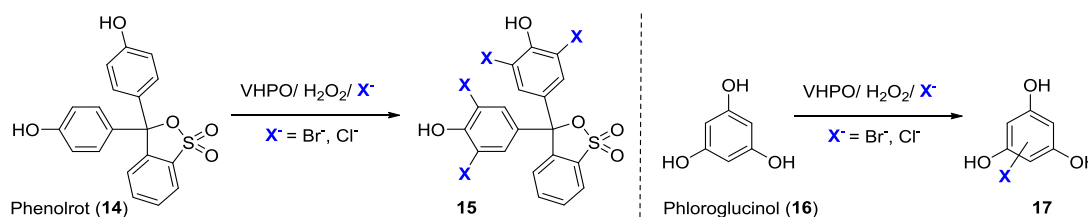


Abbildung 3. a) Das aktive Zentrum der nativen Vanadium-abhängigen Haloperoxidase aus *Curvularia inaequalis* (CiVHPO, PDB 1IDQ).^[28] b) Stabilisierung des Vanadat-Kofaktors durch Wasserstoffbrückenbindungen in CiVHPO. c) Der postulierte katalytische Zyklus der VHPOs.^[29] Gesamtstruktur der CiVHPO (blau).^[30] d) Sequenz-Alignment der konservierten Domänen verschiedener VHPOs. AnVHPO (*Ascophyllum nodosum*), CiVHPO, CoVHPO (*Corallina officinalis*), CpVHPO (*Corallina pilulifera*), Mc124 und Mc140 (Meroclhorin Biosynthesecluser, *Streptomyces* CNH-189), NapH1 (Napyradiomycin Biosynthesecluser, *Streptomyces* CNQ-525), ZgVHPO (*Zobellia galactanivorans*). Von der konservierten Sequenz abweichende Amino-säuren sind in rot markiert, in blau ist eine Aminosäure hervorgehoben, für die ein Einfluss auf die Halogenidbindung postuliert wurde.

VHPOs weisen strukturelle Ähnlichkeit zu Phosphatasen auf, sie können Phosphat anstelle des

Vanadat-Kofaktors binden und verfügen dann über Phosphatase-Aktivität.^[31] Somit stammen sie möglicherweise von dem gleichen evolutionären Vorläufer ab. Bislang sind die Kristallstrukturen der VHPOs aus *A. nodosum* (*An*VHPO, PDB 1QI9),^[32] *Corallina officinalis* (*Co*VHPO, PDB 1QHB),^[33] *Corallina pilulifera* (*Cp*VHPO, PDB 1UP8),^[34] *C. inaequalis* (*Ci*VHPO PDB 1IDQ),^[28,35] *Zobellia galactanivorans* (*Zg*VHPO, PDB 4USZ)^[36] und *Streptomyces* CNQ-525 (NapH1, PDB 3W36) bekannt. Gemeinsame Charakteristika der Tertiärstruktur sind die dominierende α -helikale Struktur mit zwei typischen vier-Helix-Bündeln und einigen kurzen β -Strukturelementen. Inmitten des α -Helix-Bündels befindet sich die Vanadat-Bindestelle am Ende eines trichterförmigen Tunnels, welcher überwiegend hydrophobe Aminosäuren enthält.^[3] Trotz der starken Konservierung des aktiven Zentrums, unterscheidet sich die Quartärstruktur verschiedener VHPOs stark. Die Chlorperoxidase *Ci*VHPO liegt beispielsweise als Monomer, die Bromperoxidase *An*VHPO als Dimer und die Bromperoxidase *Cp*VHPO als Homododekamer vor. Obwohl die Klasse der VHPOs seit nunmehr 30 Jahren bekannt ist, bleiben viele Fragen unbeantwortet. Weder eine Substratbindestelle, noch die genaue Bindestelle des Halogenids konnte bislang eindeutig kristallographisch nachgewiesen werden. Es ist auch ungeklärt, ob das physiologische Oxidationsmittel H_2O_2 ist. Der genaue Mechanismus der Halogenübetragung auf organische Substrate wird sehr kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird insbesondere für die eukaryotischen VHPOs eine frei diffundierende HOBr-Spezies postuliert, wodurch keinerlei Regio- oder Stereospezifität zu erzielen wäre. Auf der anderen Seite konnten sowohl für eukaryotische, wie auch für bakterielle VHPOs eindrucksvolle Beispiele selektiver Transformationen gezeigt werden. Somit existiert möglicherweise doch eine Substratbindestelle und Substratspezifität der VHPOs, sodass das Hypohalogenit je nach Substrat entweder Enzym-gebunden oder frei diffundierbar vorläge. Auch die Determinanten für die Halogenspezifität sind noch ungeklärt. Eine Aminosäure des aktiven Zentrums, die nicht direkt in die Vanadat-Bindung involviert ist, wurde als potentieller Determinant identifiziert (Phe397, Nummerierung der *Ci*VHPO, blau markierte Aminosäuren im Alignment, Abbildung 3). Während Chlorperoxidasen aus Pilzen, sowie die Iodperoxidase aus dem marinem Bakterium *Z. galactanivorans* an dieser Position ein Phenylalanin aufweisen, befindet sich in Bromperoxidasen sowie in Chlorperoxidasen aus Streptomycceten an dieser Stelle ein Histidin. Dem Histidin wurde die Funktion eines Protonendonors und -akzeptors zugesprochen.^[32,37-39] Ein weiterer Erklärungsansatz bezieht sich auf eine andere Aminosäure nahe des katalytisch aktiven Vanadats, welche nicht in das Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden ist. In *Ci*VHPO ist diese Aminosäure ein Tryptophan (W350, Abbildung 3a), wohingegen in Bromperoxidasen an dieser Position typischerweise ein Arginin (Ausnahme *An*VHPO, W338) vorliegt. Studien von Izumi *et al.* zeigten, dass die Mutation dieses Arginins zu R397W und R397F (*Cp*VHPO Nummerierung) für eine Bromperoxidase Chlorierungsaktivität generiert.^[40] Überdies wurde auch schwache intrinsische Chlorierungsaktivität für

einige Bromperoxidasen nachgewiesen.^[41-42] Mögliche Hinweise auf Substrat- und Halogenbindestellen wurden aus Co-Kristallisationsexperimenten von Littlechild *et al.*^[43] abgeleitet. Hierbei wurden Kristalle des rekombinanten Wildtypenzym *Cp*VHPO sowie die R397W Mutante in "Soaking"-Experimenten mit Phenolrot (**14**), Phloroglucinol (**16**) und KBr versetzt (Schema 2). Bei den Substraten **14** und **16** handelt es sich um Standard-Substrate für VHPOs. Die enzymatische Reaktion von **14** zu den halogenierten Produkten **15** kann photometrisch verfolgt werden. Eine putative Substratbindestelle wurde den hydrophoben Regionen des Kanals des aktiven Zentrums zugesprochen, wie auch schon in vorherigen Arbeiten^[32]



Schema 2. Standard-Substrate der VHPOs. Die elektronenreichen Substrate Phenolrot (**14**) und Phloroglucinol (**16**) werden zu den halogenierten Produkten **15** und **17** umgesetzt.

postuliert. Eine potentielle Bindestelle des Bromids wurde in der Nähe von Arg397 (*Cp*VHPO Nummerierung) lokalisiert. Die putativen Bindestellen wurden anhand von möglicher Elektronendichte für Substrat und Halogen in der Struktur identifiziert. Diese Beobachtungen sind in Einklang mit EXAFS-Studien (Extended X-ray Absorption Fine Structure), welche für *An*VHPO auf eine Bindung des Bromids nahe des Vanadats hinweisen.^[44] Auch der Protonierungsgrad des Vanadats war lange Zeit unbekannt, bis ⁵¹V-NMR- Kristallographie^[30] der *Ci*VHPO, sowie deren Dreifachmutante (P395D/L241V/T343)^[45] mit verbesserter katalytischer Aktivität bei basischem pH, durchgeführt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Kofaktor bei pH 6.3 vierfach protoniert, bei pH 7.3 dreifach protoniert und bei pH 8.3 zweifach protoniert vorliegt. Die Dreifachmutante hingegen weist bei pH 5.0 und 8.3 denselben zweifach protonierten Zustand auf.

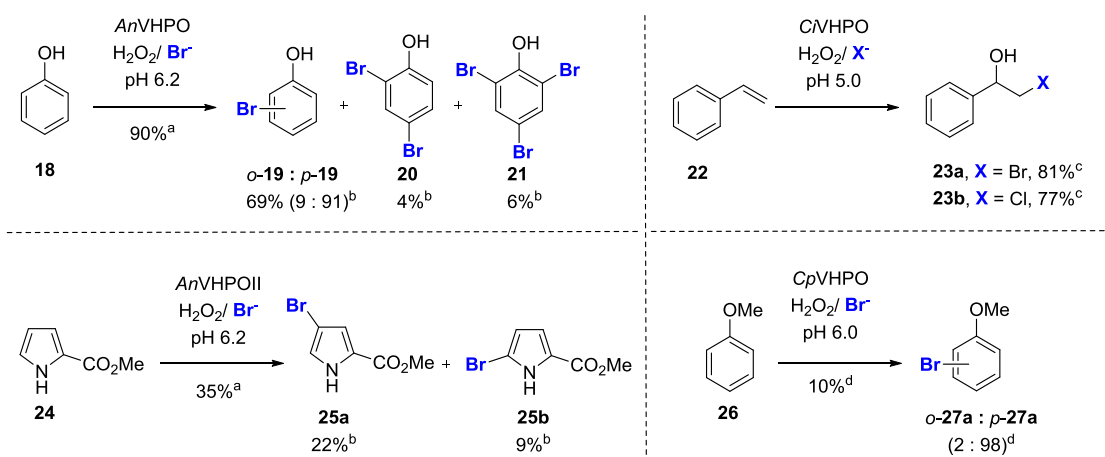
Eine interessante Eigenschaft der VHPOs ist deren hohe operationale Stabilität.^[46] Diese Robustheit wird auf unterschiedliche Einflüsse zurückgeführt. Die dimere Quartärstruktur von *An*VHPO wird beispielsweise durch zwei Disulfidbrücken und vier Salzbrücken stabilisiert.^[32] In den VHPOs aus *Corallina* Spezies wird der stabilisierende Effekt hingegen durch Bindung von zweiwertigen Kationen (ein Ca²⁺ oder Mg²⁺ Kation per Monomer)^[35] und die dodekamere Quartärstruktur bewirkt. Die rekombinante Produktion von VHPOs in *Escherichia coli* erwies sich teilweise als problematisch, beispielsweise lieferte die Expression des *cpvhpo*-Gens in *E. coli* JM109 nur sehr geringen Ausbeuten löslichen Proteins (< 0.4 mg/L).^[47] Eine verbesserte Ausbeute konnte in dem alternativen, eukaryotischen Wirtsorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (5 mg/L)^[42] erzielt werden. Mittels einer neuartigen Rückfaltungsmethode aus der

unlöslichen Fraktion wurde die Ausbeute an löslichem Protein für *Co*VHPO um das 80-fache erhöht.^[48]

Im Folgenden wird zwischen Substratumsetzungen eukaryotischer VHPOs und VHPOs aus marinen Streptomycceten unterschieden, da nur letztere bislang direkt mit biosynthetischen Genclustern und somit den entsprechenden halogenierten Naturstoffen und physiologischen Substraten korrelierbar sind.

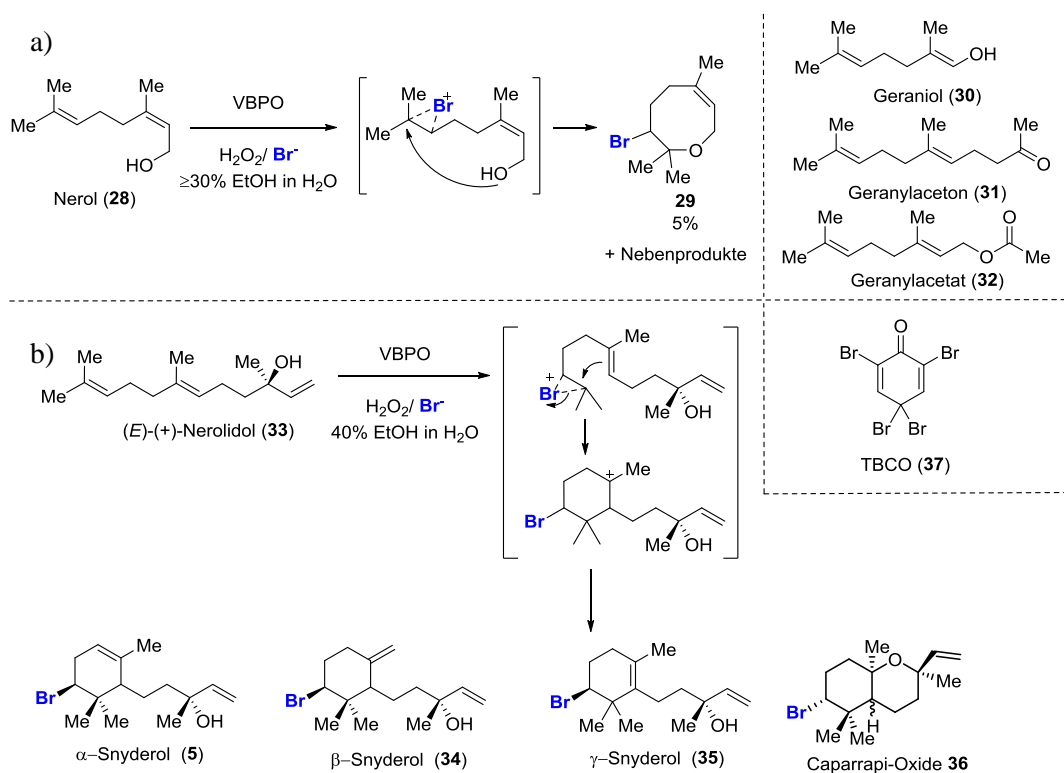
2.1.1 Substratumsetzungen eukaryotischer VHPOs

Verschiedene halogenierte Naturstoffe wie Indole, Terpene, Polyketide und Phenole^[49] wurden aus Algen, insbesondere aus Rotalgen (*Rhodophyceae*) isoliert. Dennoch sind die natürlichen biosynthetischen Vorläufer und die genaue Rolle der eukaryotischen VHPOs bislang wenig erforscht. Beobachtungen unselektiver enzymatischer Bromierung elektronenreicher (Hetero-) Aromaten legten die Schlussfolgerung nahe, dass VHPOs lediglich frei diffundierbare HOX-Spezies generieren. Beispielsweise lieferte die Umsetzung von Phenol (**18**) mit *An*VHPO sowohl beide zu erwartende Regioisomere *o*-**19** und *p*-**19**, als auch Überbromierungsprodukte **20** und **21**.^[50] Somit entspricht die beobachtete Regioisomerenverteilung der klassischen Produktverteilung für $S_{E}Ar$ wie sie auch beispielsweise mit Brom in wässriger Lösung zu erwarten wäre (Schema 3). Auch andere VHPOs lieferten Regioisomerenmischungen wie beispielsweise das Isoenzym *An*VHPOII in der Bromierung des Pyrrolderivats **24**^[51] und *Cp*VHPO in der Bromierung von Anisol (**26**).^[52] Die aktivierte Doppelbindung von Styrol (**22**) reagiert *Ci*VHPO-vermittelt zum Halohydrin **23**.^[53] Auch diese Reaktivität entspricht der klassischen elektrophilen Addition gefolgt von nukleophiler Öffnung des Haliranium-Ions. Bei substituierten Styrolen führt erwartungsgemäß die (*E*)-konfigurierte Doppelbindung zu *anti*- und die (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung zu *syn*-Halohydrinen (nicht gezeigt).



Schema 3. Ausgewählte Beispiele einiger Substratumsetzungen mit VHPOs, die keine ausgeprägte Selektivität und somit die typische Produktverteilung der $S_{E}Ar$ aufweisen. ^aDer Umsatz wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. ^bDie Produktverteilung wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. ^cIsolierte Ausbeute. ^dUmsatz und Produktverteilung wurden mittels HPLC (interner Standard) bestimmt.

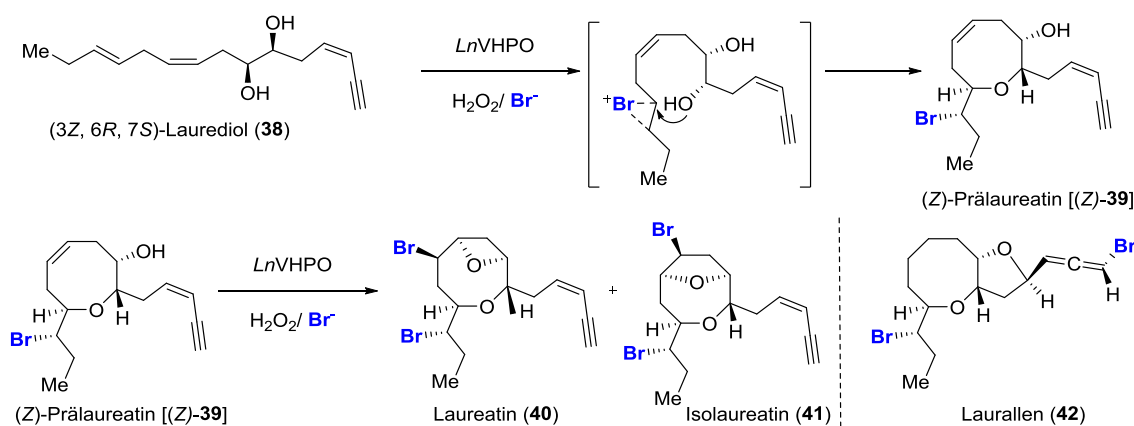
Abgesehen von diesen Beispielen erwartbarer Reaktivität, wurden jedoch auch einige sehr interessante Studien zu eukaryotischen VHPOs von der Arbeitsgruppe um A. Butler durchgeführt, welche auf eine gewisse Substratspezifität deuten. Inspiriert wurden die Studien jeweils von Naturstoffen, die aus dem VHPO-beinhaltenden Organismus isoliert wurden. Marine Rotalgen der Gattung *Laurencia* sind beispielsweise bekannt für die Produktion halogener, zyklischer Sesquiterpene. Als potentieller biosynthetischer Vorläufer wurde Nerol (**28**) mit Bromperoxidasen aus marinen Rotalgen (*Laurencia pacifica*, *Plocamium cartilagineum*, *C. officinalis*)^[54] umgesetzt (Schema 4a). Hierbei wurde zwar ein Produktgemisch erhalten (terminales Bromhydrin, di-bromierte Verbindungen, Epoxid), interessanterweise wurde aber auch das Zyklisierungsprodukt **29** detektiert. Der entropisch ungünstige, 8-gliedrige Ring entsteht als Markovnikov-Produkt durch intramolekularen nukleophilen Angriff der OH-Funktionalität. Die enzymatische Zyklisierung erfolgt in diesem Fall zwar nicht enantioselektiv, allerdings unterscheidet sich die Reaktivität von der klassischen Bromierung mit elementarem Brom in wässriger Lösung, bei der eine solche Zyklisierung nicht auftritt. Das zyklische Strukturmotiv in **29** erinnert an halogenierte zyklische C15 Acetogeneine aus Rotalgen der Gattung *Laurencia* (Schema 5). Weitere Monoterpen-Zyklisierungsprodukte (6-Ringe für



Schema 4. VHPO-vermittelte intramolekulare Terpenzyklisierungen via Bromonium-Intermediat. a) Zyklisierung einfacher Terpene **28** - **32** durch VBPOs aus Rotalgen der Gattungen *Laurencia*, *Plocamium* und *Corallina* führt zu verschiedenen Ringgrößen ohne Enantiospezifität. b) Diastereoselektive Zyklisierung von **33** zu **34** und **35** (Diastereomere von **35** nicht trennbar, **36** als Diastereomerengemisch).

30 und **31**, Bicyklus aus zwei 6-Ringen für **32**) konnten enzymatisch mit den Substraten **30** - **32** erzielt werden, allerdings auch in diesen Fällen nicht enantiospezifisch. In einer Folgearbeit der gleichen Arbeitsgruppe^[49,55] wurde die VBPO-katalysierte Zyklisierung von (*E*)-(+)-Nerolidol (**33**) zu β - und γ -Snyderol (**34** - **35**) zu jeweils selektiv nur einem Diastereomer berichtet (Schema 4b). Die α -Snyderol-Diastereomere **5** konnten mittels chiraler GC nicht getrennt werden. Als weitere Zyklisierungsprodukte wurden Caparrapi-Oxide **36** als Gemisch von Diastereomeren erhalten. Im Gegensatz dazu lieferte nicht-enzymatische Bromierung (wässriges Brom) nur geringe Mengen der Zyklisierungsprodukte. Eine gängige chemische Terpenzyklisierungsmethode mit TBCO (**37**, 2,4,4,6-Tetrabrom-2,5-cyclohexadienon) in Nitromethan resultierte in einer Mischung aus Diastereomeren.

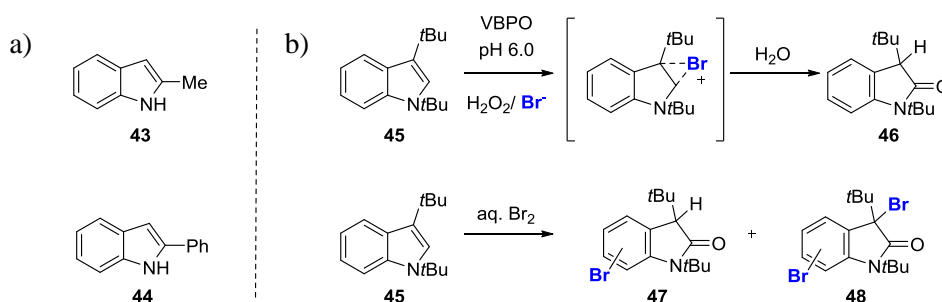
Murai *et al.*^[56] untersuchten eine VBPO aus *Laurencia nipponica* – eine Rotalgen Spezies aus der Naturstoffe mit verschiedenen Oxanringsystemen und konjugiertem Enin- oder Bromallen-Terminus (Acetogenine) isoliert wurden (Schema 5). Die Umsetzung von (3*Z*, 6*R*, 7*S*)-Laurediol (**38**) mit einer partiell aufgereinigten Enzympräparation der *Ln*VBPO lieferte Prälaureatin (**39**). Es ist bemerkenswert, dass *Ln*VBPO in einem Folgeschritt selektiv nur (*Z*)-**39** unter Bildung von **40** und **41** umsetzt. Eine Lactoperoxidase aus *L. nipponica* hingegen katalysiert sowohl diese Reaktion als auch die Umsetzung von (*E*)-**39** zu Laurallen (**42**). Diese Beobachtung lässt die Vermutung einer gewissen Substratselektivität der *Ln*VBPO zu.^[57]



Schema 5. Untersuchungen zur Rolle der *Ln*VHPO in der Bromlaktonisierung zum Aufbau des Oxanringsystems in Acetogeninen aus *L. nipponica*.

Weitere Studien der Arbeitsgruppe um Butler (Schema 6a) zeigten eine kompetitive Reaktion für *An*VHPO bei gleichzeitiger Umsetzung der Substrate 2-Methylindol (**43**) und Phenolrot (**14**).^[58] Während mit Br₂ in wässriger Lösung eine gleichzeitige Umsetzung beider Substrate erfolgte, wird enzymatisch bevorzugt **43** umgesetzt, was sich in einer Verzögerungsphase in der Bromierung von **14** widerspiegelt. Zusätzlich deuteten Fluoreszenz-Quenching Experimente auf eine Bindung des Substrats **44** im aktiven Zentrum hin. Dabei trat ein Quenching der Fluoreszenz von **44** sowohl für *apo-An*VHPO als auch für *holo-An*VHPO auf,

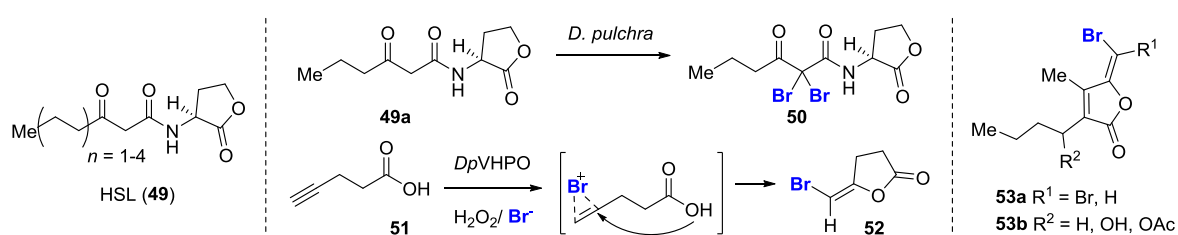
weswegen die Bindung des Indolderivats scheinbar nicht von der Rekonstitution mit Vanadat abhängig ist. Die Autoren postulierten einen Einfang oder eine Bindung der HOX-Spezies im Enzym und eine durch Substratbindung unterbundene Freisetzung dieser Spezies. Des Weiteren wurde die regioselektive, kryptische Bromierung des Indolderivats **45** durch *An*VHPO sowie *Co*VHPO demonstriert (Schema 6b).^[59] Mechanistisch wird die Bildung des Oxoindols **46** auf einen elektrophilen Angriff an der elektronenreichen C=C Doppelbindung von **45**, Ausbildung des Bromoniumions und anschließender Anlagerung von Wasser an C-2 zurückgeführt. Auch bei Zugabe von überstöchiometrischen Mengen des Oxidationsmittels (2 Äq. H₂O₂) war keine zusätzliche Bromierung am aromatischen Ring beobachtbar. Die elektrophile Bromierung mit elementarem Brom hingegen lieferte diverse, auch überbromierte Produkte **47** und **48**, die sich alle von **46** unterschieden. Bei kontrollierter Zugabe von HOBr konnte die Bildung von **46** nicht detektiert werden. Möglicherweise ist die freie Diffusion der HOX-Spezies auch pH-abhängig. Bei saurem pH (pH 5.0) wurden HOBr-ähnliche Spezies (HOBr, Br₂, Br₃⁻ etc.) in einer *An*VHPO beinhaltenden Lösung nachgewiesen,^[60] wohingegen bei pH 6.0 in einer Lösung von *Cp*VHPO bei ähnlicher H₂O₂- und Enzymkonzentration keine freien HOX-Spezies (photometrische Messung der Br₃⁻-Konzentration) detektiert wurden.^[61]



Schema 6. Untersuchung verschiedener Indolsubstrate **43** - **45**. a) In kompetitiven Substratumsetzungen und Fluoreszenz-Quenching Experimenten mit *An*VHPO getestete Substrate.^[58] b) Selektive enzymatische Bildung des Oxoindols durch *An*VHPO und *Co*VHPO im Gegensatz zur Bildung bromierter Oxoindole **47** und **48** durch klassische S_EAr.

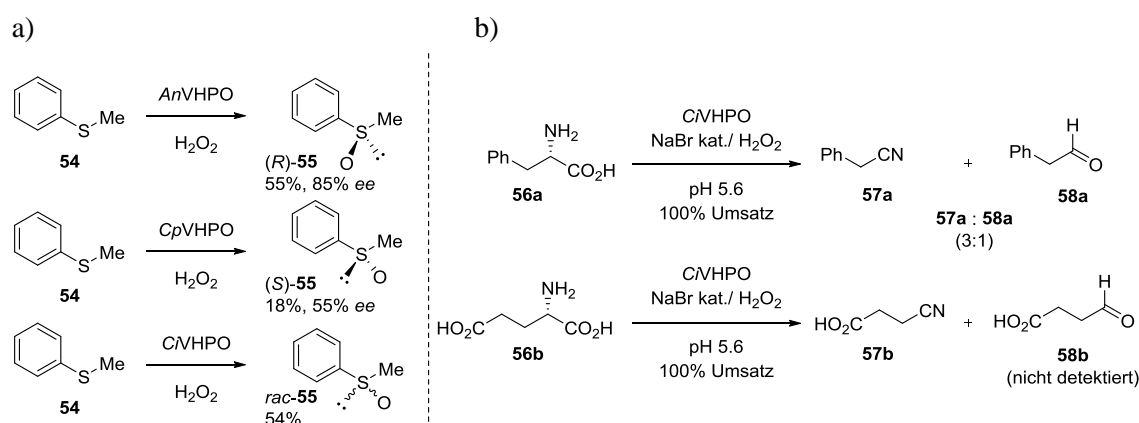
Eine mögliche physiologische Funktion der VHPOs wurde in der Rotalge *Delisea pulchra* untersucht.^[62] Es war bekannt, dass *D. pulchra* über Strategien zur Abwehr von mikrobiellem Befall verfügt, die mit der Inhibition des "Quorum sensing" zusammenhängen. Als "Quorum sensing" wird ein biochemischer Prozess bezeichnet, den Mikroorganismen zum Messen der Zelldichte innerhalb der Einzellerpopulation nutzen. Hierzu werden chemische Signalmoleküle wie beispielsweise Acyl-Homoserinlacton (HSL, **49**) ausgeschüttet und phänotypische Prozesse wie die Biofilmbildung koordiniert. Mit ganzen Algenstücken wurde die zweifache Bromierung von 3-Oxohexanoyl-HSL (**49a**) an der elektrophilen C-2 Position nachgewiesen. Das gebildete, zweifach bromierte Lacton **50** stört das "Quorum sensing". Die

Bromierungsreaktion wird auf Katalyse durch die – auf der Oberfläche der Alge lokalisierte – *Dp*VHPO zurückgeführt. Zudem wurden Bromfuranon Naturstoffe **53** aus der Alge isoliert, welche mittels eines anderen Mechanismus (Regulation des Autoinduktionssystems 2) das "Quorum sensing" stören. Der biosynthetische Vorläufer zu **53** ist nicht bekannt, daher wurde 4-Pentinsäure (**51**) als Modellsubstrat mit der isolierten *Dp*VHPO umgesetzt. Die *Dp*VHPO-vermittelte Bromlaktonisierung erzeugt Bromfuranon **52**, welches sich strukturell von den isolierten Naturstoffen hinsichtlich der fehlenden Doppelbindung im Furanon-Ring unterscheidet. Interessanterweise weist **52** aber dennoch Bioaktivität in der Inhibition des "Quorum sensing" auf. Die *Dp*VHPO könnte somit das Schlüsselenzym für einen dualen Wirkmechanismus sein.



Schema 7. Putative Rolle der VHPO in der Störung des mikrobiellen "Quorum sensing" durch Bromierung von 3-Oxohexanoyl-HSL (**49a**) und Bromolaktonisierung von **51** zu **52**. Homoserinlactone **49** werden als Signalmoleküle von Mikroorganismen genutzt. Bromfuranone **53** wurden aus *D. pulchra* isoliert.

In Abwesenheit eines organischen Substrats bilden VHPOs durch Reaktion des Hypohalogenits mit einem zweiten Äquivalent H₂O₂ Singulett Sauerstoff (¹O₂).^[49] In Abwesenheit des Halogenids können andere Oxidationsreaktionen katalysiert werden, die auf eine direkte zwei-Elektronen Sauerstoffübertragung zurückgeführt werden. Dies kann synthetisch für Sulfoxidationsreaktionen genutzt werden (Schema 8a). Es ist bemerkenswert, dass bei der Umsetzung von Methylphenylsulfid (**54**) mit verschiedenen VHPOs unterschiedliche Enantiomere erzeugt werden: *An*VHPO generiert bevorzugt (*R*)-**55** (55% Ausbeute,



Schema 8. a) VHPO-katalysierte Sulfoxidation. b) VHPO-vermittelte oxidative Decarboxylierung von Aminosäuren **56** zu den entsprechenden Nitrilen **57**.

85% *ee*), *Cp*VHPO (*S*)-**55** (18% Ausbeute, 55% *ee*) und *Ci*VHPO unselektiv *rac*-**55** (54% Ausbeute).^[63] Eine Überoxidation zum Sulfon wurde in keinem Fall beobachtet. Eine weitere potentielle synthetische Applikation der VHPOs besteht in der oxidativen Decarboxylierung von Aminosäuren **56** zu den entsprechenden Nitrilen **57** (Schema 8b).^[64] Hierbei reagiert die elektrophile Halogenierungsspezies mit der Carboxyl-Funktionalität, wodurch die Decarboxylierung induziert und ein primäres Amin als Intermediat gebildet wird. Dieses reagiert mit einem zweiten Äquivalent "HOX" unter Ausbildung des Nitrils. Die Reaktion kann mit katalytischen Mengen des Halogenids durchgeführt werden, benötigt jedoch für vollständigen Umsatz zwei Äq. H₂O₂. Die Aminosäuren L-Phenylalanin (**56b**) und L-Glutamat (**56a**) wurden mit *Ci*VHPO erfolgreich transformiert, wobei für **56b** als Substrat infolge einer Desaminierungsreaktion der Aldehyd **58a** als Nebenprodukt entstand. Die unerwünschte Nebenreaktion konnte durch kontinuierliche Extraktion mit Ethylacetat minimiert werden (bis zu 83% Selektivität für **57a**).

2.1.2 Substratumsetzungen bakterieller VHPOs aus *Streptomyces* sp.

Die Entdeckung von VHPOs eingebettet in biosynthetische Gencluster mariner Streptomycceten und die Beteiligung der VHPOs an der Biosynthese regio- und stereoselektiv halogenierter Meroterpenoid-Naturstoffe stellte einen richtungweisenden Umbruch dar. Meroterpenoide sind gemischte Polyketid-Terpen-Naturstoffe mit Naphthoquinon-Grundgerüst, die von dem gemeinsamen biosynthetischen Vorläufermolekül 1,3,6,8-Tetrahydronaphthalin (THN, **59**) abgeleitet sind (Abbildung 4).^[65] Eine Unterteilung erfolgt gemäß der Position der Terpenseiten-

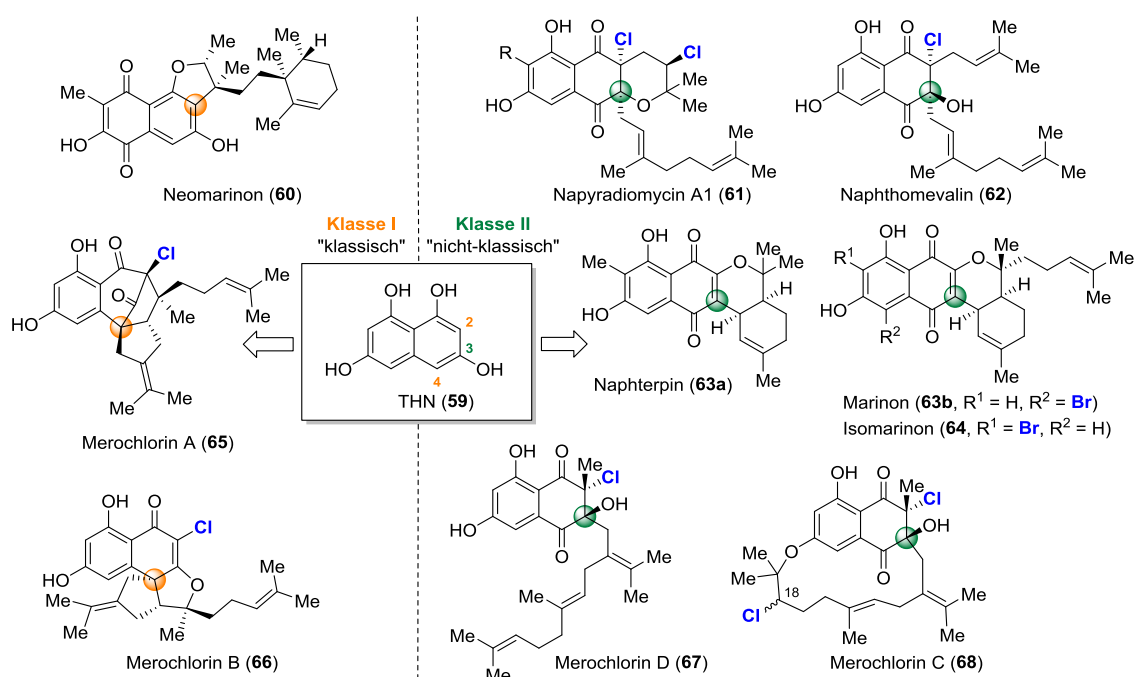
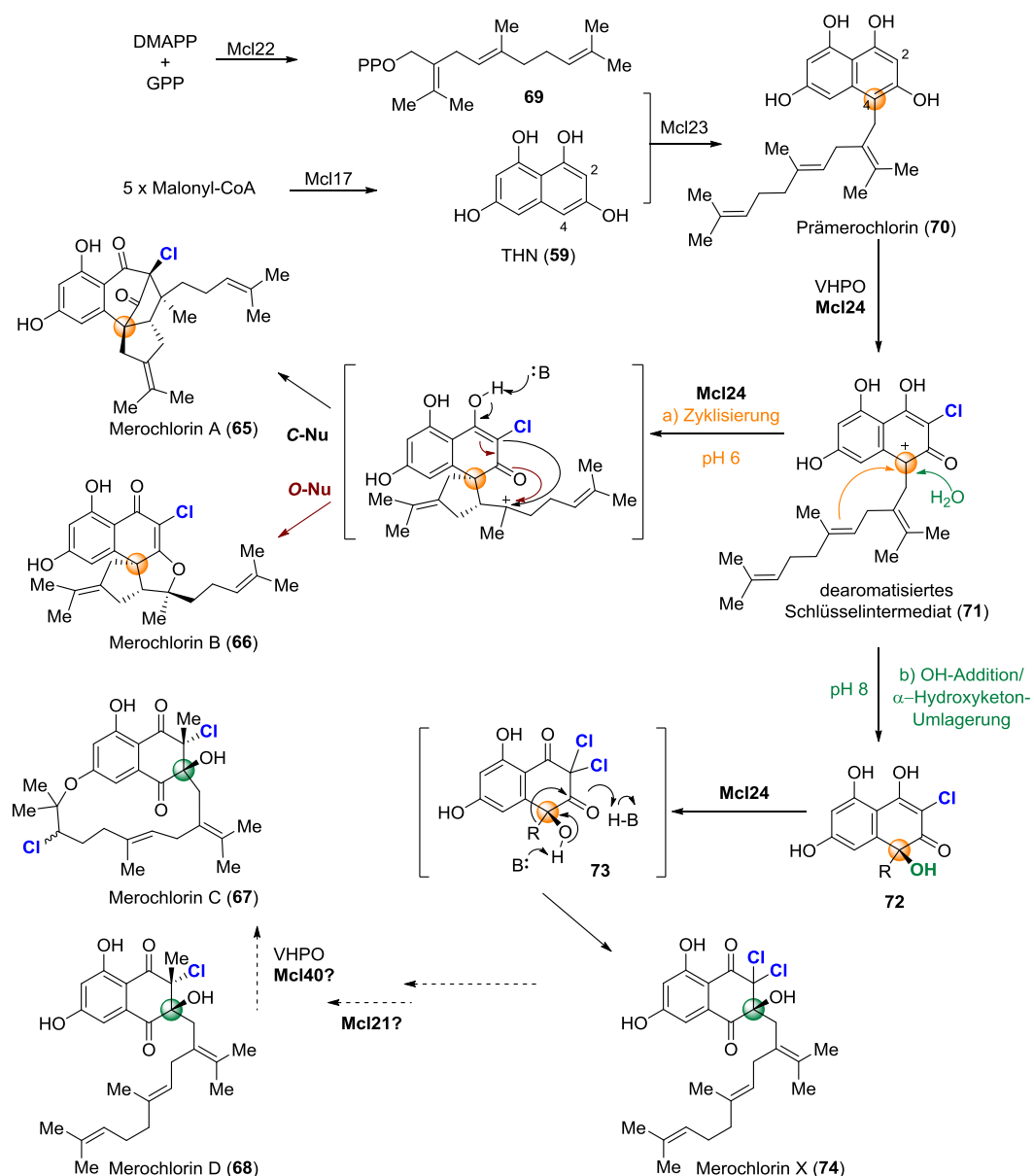


Abbildung 4. Beispiele einiger Meroterpenoid-Naturstoffe **60** - **68** und deren Einteilung je nach Prenylierung an der C-4-/C-2-Position (Klasse I, links) oder C-3-Position (Klasse II, rechts).

kette an der nukleophilen C-4-Position (oder C-2-Position in **60**, Klasse I), oder der nicht-nukleophilen C-3-Position (Klasse II) in klassische und nicht-klassische Meroterpenoide. Die Meroterpenoid-Klasse der Merochlorine **65** - **68** wurde im Jahre 2012 von Moore und Fenical *et al.*^[66] aus dem marinen Streptomycceten-Stamm CNH-189 isoliert. Neben ihrer antibiotischen Aktivität vor allem gegen MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) sind die Merochlorine auch aufgrund ihrer Struktur sehr interessant.^[66-67] So weisen sie neben bis dato unbekanntem Ringsystemen, zum Beispiel dem Bicyclo[3.2.1]oktanon-Grundgerüst in Merochlorin A (**65**), mindestens einen Chlorsubstituenten sowie zwei bis vier aufeinander folgende quartäre Stereozentren auf. Darüber hinaus beinhaltet Merochlorin C (**68**) einen ungewöhnlichen 15-gliedrigen Makrozyklus, wobei die Absolutkonfiguration an C-18 noch unbekannt ist. Fenical und Moore postulierten einen divergenten Biosyntheseweg zu den Merochlorinen **65** - **68** (Schema 9).^[66] Eine genetische Analyse zeigte das Vorliegen eines 57.6 kB großen Biosynthesecusters (*mcl*), welches für insgesamt 41 putative Proteine (Mcl1-41) kodiert. Bei zwei dieser Gene handelt es sich um Gene, die für VHPOs kodieren (*mcl24* und *mcl40*). Heterologe Expression des Genclusters in *Streptomyces coelicor* bestätigte, dass die *mcl*-Gene für die Biosynthese von **65** - **68** verantwortlich sind.^[66] Interessanterweise ergab die Expression eines Fosmids mit einem kürzeren Fragment des Genclusters, welches *mcl40* nicht beinhaltete, fehlende Produktion von **68**. Diese Beobachtung impliziert eine wesentliche Funktion der VCPO Mcl40, die in der Chloronium-induzierten Etherzyklisierung unter Aufbau des 15-gliedrigen Makrozyklus zur Bildung von **67** aus **68** bestehen könnte. Bislang wurde diese Reaktivität *in vitro* jedoch noch nicht gezeigt. Die Rolle anderer Enzyme des Biosyntheseweges konnte hingegen von der Arbeitsgruppe um Moore bereits eindrucksvoll nachgewiesen werden.^[68-69] Die ungewöhnliche, verzweigte Isolesquilandulyl-Seitenkette (**69**) wird von der Prenyldiphosphatsynthase Mcl21 aus den beiden Terpen-Bausteinen Isopentenyl-diphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aufgebaut. Das THN-Grundgerüst (**59**) wird durch die Polyketidsynthase (Typ III) Mcl17 aus fünf Malonyl-CoA Bausteinen aufgebaut und die Prenyltransferase Mcl23 transferiert die Seitenkette an die C-4-Position von **59**. Das dadurch gebildete biosynthetische Intermediat Prämerochlorin (**70**) wird als gemeinsamer Vorläufer aller Merochlorine angenommen. Im nächsten Schritt erfolgt dann eine einzigartige Reaktionskaskade, die von der VCPO Mcl24 katalysiert wird. Infolge zweifacher elektrophiler Chlorierung (nicht gezeigt), wird das benzyliche Carbokation **71** unter Dearomatisierung gebildet. Ausgehend von diesem zentralen biosynthetischen Intermediat **71** kann nun das Carbokation durch Cycloadditionsreaktionen mit dem Doppelbindungssystem der Prenylseitenkette eine intramolekulare Zyklisierung zu den Merochlorinen A (**65**) und B (**66**) eingehen (Weg a, orange). Dabei endet die Kaskade entweder unter Ausbildung einer C-C-Bindung (schwarz, Bildung von **65**), oder unter Ausbildung einer C-O-Bindung (rot, Bildung von **66**). Inspiriert von dieser oxidativen Cycloadditionsreaktion gelang den Arbeitsgruppen um

George^[70] und Trauner^[71] unabhängig voneinander die biomimetische Totalsynthese von **65** und **66**. Die Mcl24-katalysierte Cycloaddition erfolgt bei pH 6, unter basischen Bedingungen (pH 8) hingegen katalysiert Mcl24 eine Umlagerungsreaktion des Prenylrests (Weg b, grün) und generiert schließlich das Umlagerungsprodukt Merochlorin X (**74**). Diese α -Hydroxyketon-Umlagerung^[72] erklärt das Paradoxon, wie die Natur die unbegünstigte C-3 Prenylierung bewerkstelligt. Durch Abfang von **71** durch ein Wasser-Nukleophil wird das α -Hydroxyketon **72** generiert, welches unter erneuter Mcl24-vermittelter Chlorierung zu **73** reagiert. Das an C-2 zweifach substituierte Intermediat **73** ist nun in der Lage, den Prenylrest von C-4 nach C-3 unter Ausbildung von **74** zu verschieben. Berechnung thermodynamischer Parameter^[72] zeigte, dass die geminale Disubstitution an C-2 eine essentielle Voraussetzung für die Umlagerung darstellt.

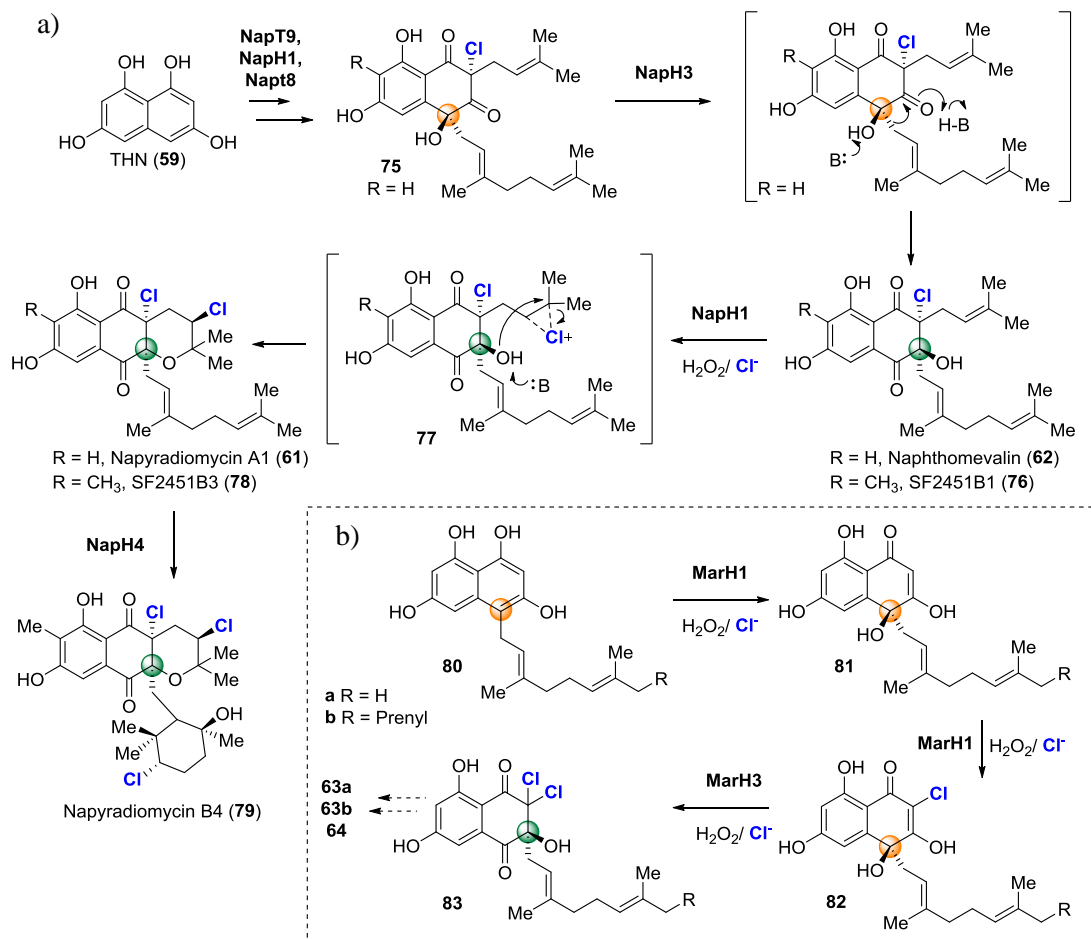


Schema 9. Divergenter Biosyntheseweg zu den Meroterpenoid-Naturstoffen **65** - **68** und Schlüsselrolle der "multi-tasking"-VCPO Mcl24 sowie postulierte Makrochloroetherbildung durch VCPO Mcl40. Nu = Nukleophil.

Die weiteren biosynthetischen Schritte zu den Naturstoffen **67** und **68** sind noch unbekannt. Auch ungeklärt ist, in welchem biosynthetischen Schritt die stereoselektive Methylierung erfolgt. Die Methyltransferase Mcl21 könnte hierfür verantwortlich sein.

Weitere für VHPOs kodierende Gene wurden im Biosynthesecluster der Napyradiomycine in *Streptomyces* sp. CNQ-525 und *Streptomyces aculeolatus* NRRL identifiziert (*napH1*, *napH3* und *napH4*).^[73] Ein interessanter Unterschied der drei NapH VHPOs im Vergleich zu eukaryotischen VHPOs ist die Abwesenheit des konservierten Histidins (gleiches gilt auch für Mcl24 und Mcl40), welches eine H-Brücke zum apikalen Sauerstoff des Vanadats ausbildet (Abbildung 3, His404, *Ci*VHPO Nummerierung). Anstelle des Histidins befindet sich in NapH1 und NapH4 (sowie in Mcl24 und Mcl40) ein Serin, wohingegen diese Position in NapH3 mit Phenylalanin besetzt ist. Das hydrophile Serin kann ähnlich wie Histidin eine Wasserstoffbrücke zum Vanadat ausbilden, ein Austausch durch nicht-hydrophile Aminosäuren führt jedoch zum Verlust der Chlorierungsaktivität, wie beispielsweise durch Mutagenese H404A für *Ci*VHPO gezeigt wurde.^[38] Auch im MCD-Assay zeigt NapH3 keine Halogenierungsaktivität. Hierzu ist allerdings anzumerken, dass sich die VHPOs aus *Streptomyces* sp. untypisch im MCD-Assay verhalten. Obwohl es sich um Chlorperoxidasen handelt, kann keine Chlorierung von **12** im photometrischen Assay detektiert werden.^[68,74] Es wird eine Bindung des Hypochlorits im Enzym postuliert, möglicherweise in Form eines Lysin-Chloramins nahe des aktiven Zentrums.^[3] Die Bromierungsaktivität ist hingegen mittels des MCD-Assays nachweisbar. Dies könnte auf eine schwächere Bindung der HOBr-Spezies im Enzym und Diffundierbarkeit zurückzuführen sein. Somit ist der MCD-Assay nur eingeschränkt als Indikator für VHPO-Aktivität anzusehen, auch falsch positive Ergebnisse des MCD-Assays wurden berichtet.^[75] NapH3 zeigt anders als die anderen VHPOs aus *Streptomyces* sp. keine Bromierungsaktivität in diesem Assay, weswegen es als Umlagerungsenzym postuliert wurde. Diese Funktion konnte durch *in vitro* chemoenzymatische Assays mit dem synthetischen Substrat **75** bestätigt werden (Schema 10a).^[72] Im Gegensatz zum Biosyntheseweg der Merochlorine ist der zweite Substituent in geminaler Position von **75** ein Terpenrest, der von der Prenyltransferase NapT8 übertragen wird. Die Funktion der VCPO NapH1 besteht unter anderem in der Zyklisierung dieser Hemiterpen-Seitenkette unter Ausbildung des trizyklischen Grundgerüsts in Napyradiomycin A1 (**61**).^[74] Bei enzymatischer Umsetzung des putativen Substrats SF2415B1 (**76**), welches aus einer Kultur von *S. aculeolatus* NRRL 18422) isoliert wurde, wird das Chloronium-Intermediat **77** intramolekular von der Hydroxylfunktionalität angegriffen und diastereoselektiv in **78** überführt. Die Struktur von **78** konnte durch Vergleich mit einem authentischen, aus *S. aculeolatus* isolierten, biosynthetischen Intermediat (SF2415B3) verifiziert werden. Die dritte VHPO (NapH4) des Biosyntheseweges ist für die Zyklisierung der Geranyl-Seitenkette in Napyradiomycin B4 (**79**) zuständig.^[76] Eine VHPO-vermittelte α -Hydroxoketo-Umlagerung wurde auch für den Biosyntheseweg der

Marinone **63b** und **64** aus *Streptomyces* sp. CNQ-509 gezeigt.^[77] Die VCPOs aus diesem Biosyntheseweg (MarH1 und MarH2) zeigten auch *in vitro* Aktivität für verwandte Substrate des Naphterpin-Biosyntheseweges (**63a**), welche eine Geranyl- statt einer Farnesylseitenkette aufweisen. Interessanterweise sind **63** und **64** selbst nicht chloriert, die VCPOs katalysieren



Schema 10. Die Rolle von VCPOs in den Biosynthesewegen der Napyradiomycine **61** und **79**, Marinone **63b** und **64**, sowie Naphterpin (**63a**). a) α -Hydroxyketo-Umlagerung katalysiert durch NapH3 unter Bildung von **62**, NapH1-vermittelte und Chloroniumion-induzierte intramolekulare Zyklisierung zum Trizyklus **61** sowie die Rolle von NapH4 in der Umsetzung von **61** zu **79**. b) *In vitro* Assays ausgehend von synthetisch hergestellten Intermediaten des Biosyntheseweges zu **63** und **64** und Etablierung der Funktion von MarH1 und MarH3.

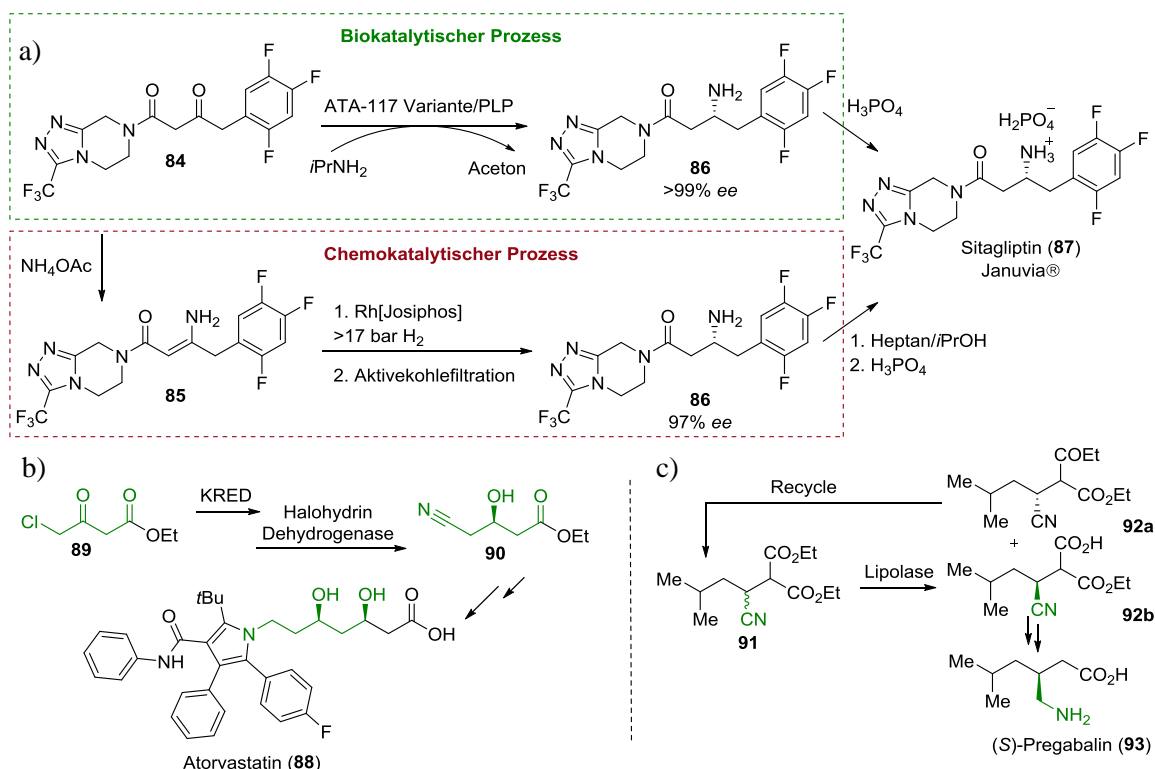
somit kryptische Chlorierungen, die zum Aufbau des Grundgerüsts dienen. Ausgehend von Pränaphterpin (**80a**) und Prämarinon (**80b**) katalysiert MarH1 die Dearomatisierung zu **81a/81b** und anschließende Monochlorierung zu **82a/82b**. Selbst bei Zugabe weiterer Äquivalente des Oxidationsmittels war MarH1, anders als Mcl24 nicht in der Lage, die Umlagerungsreaktion zu **83a/83b** zu katalysieren. Diese Reaktion wird durch MarH3 realisiert. Die dritte VCPO des Biosynthesewegs (MarH2) zeigte keine Halogenierungsaktivität im MCD-Assay. In MarH2 befindet sich ein Asparagin statt des Histidins in apikaler Position zum Vanadat. Ihre Rolle im Biosyntheseweg ist bislang ungeklärt. Insgesamt sind die VCPOs aus *Streptomyces* sp. hoch

selektiv arbeitende Enzyme. Dies zeigt sich darin, dass andere elektronenreiche Substrate nicht chloriert werden (gezeigt für Mcl24)^[68] und Regio- sowie Stereokontrolle erfolgt. In den Biosynthesewegen der Meroterpenoide leisten sie einen faszinierende Beitrag zum Aufbau komplexer Struktur motive.

2.2 Photobiokatalyse

2.2.1 Chancen und Limitierungen für die industrielle Anwendbarkeit der Biokatalyse

Die Nutzung von Enzymen für synthetische Transformationen bietet prinzipiell viele Vorteile wie hohe Selektivität unter milden und umweltfreundlichen Reaktionsbedingungen. Die Anwendung enzymatischer Prozesse hat somit auch industriell zunehmend Beachtung gefunden. Codexis und Merck entwickelten gemeinsam einen enzymatischen Teilschritt in der Synthese von Sitagliptin (**87**, Januvia®).^[78] Der Arzneistoff wird in der Therapie von Diabetes Mellitus Typ 2 eingesetzt und ist mit einem Jahresumsatzvolumen von mehreren Milliarden US Dollar als Blockbuster-Arzneistoff anzusehen. Mittels mehrerer Runden Sättigungsmutagenese und gerichteter Evolution wurde eine (*R*)-selektive Transaminase aus *Arthrobacter sp.* (ATA)



Schema 11. Anwendung von Enzymen in industriellen Prozessen. a) Vergleich des biokatalytischen und chemokatalytischen Prozesses zur Darstellung des Arzneistoffs Sitagliptin (**87**). b) Die Nutzung von Enzymen zum Aufbau des Hydroxynitrils **90** als chirales Schlüsselintermediat in der Synthese von Atorvastatin (**88**). c) Racematspaltung durch eine Lipolase zur Etablierung des Chiralitätszentrums in (*S*)-Pregabalin (**93**). PLP = Pyridoxalphosphat, KRED = Ketoreduktase.

hinsichtlich ihrer Substratspezifität modifiziert. Die 27 Mutationen enthaltende, optimierte Variante ATA-117 war schließlich in der Lage, das Substrat **84** (200 g/L) mit exzellenter Enantioselektivität (>99% ee) und Ausbeute (92%) zum chiralen Amin **86** zu transformieren (Schema 11).^[78] Gegenüber des zuvor genutzten chemokatalytischen Prozesses bietet die biokatalytische Methode neben der leicht verbesserten Enantioselektivität weitere Vorteile: es ist kein Schwermetall (Rh) und keine spezielle Hochdruckapparatur notwendig. Auch der Zwischenschritt zur Bildung des Enamins **85** entfällt. Weitere Beispiele für industriell genutzte biokatalytische Teilschritte sind die Synthese von Atorvastatin^[79] (**88**, Pfizer, Lipitor®, HMG-CoA-Reduktaseinhibitor zur Cholesterolsenkung) und Pregabalin (**93**, Pfizer, Lyrica®, antiepileptischer Arzneistoff).^[80] In der industriellen Darstellung von **88** wurden zwei sequentielle enzymatische Schritte etabliert, um das chirale Schlüsselintermediat **90** aus **89** aufzubauen. Im Rahmen der industriellen Produktion von **93** wird eine enzymatische Racematspaltung ausgehend von **91** ausgenutzt. Das gewünschte Enantiomer **92b** kann weiter zu **93** prozessiert werden, wohingegen das ungewünschte Enantiomer **92a** thermisch zum Racemat **91** zurückgeführt werden kann.

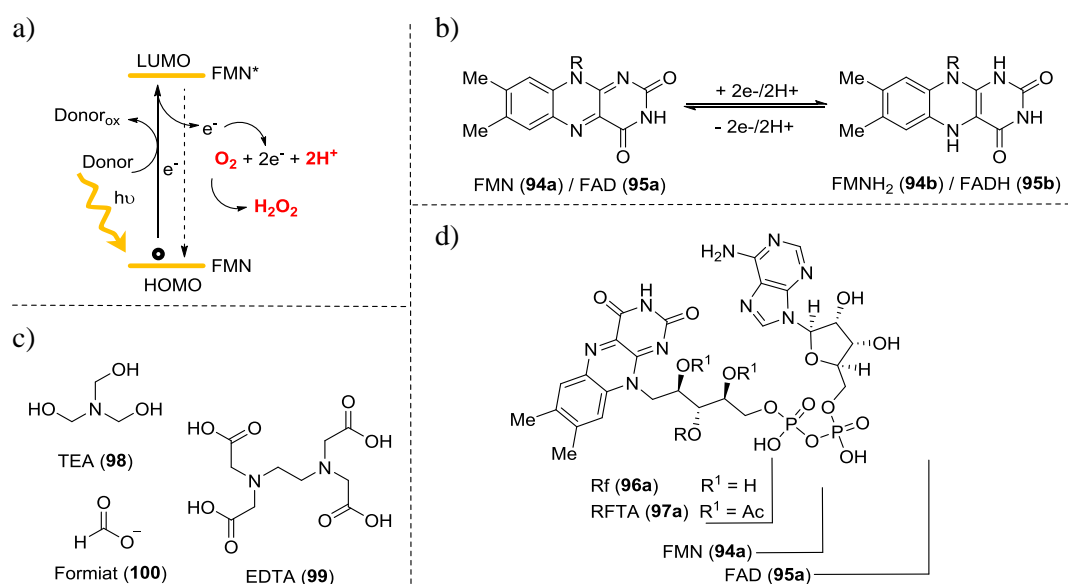
Einige generelle Limitierungen der Biokatalyse bestehen in der generell niedrigen operationalen Stabilität von Enzymen, meist verbunden mit geringer Toleranz organischer Co-Solventien. Auch die großtechnischen Prozessanforderungen (50 - 100 g/L Substratkonzentration) können zur Herausforderung werden, da enzymatische Reaktionen meist in starker Verdünnung durchgeführt werden, um eine Präzipitation des Enzyms zu vermeiden. Weitere Limitierungen stellen Kofaktor-Abhängigkeit und geringe Substratbreite dar. Einige der Limitierungen sind durch "Protein-Engineering", Prozessoptimierung, zwei-Phasen-Systeme und Enzymimmobilisierung adressierbar. Andere Limitierungen, wie die Abhängigkeit von teuren Nicotinamid-Kofaktoren (NAD(P)H) oder die Instabilität gegenüber dem Oxidationsmittel müssen auf anderem Wege umgangen werden. Hierfür bietet das Konzept der Photobiokatalyse – die Kombination eines Photosensitizers mit Biokatalyse unter ressourcenschonender Ausnutzung von Licht als Energiequelle – vielfältige Lösungsansätze.

2.2.2 Anwendung der Photobiokatalyse für die *in situ* H₂O₂-Erzeugung

Photoredoxkatalyse stellt eine elegante Methodik für die Bereitstellung von Elektronen an Oxidoreduktasen dar. Die Klasse der Oxidoreduktasen (E.C. 1. X. X. X) bezeichnet Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren und dabei H₂O₂ (Peroxidasen und Katalasen) oder O₂ (Oxygenasen und Oxidasen) als Oxidationsmittel nutzen.^[81] VHPOs zählen somit zu dieser Enzymklasse, ebenso wie andere oxidativ arbeitende Halogenasen und viele weitere Redoxenzyme. Peroxidasen zeigen häufig eine geringe Stabilität gegenüber dem Oxidationsmittel H₂O₂, wodurch die Handhabung von H₂O₂ eine Herausforderung an enzymatische Assays darstellt. Im Folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick über verschiedene H₂O₂-abhängige Enzyme gegeben.

kontinuierliche Zugabe mittels Spritzenpumpe^[85] oder mithilfe der *in situ* Generierung von H_2O_2 durch elektrochemische^[86] oder gekoppelte enzymatische Systeme^[87] (Glucose Oxidase, GOx) realisiert werden. Die Nutzung von Photokatalyse zur *in situ* H_2O_2 -Erzeugung bietet einen weiteren lohnenswerten Ansatz, der einige Nachteile der anderen Verfahren umgeht. Beispielsweise wird in der kombinierten GOx-Reaktion der pH-Wert des Reaktionsgemisches durch die stöchiometrisch erzeugte Gluconsäure beeinflusst.

In der Photoredoxkatalyse kommen Photosensitizer zum Einsatz, welche die Charakteristika des delokalisierten π -Systems von natürlichem Chlorophyll imitieren. Photosensitizer absorbieren den sichtbaren oder nahen UV-(Ultraviolett) Bereich elektromagnetischer Wellen, wodurch Elektronen in höhere Energiezustände (LUMO) gehoben werden und dabei eine Elektronenlücke im HOMO zurücklassen (Schema 12a). Diese Elektronenlücke wird durch Oxidation von Opferelektronendonoren gefüllt und der Photosensitizer kehrt in den energetischen Grundzustand zurück. In einem konkurrierenden Rekombinationsprozess fällt das angeregte Elektron zurück ins HOMO ohne an die Elektronentransportkette weitergeleitet worden zu sein. Der angeregte Zustand besteht entweder in einem Singulett-Zustand (keine ungepaarten Elektronen, kurze Lebensdauer von wenigen ns), oder in einem Triplett-Zustand (zwei ungepaarte Elektronen, längere Lebensdauer in der Größenordnung von ms). Die Flavine FMN (**94a**) und FAD (**95a**) (Schema 12b-c) sind die

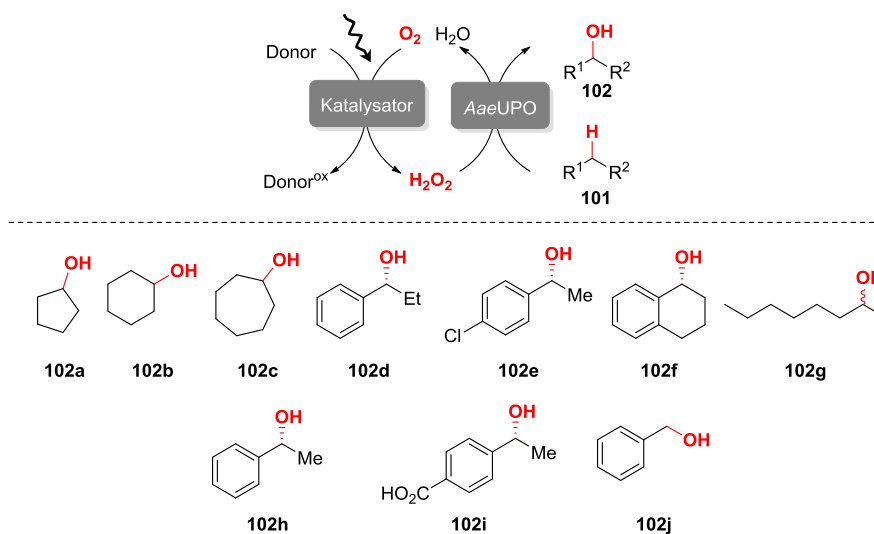


Schema 12 a) Prinzip der Photoredoxkatalyse am Beispiel des FMN-Photosensitizers mit nachfolgender Entkopplungsreaktion zur Erzeugung von H_2O_2 aus O_2 und konkurrierender Rekombinationsprozess des angeregten Elektrons (gestrichelter Pfeil). b) Die als natürliche Kofaktor-Redoxpaare genutzten Flavine FMN/FMNH₂ (**94**) und FAD/FADH₂ (**95**). c) Typische in der Photobiokatalyse genutzte Opferelektronendonoren **98** - **100**. d) Verwandte natürliche (**96a**, Rf) und synthetische (**97a**, RFTA) Flavine. Rf = Riboflavin, FMN = Flavinmononukleotid, FAD = Flavinadenindinukleotid, RFTA = Riboflavin-tetraacetat.

natürlichen redoxaktiven Kofaktoren in Flavoproteinen.^[88] Die Photoredoxeigenschaften der Flavine bestehen in der Absorption des sichtbaren Lichts (λ_{max} 370 und 450 nm) und der Generierung eines angeregten Triplett-Zustandes durch "Intersystem-Crossing" in hoher Quantenausbeute.^[89] Triplett-Zustände besitzen ein hohes Oxidationspotential. Die durch die Photoredoxreaktion freigesetzten Elektronen können beispielsweise genutzt werden, um in einer Entkopplungsreaktion O_2 zu H_2O_2 zu reduzieren (Schema 12a).

Die Anwendung von Flavinen wie z.B. **94a** und anderen Photoredoxmediatoren für die photokatalytische *in situ* Generierung von H_2O_2 in Kombination mit H_2O_2 -abhängigen Enzymen wurde bereits grundlegend etabliert. Die Arbeitsgruppe um Hollmann^[90-92] entwickelte beispielsweise verschiedene Licht-getriebene H_2O_2 -Generierungsmethoden in Kombination mit der Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*, Tabelle 2). Hollmann *et al.*^[92] untersuchten hierbei ein photokatalytisches System, welches auf FMN (**94a**) als Photokatalysator, EDTA (**99**) als Opferelektronendonator und Belichtung mit sichtbarem Licht (Glühbirne mit weißem Licht) aufbaut. Die Oxyfunktionalisierung verschiedener Substrate **101** wurde somit erzielt, wobei Alkylaryle **101d-f** und **101h-j** in der benzylicischen Position hydroxyliert wurden und auch Hydroxylierung von unaktivierten Alkanen **101b** und **101g** realisiert wurde. Überoxidation zu dem entsprechenden Keton wurde erst nach vollständiger Umsetzung des Startmaterials und in geringerer Rate verglichen zur Hydroxylierung beobachtet. Gute Regio-, Chemo- und Enantioselektivität wurde für die benzylicischen Hydroxylierungen unter Bildung von **102d-f** und **102h-i** erzielt (85 - >99% *ee*), wohingegen **102b** und **102j** als Racemate erhalten wurden. Verglichen mit der Zugabe von H_2O_2 in stöchiometrischen Mengen zeigte das photokatalytische System zwar geringere Reaktionsraten, dafür aber eine erhöhte Stabilität von *AaeUPO* über längere Reaktionszeiten. Es wurde eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Gesamtreaktion von der FMN-Konzentration und Lichtintensität festgestellt. Ab einer FMN-Konzentration von ca. 0.05 mM wurde hingegen eine maximale Reaktionsrate beobachtet, was auf eine Geschwindigkeitslimitierung durch die O_2 -Aufnahme in Lösung hindeutet. Alternative Elektronendonoren wie Formiat (**100**) beeinflussten die Enantioselektivität nicht. Im Gegensatz hierzu wurde für CPO-katalysierte, photobiokatalytische Sulfoxidationen ein negativer Einfluss von **100** auf die Enantiospezifität beobachtet, möglicherweise durch Bindung an dem Häm-Fe-Kofaktor.^[93] In Folgestudien^[91] wurde die Oxidation von Methanol durch den heterogenen Katalysator Au-TiO₂ in der Rutilform untersucht (Glühbirne mit weißem Licht). Mit diesem System wurden gute Ausbeuten (68 - >99%) und Enantioselektivitäten (89 - >99% *ee*) erzielt werden. Der heterogene Photokatalysator konnte auch zur Wasserspaltung genutzt werden.^[90] Der Erzeugung von H_2O_2 aus der Wasseroxidation könnten zwei mögliche Mechanismen zu Grunde liegen: entweder die unvollständige Oxidation von Wasser und anschließender Elektronentransfer zum Sauerstoff, oder die direkte zwei-Elektronen-Wasseroxidation. Mithilfe von ¹⁸O-Markierungsexperimenten

Tabelle 2. Photobiokatalytische Hydroxylierungen katalysiert durch *AaeUPO* (Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita*) in Kombination mit verschiedenen Photokatalysatoren und Elektronendonoren.^[90-92]

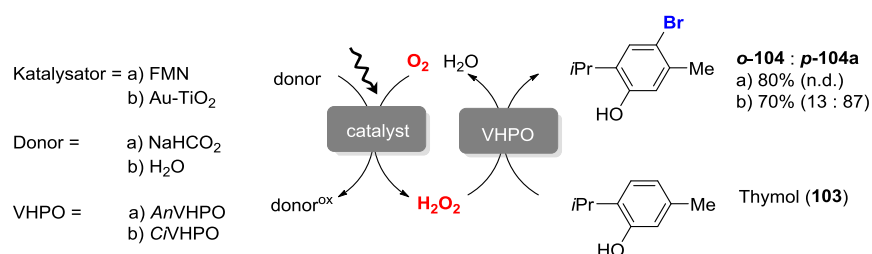


Eintrag	Produkt	Photokatalysator	Donor	TON	Ausbeute [%]	ee [%]
1	102a	Au-TiO ₂	MeOH	43900	92.4	–
2			H ₂ O	30100	45.2	–
3	102b	Au-TiO ₂	MeOH	61500	>99	–
4			H ₂ O	28700	43.1	–
5	102c	Au-TiO ₂	FMN	17900	nd	–
6			EDTA	28600	55.7	–
7	102d	Au-TiO ₂	MeOH	17800	26.7	–
8			H ₂ O	45800	72	>99
9	102e	Au-TiO ₂	MeOH	18800	28.2	>99
10			H ₂ O	6430	nd	93
11	102f	Au-TiO ₂	MeOH	59600	91.2	95
12			H ₂ O	30500	45.8	95
13	102g	Au-TiO ₂	FMN	11500	nd	>99
14			EDTA	53500	83.5	93
15	102h	Au-TiO ₂	MeOH	38800	58.2	75
16			H ₂ O	17520	nd	85
17	102i	Au-TiO ₂	MeOH	17500	67.8	89
18			H ₂ O	3200	4.8	79
19	102j	Au-TiO ₂	FMN	1040	nd	nd
20			EDTA	80000	nd	98
21	102j	FMN	MeOH	30000	nd	>98
22			H ₂ O	11470	nd	>97
23	102j	CND/FMN	H ₂ O	~10000	nd	98
24	102j	FMN	EDTA	17260	nd	90
25	102j	FMN	EDTA	39200	nd	–

Überoxidationsprodukte (entsprechende Ketone) beobachtet, TON = katalytische Produktivität

konnte nachgewiesen werden, dass das enzymatisch genutzte Sauerstoff-Equivalent tatsächlich aus der Wasserspaltung stammt. Infolge der Wasserspaltung werden auch reaktive Sauerstoffspezies gebildet (ROS), die einen deaktivierenden Effekt auf das Enzym ausüben. Dieser Effekt kann durch räumliche Trennung (immobilisiertes Enzym) und die Verwendung der Rutilform des Au-TiO₂ (weniger hydrophile Oberfläche als die Anataseform und somit weniger Adsorption des Enzyms) minimiert werden. Unter Verwendung der licht-getriebenen Wasseroxidation wurden niedrigere Ausbeuten (5 - 58%) als bei der Methanoxidation erhalten. Allgemein ist die Regioselektivität der AaeUPO-katalysierten Hydroxylierungen nicht gut für lineare Alkene (**101e**), da ω-2 wie auch ω-3 Hydroxylierung auftrat. Als Photokatalysator wurden auch Kohlenstoff Nanodots (CND) für die *in situ* H₂O₂ Generierung genutzt (Tabelle 2, Eintrag 22).

Zur Kombination der photokatalytischen *in situ* Erzeugung des Oxidans mit VHPOs existieren bereits einige Vorarbeiten (Schema 13). Erste Experimente^[94] mit FMN (**94a**) als Photokatalysator und AnVHPO (**100** als Opferelektronendonator) zeigten die prinzipielle Kompatibilität. Bis zu 80% Umsatz des Substrats Thymol (**103**) zu den bromierten Produkten **104** wurde nach 70h Belichtung mit einer weißen Glühbirne erreicht. Auch die zuvor genannte Methode der Licht-getriebenen Wasserspaltung durch den heterogenen Au-TiO₂-Photosensitizer^[90] wurde erfolgreich mit der Bromierung von **103** durch CiVHPO gekoppelt (mehr als 70% Umsatz, 70h Belichtung mit einer weißen Glühbirne).



Schema 13. Vorarbeiten zu photobiokatalytischen Halogenierungen katalysiert durch VHPOs.

3 Zielsetzung

Halogenierte Verbindungen sind sowohl als funktionalisierte Schlüsselintermediate in Syntheserouten, wie auch in den Anwendungsgebieten Materialforschung, Pharmazie und Agrochemie von großer Bedeutung. Folglich besteht ein großer Bedarf für die Entwicklung neuartiger regio-, chemo- und stereoselektiver C-X Funktionalisierungsmethoden. Bislang ist die klassische, elektrophile Halogenierung von aromatischen Systemen und Olefinen jedoch trotz ihrer großen Nachteile wie der Verwendung von toxischen Reagenzien, harschen Reaktionsbedingungen und schlechter Chemo- und Regioselektivität, nach wie vor das Mittel der Wahl. Zwar wurden auch oxidative Methoden zur katalytischen Erzeugung des elektrophilen Halogenierungsreagenzes entwickelt, dennoch stellt das Regioselektivitätsproblem hierbei eine große Herausforderung dar. Die Entwicklung katalytischer, milder und selektiver Halogenierungsmethoden steht im Fokus unseres Arbeitskreises. Im Rahmen dieser Dissertation soll das Verständnis der Halogenierungskonzepte der Natur anhand der Untersuchung einer neuartigen Vanadium-abhängigen Haloperoxidase und des Vergleichs mit homologen Enzymen erweitert werden. Um die offenen Fragestellungen nach der generellen Substrat- und Halogenspezifität der VHPOs zu adressieren, sollen Studien zu Struktur-Aktivitäts- wie auch Struktur-Selektivitäts-Beziehungen durchgeführt werden. Überdies können ausgehend von den erzielten Ergebnissen Mutagenesestrategien entwickelt werden, um das Wildtypenzym langfristig mittels gerichteter Evolution zu optimieren und dessen Spezifität zu verändern.

Als neuartige VHPOs wurden mittels BLAST-Suche zwei putative Bromperoxidasen aus dem marinen Cyanobakterium *Acaryochloris marina* mit hoher Sequenzidentität zu bereits charakterisierten VHPOs aus Rotalgen identifiziert. Diese VHPOs besitzen außerdem eine hohe Homologie zu einer zuvor beschriebenen VHPO aus dem Cyanobakterium *Synechoccus* sp. CC9311 (35%/53%, E value $6 e^{-132}/0.0$).^[95] Diese VHPO aus *Synechoccus* sp. wurde jedoch nur bezüglich kinetischer Parameter und nicht hinsichtlich ihrer Substratbreite charakterisiert, somit sind cyanobakterielle VHPOs bis dato noch wenig erforscht.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Ziele für diesen Teil der Dissertation:

- Heterologe Expression und strukturelle Charakterisierung der VHPO aus dem Cyanobakterium *A. marina* (*Am*VHPO, GenBank WP_012165216) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Groll (Dr. Annika Frank, Strukturbiologie)
- Chemische Charakterisierung der *Am*VHPO durch Standard-Assays, Bestimmung der Halogenspezifität sowie Untersuchungen zur Enzymkinetik und operationaler Stabilität
- Ermittlung der Substrat- und Reaktionsbreite von *Am*VHPO in Halogenierungsreaktionen (hetero-)aromatischer Verbindungen
- Ableitung einer Mutagenesestrategie des Wildtyp-Enzyms

Nach erfolgreicher Etablierung der Wildtyp *AmVHPO* sollen auch weitere VHPOs, das homologe Enzym aus *A. marina* (*AmVHPOII*, GenBank WP_012161787), sowie die VCPO aus *C. inaequalis* in die Studien mit einbezogen werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die generelle Optimierung der Reaktionsbedingungen. Dies beinhaltet auch die milde, photochemische *in situ*-Erzeugung des Oxidationsmittels. Die Zugabe von externen Opferelektronendonoren ist hierbei hinsichtlich der Atomökonomie wie auch unerwünschter Interaktion mit dem Enzym, Beeinflussung des pH-Wertes, oder Bildung unerwünschter Nebenprodukte^[96] und Chelatierung von Metallionen (EDTA) nicht wünschenswert. Die zu entwickelnde Methode soll eine generelle Anwendbarkeit für H₂O₂-abhängige Enzyme, wie beispielsweise CYP Enzyme oder Peroxygenasen bieten. Weitere Ziele bestehen außerdem in der Untersuchung des Einflusses der Lichtquelle, um die optimale Anregung des Photokatalysators auszunutzen, und in der Entwicklung eines speziellen Versuchsaufbaus für die Photobiokatalyse.

In diesem Teil der Dissertation werden demnach folgende Ziele verfolgt:

- Entwicklung einer geeigneten atomökonomischen, photochemischen Methode für die *in situ*-Erzeugung und somit langsame Dosierbarkeit von H₂O₂ in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. B. König (Dr. Melanie Hacker und Dr. Antonín Králík, Photochemie)
- Studien zu genauen Mechanismen der photobiokatalytischen Reaktion, sowie Chancen und Limitierungen der Methodik
- Nutzung der VHPOs als "Proof-of-concept"-Katalysatoren in Kombination mit der photokatalytischen H₂O₂-Erzeugung
- Untersuchung der Anwendbarkeit von Rohzell-Lysat als vereinfachte Anwendungsform der VHPOs, sowie der Immobilisierung der *AmVHPO* in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Pohl (Dr. Johannes Döbber)

Um die Studien auf die selektiven VHPOs aus *Streptomyces* sp. zu erweitern, entwickelte sich als weitere Zielsetzung dieser Arbeit, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. B. S. Moore, die beiden Chlorperoxidasen aus dem *mcl*-Biosynthesecluster (Mcl24 und Mcl40) näher zu untersuchen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, VHPOs mit distinkter biologischer Funktion und zum Teil auch bereits nachgewiesener Selektivität mit den cyanobakteriellen VHPOs, deren physiologische Rolle bislang ungeklärt ist, zu vergleichen. Während mehrere faszinierende, biosynthetische Teilschritte auf die Katalyse der VHPO Mcl24 zurückgeführt werden konnten, wurde die Rolle der Mcl40 bislang nur postuliert. Eine bislang nicht erzielte Zugänglichkeit über heterologe Expression verhinderte, die *in vitro* Aktivität der Mcl40 zu zeigen. Die putative Rolle besteht in der Chloretherzyklisierung ausgehend von Merochlorin D (**68**) zum 15-gliedrigen Makrozyklus Merochlorin C (**67**).

Die Zielsetzung dieses Teils der Dissertation besteht in:

- Optimierung der heterologen Expression von *mcl40*
- Untersuchungen zur *in vitro* Aktivität der Mcl40
- weitergehende Studien zu den Rollen der beiden VHPOs Mcl40 und Mcl24 sowie der Methyltransferase Mcl21 in der Biosynthese der Merochlorine C (**67**) und D (**68**)
- Naturstoffisolierung von **67** und **68** aus Kulturen des Produzentenstamms *Streptomyces* CNH-189 als Substrate für enzymatische Assays bzw. Referenzsubstanzen

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel beinhaltet sowohl eine Diskussion publizierter,^[97-98] wie auch unveröffentlichter Inhalte.

4.1 Charakterisierung der neuartigen *Am*VHPO

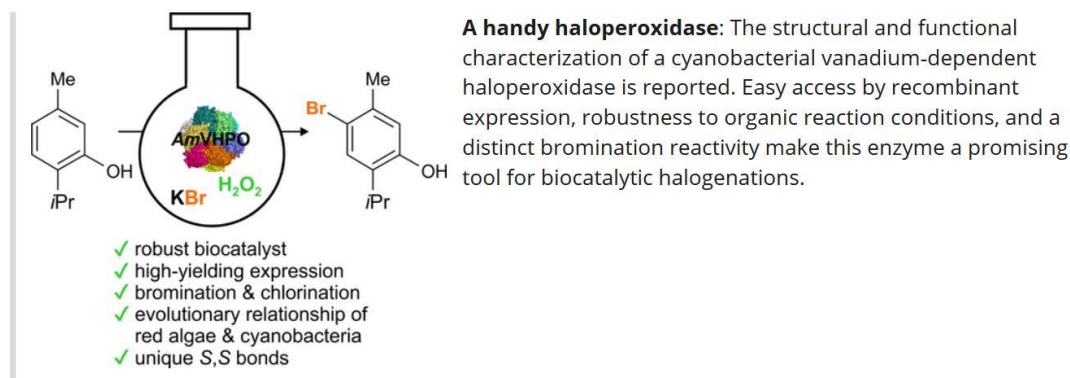
Das folgende Unterkapitel basiert auf der Publikation:

C. J. Seel*, A. Frank*, M. Groll, T. Gulder, Characterization of a Cyanobacterial Haloperoxidase and Evaluation of its Biocatalytic Halogenation Potential, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2028-2032. (*gleichwertiger Beitrag der Autoren)

Characterization of a Cyanobacterial Haloperoxidase and Evaluation of its Biocatalytic Halogenation Potential

Dr. Annika Frank, Catharina Julia Seel, Prof. Dr. Michael Groll, Dr. Tanja Gulder

Pages: 2028-2032 | First Published: 19 August 2016



Die Publikation umfasst die heterologe Produktion einer neuartigen VHPO aus dem Cyanobakterium *A. marina* MBIC11017 (*Am*VHPO), sowie dessen strukturelle und funktionelle Charakterisierung. Hierfür wurde das Codon-optimierte Gen (*amvhp*, Genbank Nummer WP_012165216) in einen pET28-Expressionsvektor kloniert (*N*-terminaler His-Tag gefolgt von einer Protease-Schnittstelle zum Abspalten des Tags). Das rekombinante Enzym wurde in guten löslichen Ausbeuten (bis zu 30 mg pro L Kultur) in *E. coli* erhalten. Zudem wurde die Kristallstruktur des Proteins mit einer Auflösung von 3.1 Å bestimmt. Die Gesamtstruktur des Enzyms zeigt eine starke Ähnlichkeit zu den homologen Enzymen aus Rotalgen (*Ci*VHPO und *Cp*VHPO), welche genau wie *Am*VHPO als Homododekamer vorliegen. Die strukturelle Ähnlichkeit wie auch die hohe Sequenzidentität zu den Bromperoxidasen aus den Rotalgen *C. pilulifera* (47%, E value 0.0)^[99] und *C. officinalis* (47%, E value $3 \cdot 10^{-177}$)^[99] deuten auf eine evolutionäre Verwandtschaft und Endozytose oder einen horizontalen Gentransfer zwischen den Spezies hin. Die dodekamere Struktur von *Am*VHPO wird durch intra- wie auch intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Der Vanadat-Kofaktor im aktiven Zentrum ist in der Kristallstruktur durch das isostere Phosphat ersetzt, welches aus dem Kristallisationspuffer

stammt. Im nächsten Schritt wurde die *in vitro* biokatalytische Aktivität der *Am*VHPO zunächst in qualitativen kolorimetrischen Assays analysiert. Für alle *in vitro* Assays wurde die *apoAm*VHPO mit Vanadat rekonstituiert. In den kolorimetrischen Assays zeigte sich, dass die annotierte Bromperoxidase – wie zu erwarten – eine positive Bromierungs- und Iodierungsaktivität in den Standard-Assays zeigt. Allerdings wurden auch bereits erste Hinweise auf eine schwache Chlorierungsaktivität erhalten. Die Chlorierungsaktivität konnte schließlich anhand von HR-LC-MS Untersuchungen und im Vergleich mit Negativkontrollen (Reaktionsgemische ohne Enzym) eindeutig belegt werden. Eine schwache Chlorierungsaktivität wurde bereits für andere Bromperoxidasen^[42,100] gezeigt und diese Beobachtung wirft interessante Fragen hinsichtlich der Halogenspezifität und der Klassifizierung der VHPOs auf. Für die Anwendung von *Am*VHPO in der präparativen, enzymatischen Chlorierung organischer Substrate ist die intrinsische Chlorierungsaktivität jedoch zu schwach. In weitergehenden quantitativen Studien wurden das pH-Optimum (pH 6.0), kinetische Parameter sowie die operationale Stabilität der *Am*VHPO bestimmt. Hierbei zeigte sich eine bemerkenswerte Robustheit des Enzyms, sowohl gegenüber organischer Co-Solventien wie Ethanol, Acetonitril oder Aceton (Stabilität über mehrere Tage in bis zu 75 vol% des Co-Solvens), als auch Thermostabilität. Letztere wurde für die Aufreinigung des Proteins ausgenutzt, indem in einem Hitzeschritt (65 °C, 30 min) bereits viele Fremdproteine ausgefällt werden konnten und somit die Proteinaufreinigung erleichtert wurde. Die Robustheit liegt vermutlich in der dodekameren Struktur und der zusätzlichen Stabilisierung durch Disulfidbrücken begründet. Des Weiteren wurde die Stabilität gegenüber des Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid untersucht. Hohe H₂O₂-Konzentrationen (100 mM) zeigten hierbei einen inhibitorischen Effekt auf *Am*VHPO, wohingegen für die enzymatische Bromierung organischer Substrate gleicher Umsatz für langsame, wie auch für direkte H₂O₂-Zugabe beobachtet wurde. Möglicherweise ist die Inaktivierung also reversibel. Da bislang keine halogenierten Naturstoffe aus *A. marina* isoliert wurden, ist die physiologische Funktion der VHPO wie auch deren natives Substrat bislang unbekannt. Anders als die verwandten VBPOs aus Rotalgen konnte keine katalytische Aktivität für Bromonium-induzierte Terpenzyklisierungen beobachtet werden. Allerdings wurden elektronenreiche Aromaten erfolgreich bromiert (86 - 96% Umsatz). Somit stellt *Am*VHPO als robuster und leicht zugänglicher Biokatalysator eine interessante Plattform für weiterreichende Studien und gerichtete Evolution dar.

Leistungsbeiträge zur Publikation:

Dr. A. Frank und C. J. Seel haben die Experimente geplant und durchgeführt, wobei Dr. A. Frank die rekombinante Expression und die Kristallisation der *Am*VHPO und C. J. Seel alle *in vitro* Studien mit *Am*VHPO übernommen hat. Prof. Dr. M. Groll und Prof. Dr. T. Gulder konzeptionierten und betreuten das Projekt. Alle Autoren schrieben das Manuskript.

Characterization of a Cyanobacterial Haloperoxidase and Evaluation of its Biocatalytic Halogenation Potential

Annika Frank[†], Catharina Julia Seel[†], Michael Groll, and Tanja Gulder^{*[a]}

Vanadium-dependent haloperoxidases (VHPOs) are a class of halogenating enzymes found in fungi, lichen, algae, and bacteria. We report the cloning, purification, and characterization of a functional VHPO from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* (AmVHPO), including its structure determination by X-ray crystallography. Compared to other VHPOs, the AmVHPO features a unique set of disulfide bonds that stabilize the dodecameric assembly of the protein. Easy access by high-yield recombinant expression, as well as resistance towards organic solvents and temperature, together with a distinct halogenation reactivity, make this enzyme a promising starting point for the development of biocatalytic transformations.

A halogen substituent is often an essential structural feature of natural products, drugs, or signaling molecules and improves their biological properties.^[1] Within the large number of over 5000 halogenated compounds described so far,^[2] the majority contain bromine or chlorine, whereas iodine and fluorine are rare. Nature has evolved exquisite methods to introduce halogen atoms into organic compounds by the use of halogenating enzymes. Among these, the class of vanadium-dependent haloperoxidases (VHPOs) has attracted increasing attention because of the enzymes' biocatalytic properties.^[3,4] These include an unusual stability and tolerance to heat and organic solvents.^[5] An additional advantage is the more flexible substrate scope compared to other halogenating enzymes, such as flavin-dependent halogenases. Some members of the VHPO family, in particular the chloroperoxidases from *Actinomyces* species, even display high regio- and stereoselectivities in their halogenation reactions.^[1c,d,g] VHPOs contain vanadate as a prosthetic group and catalyze the oxidation of halides (Cl⁻, Br⁻, or I⁻)^[6] in the presence of hydrogen peroxide as the oxidant. Over the course of this reaction, a peroxo intermediate is formed (Figure 1). Unlike the heme-dependent haloperoxidases,^[1c,3d-f] the cofactor here is redox-neutral and thus does not suffer from oxidative inactivation during turnover. A classification according to the most electronegative halide they are able to oxidize differentiates between chloroperoxidases (VCPOs), bromoperoxidases (VBPOs), and iodoperoxidases (VIPOs).

[a] Dr. A. Frank,[†] C. J. Seel,[†] Prof. Dr. M. Groll, Dr. T. Gulder
Department Chemie, Center for Integrated Protein Science at the
Department Chemie and Catalysis Research Center (CRC)
Technische Universität München
Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching (Germany)
E-mail: tanja.gulder@tum.de

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article can be found under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201600417>.

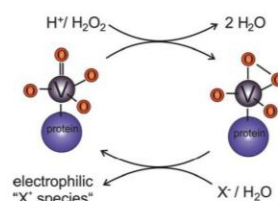


Figure 1. Simplified mechanism of oxidative halogenations catalyzed by VHPOs.

Structural and mechanistic studies of this class of enzymes have been carried out, but there remain unanswered questions regarding the defined substrate binding site or the origin of substrate specificity. The first functional VHPO from a cyanobacterium was recently identified in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. CC9311.^[7] As this VHPO appears to be part of a cluster of horizontally transferred genes, it was postulated that the epiphytic cyanobacterium might have acquired the enzyme from a red seaweed species or vice versa. In view of the significant catalytic potential observed for VBPOs, we decided to focus on a new bacterial member of this family (EC 1.11.X). Our aim was to discover and characterize a prokaryotic alternative to the existing catalysts. In addition to a natural variation in substrate scope and halogenation activities, this may provide a platform for diverse protein engineering efforts and thus an opportunity to establish a new chemoenzymatic halogenation tool in the future.

A BLAST search^[8] using the characterized enzymes from *Corallina* species as a query identified a designated VBPO from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC11017 (AmVHPO) with 47% sequence identity to both *C. pilulifera* and *C. officinalis* and 35% to *Synechococcus* sp. CC9311. After inserting the codon-optimized synthetic gene into a pET28 expression vector, we were able to produce up to 30 mg L⁻¹ of soluble, recombinant protein in an *Escherichia coli* host system. Following affinity and size-exclusion chromatography, the purified VHPO remained stable and active for several weeks.

The enzyme's dodecameric structure was determined to a resolution of 3.1 Å ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 20.7/24.9\%$) by X-ray crystallography, using the *Corallina pilulifera* VBPO coordinates (PDB ID: 1UP8) for Patterson search calculations^[9] (Table 1). Structure analysis with the protein assembly tool PISA^[10] calculated a buried surface area of 3340 Å² for each monomer in the 840 kD protein, which was also in line with retention times observed during size-exclusion chromatography (Figure 2A and Figure S14 in the Supporting Information).

The tertiary and quaternary structure of AmVHPO is dominated by so-called helix bundles (Figure S9). For the algal en-

Table 1. Crystallographic data processing and refinement parameters for AmVHPO.

Crystal parameters	
space group	$F4_32$
cell constants [Å]	$a = 306.2$
subunits/asymmetric unit	1
Data collection	
X-ray source	ESRF, ID23-1
wavelength [Å]	0.972
resolution range [Å] ^[a]	30.0–3.10 (3.20–3.10)
no. observations	84011
no. unique reflections	21760
completeness [%] ^[a]	95.2 (96.9)
R_{merge} [%] ^[a,c]	9.2 (57.2)
$CC_{1/2}$ [%]	99.7 (76.0)
$I/\sigma(I)$ ^[a]	11.2 (2.2)
Refinement (REFMAC5)	
resolution range [Å]	15.0–3.10
no. reflections working set	20672
no. reflections test set	1088
no. non-hydrogen (protein)	4816
no. of ions	1
no. of solvent molecules	0
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ [%] ^[d]	20.7/24.9
rmsd bond lengths/angles [Å]/[$^{\circ}$] ^[e]	0.004/0.909
average B -factor [Å ²]	79.0
Ramachandran plot [%] ^[f]	95.3/4.0/0.7
PDB ID	5LPC

[a] Values in parentheses for resolution range, completeness, R_{merger} and $I/\sigma(I)$ correspond to the last resolution shell. Datasets were collected from a single crystal. [b] Friedel pairs were treated as identical reflections. [c] $R_{\text{merge}}(I) = \sum hkl \sum j |I(hkl)_j - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum j I(hkl)_j$, where $I(hkl)_j$ is the j th measurement of the intensity of reflection hkl , and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity; [d] $R = \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, where R_{free} was calculated without a sigma cutoff for a randomly chosen 5% of reflections, which were not used for structure refinement, and R_{work} was calculated for the remaining reflections. [e] Deviations from ideal bond lengths/angles. [f] Number of residues in favored region/allowed region/outlier region as determined in COOT.

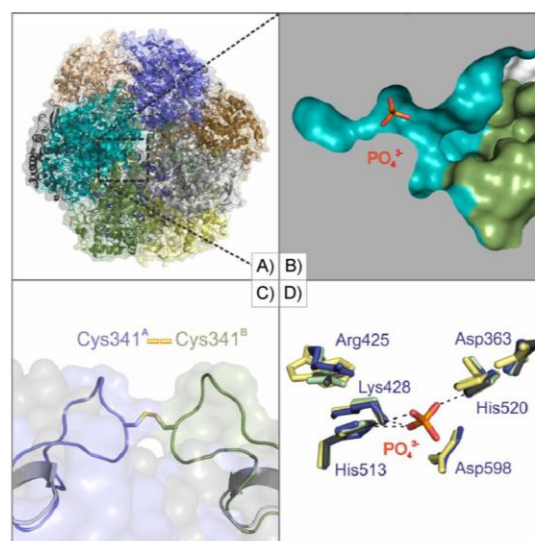


Figure 2. The AmVHPO crystal structure was refined to a resolution of 3.1 Å. A) The single monomer present in the asymmetric unit was predicted to assemble into a native dodecamer. B) The catalytic vanadate (replaced by the isosteric phosphate in the crystal structure) is situated in a small binding pocket to which the neighboring monomers form an access channel. C) An unusual feature of the AmVHPO structure is the presence of intermolecular disulfide bonds between the Cys341 side chains of two neighboring monomers. Superimposition with the *C. officinalis* VHPO (gray) shows the differences in secondary structure required to enable formation of this bond. D) Superimposition of the key catalytic residues in the VHPOs of *A. marina* (blue, labeled), *C. pilulifera* (gray), *C. officinalis* (green), and *A. nodosum* (yellow) reveals a clear structural conservation with the exception of a single tryptophan in the *A. nodosum* active site.

zymes, two bundles of neighboring subunits associate closely and jointly contribute to the wider active site spheres. This arrangement has been implicated in multimerization and is found in dimers of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*, as well as in the dodecamers of *Corallina* species.^[11]

Although helical bundles are present in other eubacterial haloperoxidases, the AmVHPO is, to the best of our knowledge, the first bacterial enzyme showing this particular type of arrangement. A second unexpected feature that stabilizes the monomer, dimer, and, ultimately, the hexamer of dimers, is the presence of intra- and intermolecular disulfide bonds. These occur between Cys206/308 and Cys341 of two neighboring monomers, respectively (Figure 2c, Figure S10), and are likely to contribute to the enzyme's significant tolerance to heat and solvents as described below. On a monomeric level, each subunit consists of a single, compact $\alpha + \beta$ type domain with a short N-terminal helix protruding out of the core peptide. Again, this architecture does not resemble any of the bacterial VHPO structures determined to date but is highly similar to the homologous enzymes from red and brown seaweed species. Structural alignment of AmVHPO with the *C. pilulifera*, *C. officinalis*, and *A. nodosum* VHPOs yields accordingly low

root mean square deviations (RMSDs) of 0.7, 0.6, and 1.1 Å, respectively.

This strong resemblance in folding and multimeric assembly raises interesting questions about their evolutionary relationship. All species share a similar marine environment, and cyanobacteria are frequently found in symbiotic relationships with algal species.^[12] As a result, horizontal gene transfer may have contributed to the distribution of VHPOs, even between different kingdoms. A closer inspection of the phylogenetic tree (Figure S7) shows separate branches for marine and terrestrial VHPO-producing organisms, which further supports this hypothesis. A second possibility is that the cyanobacterial haloperoxidase genes were acquired by algae through an early process of endocytosis.^[13] The latter has been suggested for the evolutionary origin of various plastid types and would account for the observed similarities more convincingly than simple convergent evolution.

Although the protein was crystallized in the presence of excess vanadate, an isosteric phosphate obtained from the reservoir solution replaced the cofactor in the crystal structure. It is bound in a small, defined pocket and protected from solvent by the close assembly of the monomer with its neighboring two subunits. This substructure also forms an access tunnel to

Table 2. Comparison of Michaelis–Menten constants, turnover numbers, and specific activity.

		Br ⁻ [c]	H ₂ O ₂ [c]	K _M [mM] I ⁻ [a]	Cl ⁻ [c]	k _{cat} [s ⁻¹] Br ⁻	A _{spec} [U mg ⁻¹]	k _{cat} K _M ⁻¹ [M ⁻¹ s ⁻¹]
cyano-bacteria	<i>AmVBPO</i>	0.40	0.06	6.40	–	8.4	23.3 (Br) ^[d]	2 × 10 ⁴
	<i>SynVHPO</i> ^[7]	1.50	–	0.02	–	–	0.56 (Br)	
red seaweed	<i>CoVBPO</i> ^[24]	1.00	0.06	–	–	–	470 (Br)	
	<i>rCoVBPO</i> ^[25]	1.20	0.02	1.80	–	–	–	
	<i>CpVBPO</i> ^[11c]	11.0	0.09	–	–	–	26.3 (Br)	
brown algae	<i>AnIVBPO</i> ^[18,26]	3.70	0.06	0.20 ^[b]	344	85	127 (Br) 0.49 (Cl)	2 × 10 ⁴
fungi	<i>EdVCPO</i> ^[27]	0.005	0.06	–	1.20	60	–	–
	<i>CVCPO</i> ^[28]	0.007	0.003	–	0.01	41	7.50 (Cl)	5 × 10 ⁷ ^[28c]

[a] Triiodide assay. [b] Thymolblue assay. [c] Monochlorodimedone (MCD) assay. [d] Highest detected activity. *SynVHPO* = *Synechococcus* sp. PCC 7335; *CoVBPO* = *C. officinalis*; *rCoVBPO* = recombinant *C. officinalis*; *CpVBPO* = *C. pilulifera*; *AnIVBPO* = *A. nodosum*; isoenzyme I; *EdVCPO* = *Embellisia didymospora*; *CVCPO* = *Curvularia inaequalis*.

the cofactor and active site cavity (Figure 2B). Most of the protein's key catalytic residues involved in cofactor binding and coordination of the peroxy intermediate are conserved in their position and orientation within this class of enzymes (Figure 2D).^[9,11,14] Interestingly, if the alignment of the *AmVHPO* active site is extended to homologous structures of the *A. nodosum* VBPO and various known VCPOs, small differences become apparent. These include the presence of an additional histidine residue in VBPOs (phenylalanine in VCPOs) and the substitution of a vanadate-coordinating arginine with a tryptophan, which has been suggested to be involved in halogen specificity (Figures 2D, S8, and S12).^[15] Such comparisons, as well as the substantially higher bromide affinity observed for several VCPOs compared to designated VBPOs (Table 2), hint at a more complex mode of action than suggested by the simple classification into bromo- and chloroperoxidases.

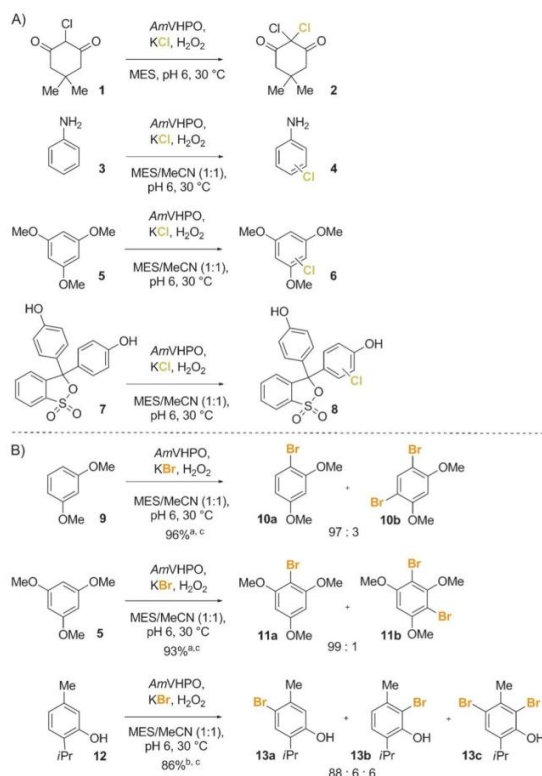
The enzyme was subsequently analyzed with respect to its halogenation potential. As recombinant expression yielded the *AmVHPO apo* form, pre-incubation with K₃VO₄ was necessary to restore its activity prior to enzymatic assays. Colorimetric assays served as a preliminary qualitative proof for halogenating activity.^[3a,16] Optimal turnover was observed at a pH of 6. The kinetics of VHPOs follow a complex bi–bi ping-pong mechanism due to sequential reaction with several substrates, such as H₂O₂ and X⁻.^[17] When using saturating levels of one of the employed substrates, however, enzyme activities could be simplified to pseudo-first order kinetics. As shown in Table 2, the determined kinetic parameters were comparable with those of other VBPOs. In addition to iodination and bromination activities, generally assigned to VBPOs, even the unexpected oxidative chlorination was achieved by *AmVHPO*. It was not surprising that, in the latter case, the detected activity was notably lower than that for the corresponding bromination. Similar findings were described for VBPOs from *A. nodosum*^[18] and *C. pilulifera*.^[19] Because of the high chloride concentration needed to achieve sufficient turnover, the kinetic parameters for chlorination were not determined. In order to confirm that the observed activity indeed stemmed from chlorination and not from bromination, caused, for example, by impurities of the applied KCl or the buffer salts, we conducted ESI MS investigations of the reaction mixture. The chlorinated products **4**,

6, and **8** were unequivocally identified (Scheme 1, see the Supporting Information for details). Although the specificity constant ($k_{\text{cat}}K_{\text{M}}^{-1}$) of fungal VCPOs is much higher for bromination than that of our bacterial halogenating enzyme, the intrinsic ability to catalyze chlorination, combined with all of the other versatile properties exhibited by *AmVHPO* (see below), constitutes a valuable starting point for further protein engineering and investigation of the structure–function relationship.

Remarkably, *AmVHPO* is stable for several days in a number of commonly used organic solvents, such as alcohols, acetonitrile, and acetone, even at concentrations of 75 vol% (Figure S4). In addition, significant thermostability was detected: the activity of the enzyme decreased by 60% after heating to 65 °C for 30 min, but was fully recovered after cooling to 4 °C. In the dimeric *A. nodosum* VHPO, disulfide bonds were suggested to contribute to the enzyme's stability.^[11e] While the same is likely to apply to *AmVHPO*, the effect may be enhanced even further by its dodecameric state. The hexamer of stable dimers increases the percentage of protein interfaces protected from solvent, simply by interactions between neighboring monomers (Figure S11).

VHPOs are commonly inactivated by high H₂O₂ concentrations, but this limitation is generally circumvented by sequential addition of the oxidant.^[20] Initial experiments showed that exposure of *AmVHPO* to high H₂O₂ concentrations (100 mM) for 7 h led to a significant decrease in activity (90%; Figure S5). However, the inactivation appeared to be reversible upon H₂O₂ consumption. This striking feature became evident, as no significant difference in the halogenation activity was observed, regardless of whether the oxidant was added slowly or in one addition.

As no halogenated natural products have been isolated from *A. marina* to date,^[21] we started our investigation with bromocyclizations of terpenes, as this is the preferred reaction of VHPOs originating from *Corallina* species.^[11f] To our surprise, we observed no conversion for these substrates, either in the presence or absence of organic co-solvents. Halogenation of dicarbonyl compounds such as **1** and activated arenes **3–12**, however, proceeded smoothly. Further studies of aromatic bromination showed that monobrominated products **10a** and **11a** were generated with excellent conversions and regioselect-



Scheme 1. AmVHPO-catalyzed aromatic halogenations. ^[a] Determined by HPLC. ^[b] Determined by gas chromatography (GC). ^[c] Conversion calculated from the remaining starting material.

tivities (Scheme 1B). Optimum results were achieved with equimolar amounts of KBr and H₂O₂ at pH 6.^[22] The regioisomeric ratios obtained from the bromination of methoxy arenes **5** and **9** closely resemble those achieved by oxidative brominations simply applying NH₄VO₃ (see the Supporting Information). Nevertheless, the biocatalytic method is still preferable to the abiotic one, as significantly milder conditions are applicable and thus, in principle, a broader substrate range can be addressed. For example, the enzymatic synthesis of **10a** and **11a** proceeds smoothly at pH 6, whereas NH₄VO₃-mediated halogenation requires strongly acidic conditions and is only operative at pH 1. In addition, higher levels of conversion were observed using the enzyme. Interestingly, AmVHPO also worked in a highly chemoselective manner, even allowing differentiation between electron-rich aryl compounds, such as anisole (no conversion) and dimethoxy benzene **9**, a task that is hard to accomplish with standard synthetic halogenation procedures.

The distinct reactivity displayed by AmVHPO is particularly beneficial when employed in late-stage halogenation, for example, of a specific, activated aromatic subunit in a structurally complex target compound. Application of our chemoenzymatic bromination was likewise possible using the monoterpene thymol (**12**). Halogenated thymol derivatives possess antibac-

terial and antifungal properties, making their synthesis valuable for a number of applications in the pharmaceutical industry.^[23] With AmVHPO as a catalyst, *p*-bromothymol (**13a**) was predominantly formed (88% yield), with the *o*-isomer (**13b**) being only a minor product. This result is in clear contrast to the conversion obtained by applying the VBPO from *A. nodosum*,^[4b] and, in this case, rather resembles the unusual product selectivity of fungal VCPOs.^[4a]

In summary, the structural and functional characterization of AmVHPO has revealed an unusually robust biocatalyst that is available in high yield using a recombinant *E. coli* expression system. The structural similarities found between this cyanobacterial haloperoxidase and its eukaryotic homologues show a fascinating evolutionary relationship between VHPOs from two different kingdoms of life. The enzyme's successful bromination of aromatic substrates, as well as its ability to chlorinate, point to a promiscuous substrate tolerance combined with selective halogenation activities. These properties enable protein engineering and evolution strategies so as to improve this catalyst's activity, widen its substrate scope, and contribute to more-selective, sustainable, and environmentally benign halogenations in the future.

Acknowledgements

This work was funded by the Emmy-Noether program of the German Research Foundation (DFG, GU 1134/3-1) and supported by the SFB 749 (A.F. and M.G.). C.J.S. thanks the Deutsche Bundesstiftung Umwelt for a fellowship (grant 20015/400). We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities, and we thank Dr. Bart van Laer for assistance in using beamline ID23-1.

Keywords: enzyme catalysis · halogenation · peroxidases · protein structures · vanadium

- [1] a) G. W. Gribble, *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4044–4136; b) R. Wever, M. A. van der Horst, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 11778–11786; c) A. Butler, M. Sandy, *Nature* **2009**, *460*, 848–854.
- [2] a) G. W. Gribble, *Environ. Chem.* **2015**, *12*, 396–405; b) D. O'Hagan, H. Deng, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 634–649; c) G. W. Gribble, *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 1441–1449; d) G. W. Gribble, *Chemosphere* **2003**, *52*, 289–297; e) C. Wagner, M. El Omari, G. M. König, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 540–553; f) C. Paul, G. Pohnert, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 186–195.
- [3] For recent reviews on halogenations catalyzed by VHPOs, see: a) V. Weichold, D. Milbredt, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **2016**, *55*, 6374–6389; b) D. Wischang, O. Brücher, J. Hartung, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2204–2217; c) J. M. Winter, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18577–18581; d) C. S. Neumann, D. G. Fujimori, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 99–109; e) D. G. Fujimori, C. T. Walsh, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 553–560; f) F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3364–3378.
- [4] For selected recent examples on halogenations catalyzed by VHPOs, see: a) E. Fernández-Fueyo, M. van Wingerden, R. Renirie, R. Wever, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4035–4038; b) F. Sabuzi, E. Churakova, P. Galloni, R. Wever, F. Hollmann, B. Floris, V. Conte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 3519–3525; c) S. Diethelm, R. Teufel, L. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11023–11026; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11203–11206; d) R. Teufel, L. Kaysser, M. T. Villaume, S. Diethelm, M. K. Carbullido, P. S. Baran, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11019–11022; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11199–

- 11202; e) D. Wischang, M. Radlow, J. Hartung, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 11926–11940; f) M. Sandy, J. N. Carter-Franklin, J. D. Martiny, A. Butler, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 12086–12088; g) P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyanaga, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 4268–4270.
- [5] a) J. W. Van Schijndel, P. Barnett, J. Roelse, E. G. Vollenbroek, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225, 151–157; b) M. G. M. Tromp, G. Olafsson, B. E. Krenn, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1040, 192–198; c) E. E. Coupe, M. G. Smyth, A. P. Fosberry, R. M. Hall, J. A. Littlechild, *Protein Expression Purif.* **2007**, 52, 265–272; d) E. de Boer, H. Plat, M. G. Tromp, R. Wever, M. C. Franssen, H. C. van der Plas, E. M. Meijer, H. E. Schoemaker, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, 607–610.
- [6] C–F bond formation cannot proceed through an electrophilic mechanism, as the oxidation of fluoride is thermodynamically disfavored.
- [7] a) T. L. Johnson, B. Palenik, B. Brahamsha, *J. Phycol.* **2011**, 47, 792–801; b) T. L. Johnson, B. Brahamsha, B. Palenik, J. Mühle, *Limnol. Oceanogr.* **2015**, 60, 1823–1835.
- [8] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, 215, 403–410.
- [9] E. Garcia-Rodriguez, T. Ohshiro, T. Aibara, Y. Izumi, J. Littlechild, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, 10, 275–282.
- [10] E. Krissinel, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* **2007**, 372, 774–797.
- [11] a) M. N. Isupov, A. R. Dalby, A. A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G. N. Murchudov, J. A. Littlechild, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 1035–1049; b) N. Itoh, Y. Izumi, H. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 11982–11987; c) N. Itoh, Y. Izumi, H. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 5194–5200; d) C. Leblanc, H. Vilter, J. B. Fournier, L. Delage, P. Potin, E. Rebuffet, G. Michel, P. L. Solari, M. C. Feiters, M. Czjzek, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 301–302, 134–146; e) M. Weyand, H. J. Hecht, M. Kieß, M. F. Liaud, H. Vilter, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 595–611; f) J. N. Carter-Franklin, J. D. Parrish, R. A. Tschirret-Guth, R. D. Little, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3688–3689.
- [12] H. Miyashita, H. Ikemoto, N. Kurano, K. Adachi, M. Chihara, S. Miyachi, *Nature* **1996**, 383, 402–402.
- [13] T. Cavalier-Smith, *Biol. J. Linn. Soc.* **1982**, 17, 289–306.
- [14] A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 392–396.
- [15] Z. Hasan, R. Renirie, R. Kerkman, H. J. Ruijsenaars, A. F. Hartog, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 9738–9744.
- [16] a) L. P. Hager, D. R. Morris, F. S. Brown, H. Eberwein, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1769–1777; b) F. Björkstén, *Eur. J. Biochem.* **1968**, 5, 133–142.
- [17] a) E. de Boer, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 12326–12332; b) R. R. Everett, H. S. Soedjak, A. Butler, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15671–15679.
- [18] H. S. Soedjak, A. Butler, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 5015–5017.
- [19] T. Ohshiro, W. Hemrika, T. Aibara, R. Wever, Y. Izumi, *Phytochemistry* **2002**, 60, 595–601.
- [20] a) G. E. Meister Winter, A. Butler, *Biochemistry* **1996**, 35, 11805–11811; b) H. S. Soedjak, J. V. Walker, A. Butler, *Biochemistry* **1995**, 34, 12689–12696.
- [21] Although, to our knowledge, no halogenated secondary metabolites have previously been isolated from *A. marina*, cyanobacteria are responsible for the production of significant amounts of bromoform and similar brominated compounds in the ocean. As an example, see ref. [1b].
- [22] No reaction was observed if AmVHPO, KBr, or H₂O₂ was omitted.
- [23] R. Kaur, M. P. Darokar, S. K. Chattopadhyay, V. Krishna, A. Ahmad, *Med. Chem. Res.* **2014**, 23, 2212–2217.
- [24] D. J. Sheffield, T. Harry, A. J. Smith, L. J. Rogers, *Phytochemistry* **1992**, 32, 21–26.
- [25] J. N. Carter, K. E. Beatty, M. T. Simpson, A. Butler, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 91, 59–69.
- [26] a) E. Verhaeghe, D. Buisson, E. Zekri, C. Leblanc, P. Potin, Y. Ambroise, *Anal. Biochem.* **2008**, 379, 60–65; b) D. Wischang, J. Hartung, *Tetraedron* **2011**, 67, 4048–4054.
- [27] P. Barnett, W. Hemrika, H. L. Dekker, A. O. Muijsers, R. Renirie, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 23381–23387.
- [28] a) T.-N. Ernie Liu, T. M'Timkulu, J. Geigert, B. Wolf, S. L. Neidleman, D. Silva, J. C. Hunter-Cevera, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 142, 329–333; b) J. W. van Schijndel, E. G. Vollenbroek, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1161, 249–256; c) W. Hemrika, R. Renirie, S. Macedo-Ribeiro, A. Messerschmidt, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 23820–23827; d) N. Tanaka, Z. Hasan, R. Wever, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, 356, 288–296.

Manuscript received: July 29, 2016

Accepted article published: August 19, 2016

Final article published: September 22, 2016

4.2 Kombination der VHPOs mit photokatalytischer, atomökonomischer *in situ* Erzeugung von H_2O_2

Das folgende Unterkapitel basiert auf der Publikation:

C. J. Seel, A. Králík, M. Hacker, A. Frank, B. König, T. Gulder, Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 3960-3963.

Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations

Catharina Julia Seel, Antonín Králík, Melanie Hacker, Annika Frank, Burkhard König, Tanja Gulder

Pages: 3960-3963 | First Published: 25 June 2018

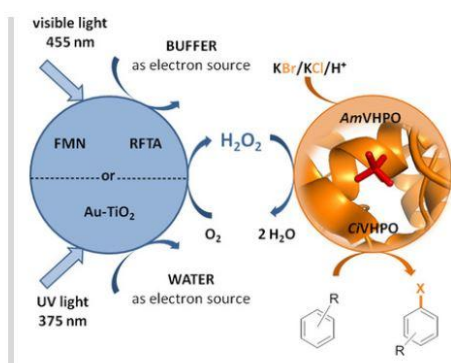


Photo meets bio: Photobiocatalysis constitutes an elegant way to overcome the pending problem of cofactor inactivation in peroxidase catalyzed transformations. In this context, the utility of redox-active buffers or even water alone as efficient, biocompatible electron sources has been demonstrated by combining photocatalytic *in situ* H_2O_2 generation with enzymatic halogenations.

Im Fokus dieser Publikation steht die Entwicklung einer generell anwendbaren, milden und atomökonomischen photokatalytischen Methode zur langsamen *in situ* Bereitstellung des Oxidationsmittels für H_2O_2 -abhängige Enzyme. Viele dieser Enzyme, beispielsweise Peroxygenasen oder P450-Enzyme weisen eine ausgeprägte Instabilität gegenüber H_2O_2 auf, die bei diesen Enzymklassen auf eine oxidative Inaktivierung des Häm-Fe-Kofaktors zurückzuführen ist. Auch für VHPOs wurde eine Inaktivierung durch H_2O_2 berichtet.^[83-84] Im Falle der AmVHPO scheint diese Inaktivierung reversibel zu sein, dennoch ist die Entwicklung einer *in situ* Generierungsmethode im Hinblick einer Weiterentwicklung für Substratumsetzungen im präparativen Maßstab auch für AmVHPO lohnenswert. Bei der Maßstabsvergrößerung werden die Umsetzungen in möglichst hoher Konzentration durchgeführt und hierbei käme der Inaktivierungseffekt durch H_2O_2 vermutlich wieder zum Tragen. Als Photokatalysatoren für diesen photobiokatalytischen Ansatz wurden FMN (**94a**) und der heterogene Katalysator Au-TiO₂ gewählt. Bislang beschriebene Verfahren für die photokatalytische *in situ* Generierung von H_2O_2 durch die Anregung von FMN mit sichtbarem Licht nutzten externe Opferelektronendonoren wie EDTA (**99**) oder Formiat (**100**). Abgesehen von schlechter Atomökonomie bringt die Zugabe externer Elektronendonoren generell weitere Nachteile mit sich. Diese bestehen z.B. in einer möglichen Inkompatibilität mit dem Enzym, Generierung von Nebenprodukten oder der Notwendigkeit der Trennung von den Reaktionsprodukten. Somit bestand das Ziel der vorliegenden Publikation darin, externe Opferelektronendonoren zu vermeiden. Stattdessen wurden der ohnehin für die Durchführung der enzymatischen Reaktion – und zur Aufrecht-

erhaltung eines konstanten pH-Wertes – unerlässliche Puffer, sowie Wasser als Elektronenquelle genutzt. Überdies wurde der Einfluss der Lichtquelle genau untersucht und es wurden optimal auf das Absorptionsmaximum des jeweiligen Photokatalysators abgestimmte LEDs verwendet statt des zuvor in der Literatur häufig beschriebenen Einsatzes einer Breitbandemissions-Lichtquelle (Glühbirne mit weißem Licht). Verschiedene redox-aktive Puffer wie MES, MOPS oder Tris eigneten sich als intrinsische Elektronendonoren (Oxidation der tertiären Aminfunktionalität). Die Anregung des Flavin-Photokatalysators erfolgte mit blauen LEDs ($\lambda_{\text{max}} = 455 \text{ nm}$). Sowohl FMN (**94a**), als auch RFTA (**97a**) waren prinzipiell für die *in situ* H₂O₂-Erzeugung in Puffersystemen anwendbar, allerdings zeigte sich **94a** aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften – und somit besseren Abtrennbarkeit von den hydrophoben organischen Produkten – als vorteilhaft. Kinetische Messungen der FMN-katalysierten H₂O₂-Erzeugung in MES-Puffer zeigten eine sehr schnelle Bildung des H₂O₂ (Plateaukonzentration wurde bereits nach 10 min erreicht). Dies deutet darauf hin, dass bei gezielter Belichtung am Absorptionsmaximum nicht die Konzentration des Photokatalysators, sondern die Intensität der Lichtquelle geschwindigkeitsbestimmend ist. In Kombination mit *Am*VHPO wurde bereits mit sehr geringer Katalysatorbeladung (0.5 mol% FMN) und Pufferkonzentration (25 mM) die erfolgreiche Bromierung diverser (hetero-) aromatischer Substrate realisiert, ohne den pH-Wert der Reaktionslösung zu verändern. *Am*VHPO zeigte hierbei keine ausgeprägte Regioselektivität, sondern in den meisten Fällen die zu erwartende Produktverteilung der klassischen S_EAr. In Abwesenheit von Enzym oder Licht fand keine Reaktion statt, wohingegen in einigen Fällen selbst in Abwesenheit von **94a** eine geringe Umsetzung zum bromierten Produkt zu beobachten war. Diese photokatalytische Nebenreaktion könnte auf eine H₂O₂-Generierung durch Auto-Oxidation der elektronenreichen Substrate zurückzuführen sein. Bei höherer Katalysatorbeladung wurde eine Inaktivierung des Enzyms durch den angeregten Zustand von FMN beobachtet (Verlinkung oxidativ anfälliger Seitenketten wie Cys, His oder Tyr). Eine weitere Limitierung bestand in der Nebenreaktion des angeregten Triplett-Zustandes des FMN unter oxidativer Zersetzung einiger elektronenreicher Substrate. In diesen Fällen konnte die Zersetzung durch ein speziell angepasstes Protokoll zur photochemischen Vorgenerierung von H₂O₂ umgangen werden. Das photobiokatalytische Konzept konnte gleichermaßen in Kombination mit lyophilisiertem Zell-Lysat aus heterologer Expression von *amvhp*, mit dem Isoenzym *Am*VHPOII, wie auch für die Chlorierung organischer Substrate durch *Ci*VHPO etabliert werden. Überdies war auch die photokatalytische Wasserspaltung mittels Au-TiO₂ mit der *Am*VHPO-Biokatalyse kompatibel. Anders als zuvor beschrieben^[90] zeigten unsere Studien jedoch, dass es sich bei Au-TiO₂ nicht um einen Photokatalysator handelt, der durch sichtbares Licht, sondern durch UV-Licht angeregt wird. Durch gezielte Anregung (375 nm LEDs) kann auch hierbei die Effizienz des Systems im Vergleich zu einer Breitbandemissions-Lichtquelle deutlich verbessert werden. Unsere Untersuchungen deuten mechanistisch auf eine zwei-

Elektronen Wasseroxidation und eine zwei-Elektronen Sauerstoffreduktion hin. Die Generierung von H_2O_2 verläuft für Au-TiO_2 langsamer im Vergleich zur Flavino-Photoredoxkatalyse und bietet daher eine schonendere Methode für besonders empfindliche Peroxidasen und Peroxygenasen.

Leistungsbeiträge zur Publikation:

C. J. Seel, Dr. A. Králík und Dr. M. Hacker haben die Experimente geplant und durchgeführt, wobei C. J. Seel die rekombinante Produktion der VHPOs, Optimierung der photobio-katalytischen Reaktionsbedingungen und Durchführung der FMN-Photobiokatalyse übernommen hat. Dr. A. Frank hat sich an der rekombinanten Produktion der VHPOs beteiligt. Prof. Dr. B. König und Prof. Dr. T. Gulder konzeptionierten und betreuten das Projekt. C. J. Seel, Dr. A. Králík, Prof. Dr. B. König und Prof. Dr. T. Gulder schrieben das Manuskript.

Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations

Catharina Julia Seel,^[a] Antonín Králík,^[b] Melanie Hacker,^[b] Annika Frank,^[c] Burkhard König,^{*,[b]} and Tanja Gulder^{*,[a]}

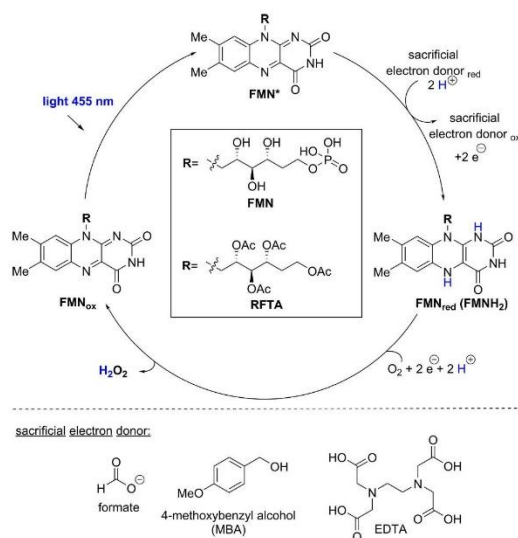
In vitro cofactor supply and regeneration have been a major obstacle for biocatalytic processes, in particular on a large scale. Peroxidases often suffer from inactivation by their oxidative cofactor. Combining photocatalysis and biocatalysis offers an innovative solution to this problem, but lacks atom economy due to the sacrificial electron donors needed. Herein, we show that redox-active buffers or even water alone can serve as efficient, biocompatible electron sources, when combined with photocatalysis. Mechanistic investigations revealed first insights into the possibilities and limitations of this approach and allowed adjusting the reaction conditions to the specific needs of biocatalytic transformations. Proof-of-concept for the applicability of this photobiocatalytic reaction setup was given by enzymatic halogenations.

Biocatalysts are playing a key role in establishing environmentally friendly processes, as they offer high and often unique reactivities and selectivities under mild reaction conditions. Peroxidases (EC 1.11.1x) are a class of antioxidant enzymes ubiquitous in Nature. They catalyze a plethora of interesting transformations, like e.g., C,H-oxidations and halogenations, by making use of cellular hydrogen peroxide rather than utilizing complicated electron delivery chains via nicotinamide cofactors.^[1] Their sensitivity towards the inevitable oxidant is a key limitation for their broad application. Heme-dependent peroxidases, in particular, suffer from irreversible oxidative inactivation of the prosthetic group by H₂O₂. Keeping the H₂O₂ level low during the whole reaction is thus crucial for *in vitro* biocatalytic processes.^[2] Various methods providing continuous oxidant supply have been developed to overcome this drawback, such as slow dosage of hydrogen peroxide via a syringe pump^[3] or a H₂O₂-stat.^[4] Additionally, *in situ* H₂O₂-delivery systems were studied: electrochemical generation of H₂O₂,^[5] Pd/H₂ in supercritical CO₂,^[6] or biocatalytic formation by

glucose oxidase (GOx).^[7] The drawbacks of these procedures reach from low atom economy to simply being not practical, in particular on preparative scale.

One innovative approach to acquire the electrons needed by the redox enzymes is photocatalysis.^[8] The photocatalyst, like, e.g., flavin mononucleotide (FMN),^[9] is excited to FMN* by blue light followed by its reduction to FMNH₂ at the expense of an electron donor. FMNH₂ is then re-oxidized by atmospheric O₂ to form H₂O₂ (Scheme 1). This continuous, light-driven process guarantees a constant, but low hydrogen peroxide concentration in solution and thus renders its combination with biocatalytic processes ideal, especially if oxidation sensitive enzymes are involved. The sacrificial electron donor, however, can constitute an obstacle in this photobiocatalytic setup, as commonly employed reductants, such as EDTA, formates, or 4-methoxybenzyl alcohol, may suffer e.g. from incompatibility with the enzyme and cumbersome separation from the products.^[10]

However, intrigued by the advantages offered by this photobiocatalytic concept,^[11] we started to evaluate alternative and more environmentally benign electron sources. We first turned our attention on employing buffers as possible reductants. As enzymatic transformations intrinsically require buffered solutions,



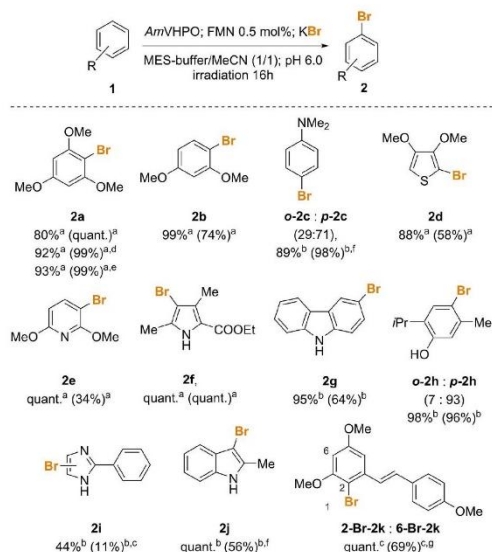
Scheme 1. General mechanism of visible-light promoted electron transfer employing flavin-derived redox mediators.

[a] C. J. Seel, T. Gulder
Department of Chemistry and Catalysis Research Center (CRC), Technical University Munich, Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching (Germany)
E-mail: tanja.gulder@tum.de

[b] A. Králík, M. Hacker, B. König
Institute of Organic Chemistry, University of Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Germany)
E-mail: Burkhard.Koenig@chemie.uni-regensburg.de

[c] A. Frank
Department of Chemistry, Center for Integrated Protein Science, Technical University Munich, Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cctc.201800886>



Scheme 2. Photobiocatalytic aromatic bromination using AmVHPO. Reactions were carried out using 7.43 mM substrate, 0.5 mol% FMN, 3.77 μ M AmVHPO, 188 μ M Na₂VO₄, 100 mM MES (pH 6.0), and 8.13 mM KBr at rt under irradiation (455 nm). Yields are based on recovered starting material and have been determined by ¹HPLC, ¹³C, or ¹NMR using dodecane, toluene or phenol as internal standard. Conversions (shown in brackets) and ratios of isomers were determined by ¹HPLC, ¹³C, or ¹NMR using dodecane, toluene or phenol as internal standard. ^a50 mM MES buffer was used. ^b25 mM MES buffer was used. ^c15 mol% FMN (15 min irradiation), additional 15 mol% FMN (15 min irradiation) followed by addition of **1** and enzyme. ^dPartial isomerization of the double bond was observed upon irradiation.

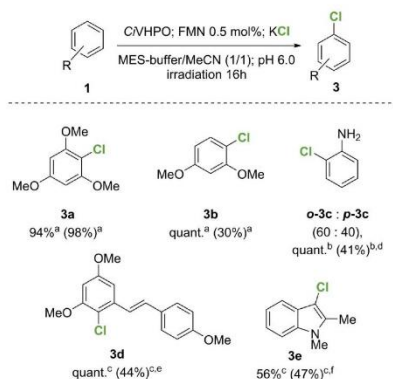
to adjust and maintain a distinct pH value at which the enzyme is operating, these buffer components are always present in any biocatalytic reaction mixtures. Employing any other, external electron donors besides the buffer salt or the solvent, however, constitutes always an 'extra', (over)stoichiometric additive to the reaction mixture. While screening different redox-active buffers, we observed that those containing tertiary amines,^[12] such as MOPS, MES, HEPES and Tris, gave the best results as electron donors for the photocatalytic production of H₂O₂ in our system (see SI). Both FMN and RFTA worked with equal success, but the hydrophilic nature of FMN makes its application more convenient. Kinetic experiments (see Figure 2) revealed that the H₂O₂ production catalyzed by FMN using MES buffer as an electron source is very fast and reaches a plateau at 2 mM H₂O₂ after 10 min, possibly due to an equilibrium between newly generated and decaying hydrogen peroxide. For irradiation at the absorption maximum of FMN (455 nm, blue LEDs), we did not observe any impact of the FMN loading on the O₂-consumption rate (see SI), indicating that the energy output of the light source rather than the catalyst loading determines the H₂O₂ generation rate, at least at the FMN concentrations tested here (37 μ M–2 mM, see SI). Consequently, the light intensity can be used to control the H₂O₂ release and thus to fine tune the oxidative conditions depending on the H₂O₂ sensitivity of the enzyme.

We next turned our focus on combining this H₂O₂-generating system with enzymatic halogenations. For these photobiocatalytic studies we picked the vanadium-dependent haloperoxidase (VHPO) AmVHPO from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017.^[13] AmVHPO shows a remarkable robustness towards organic solvents and heat together with a broad substrate scope for aromatic bromination. Nevertheless, sensitivity to high H₂O₂ concentrations, as already reported for many VHPOs,^[14] was also observed for AmVHPO and thus makes it the perfect model enzyme to evaluate photobiocatalytic halogenations.

Very low catalyst loadings of 0.5 mol% and buffer concentrations as low as 25 mM turned out to be sufficient for achieving halogenations of a manifold of different electron-rich (hetero) aromatic compounds **1** in MES buffer (Scheme 2 and for details SI) without any change in the pH during the course of the reaction. No conversion of **1** was observed if the reaction was conducted in the dark or in the absence of enzyme and of FMN.^[15] Lyophilized cell lysate of AmVHPO, constituting a more time-efficient alternative to the purified enzyme, and the more reactive isoenzyme AmVHPO II (cf. SI) were likewise applicable under these conditions without any loss in reactivity. The enzyme's activity was not affected by 0.5 mol% FMN or irradiation itself,^[16] but inactivation became a critical factor at higher FMN concentrations (cf. SI). Interaction of excited FMN* with highly electron-rich substrates **1**, however, was detectable even at such low catalyst concentrations (see SI), resulting in oxidative degradation of highly activated compounds such as **1c**, **1i** and **1j**. To overcome this limitation, we slightly varied our protocol and pre-generated H₂O₂ prior to the addition of the substrate. This procedure resulted in good conversions of oxidation-sensitive molecules and avoided substrate or product decomposition.

The method was further advanced by evaluating its application in aromatic chlorinations, which are generally more difficult to achieve than the corresponding brominations.^[17] Here, the fungal VHPO from *Curvularia inaequalis* (CfVHPO)^[18] was employed as it offers a higher oxidation potential compared to AmVHPO. By simply changing the added halide salt from KBr to KCl the desired chlorination of activated arenes was likewise possible, albeit, as expected, in lower chemical yields (Scheme 3). It is noteworthy that the regioselectivity for **3c** with predominant *ortho*-substitution differs from that observed during the enzymatic bromination (see Scheme 2), hinting at a mechanism involving an *N*-chlorination followed by intramolecular transfer of the chloro atom to the *ortho* position.

Although the use of buffer components as an electron source is convenient, since the presence of buffer is necessary due to the requirements of the enzymatic reaction, the ultimate goal of sustainable chemistry is utilizing water to provide redox equivalents.^[19,20] During our studies, a method for heterogeneous photocatalytic H₂O₂ evolution from methanol^[19] and water^[22] oxidation in the presence of air using TiO₂ doped with gold nanoparticles^[23] was reported. We thus set out to evaluate the activity of this catalyst more closely (for details see SI). For these studies, TiO₂ was used in its rutile form, which makes the photocatalyst more enzyme-compatible due to its hydrophobic properties preventing hydrophilic enzymes from adsorption to



Scheme 3. Photobiocatalytic aromatic chlorinations using C/VHPO. Reactions were carried out using 7.43 mM substrate, 0.5 mol% FMN, 1.60 μM C/VHPO, 188 μM Na_3VO_4 , 100 mM MES (pH 5.0) and 8.13 mM KCl at rt under irradiation (455 nm). Yields are based on recovered starting material and have been determined by $^1\text{HPLC}$, ^{13}C , or ^{15}NMR using dodecane, toluene or phenol as internal standard. Conversions (shown in brackets) and ratios of isomers were determined by $^1\text{HPLC}$, ^{13}C , or ^{15}NMR using dodecane, toluene or phenol as internal standard. $^{\text{a}}$ 15 mol% FMN (15 min irradiation), additional 15 mol% FMN (15 min irradiation) followed by addition of 1 and enzyme. $^{\text{b}}$ Isomerization of the product was observed upon irradiation. $^{\text{c}}$ Decomposition of the product occurred during NMR measurement.

the TiO_2 surface. This spatial separation might protect the enzyme from highly reactive – but short-lived – hydroxyl radicals formed by titanium dioxide in aerated aqueous solution upon irradiation.^[22] We first investigated the ability of Au- TiO_2 to generate H_2O_2 via water oxidation under irradiation with different narrow-emission-band light sources, in particular, UV-A (375 nm), blue (455 nm), green (535 nm), and white (as a visible-light-only, broad-emission source) LEDs. Although Au- TiO_2 was previously described as a visible-light photocatalyst,^[22]

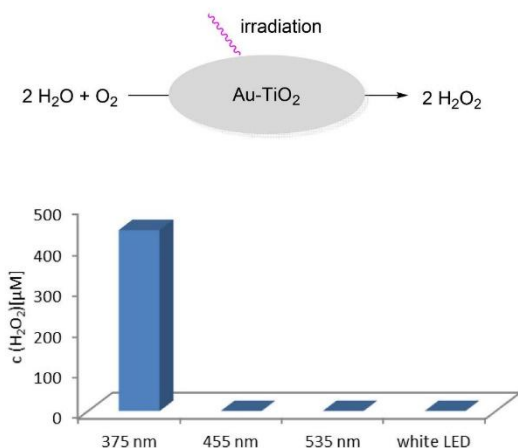
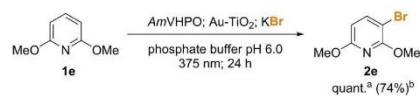


Figure 1. Schematic depiction of the photocatalytic generation of H_2O_2 using gold-nanoparticle-doped TiO_2 as a photocatalyst and concentration of hydrogen peroxide after irradiation (1 h) of an Au- TiO_2 suspension in pure water using different light sources.



Scheme 4. Application of the photocatalytic Au- TiO_2 -mediated generation of H_2O_2 with an AmVHPO-catalyzed bromination. $^{\text{a}}$ Yield is based on recovered starting material and has been determined by HPLC chromatography using an internal standard. $^{\text{b}}$ Conversion and ratio of isomers were determined by HPLC chromatography using an internal standard.

hydrogen peroxide evolution exclusively occurred at 375 nm UV irradiation in our hands (Figure 1).

When a degassed suspension of Au- TiO_2 in water was irradiated under N_2 atmosphere, only traces of H_2O_2 and no oxygen were detected in the solution and the gas phase, respectively. AmVHPO-mediated bromination of **1e** showed only low conversion (4%), when performed under an inert atmosphere (cf. SI). These observations correspond to a two-electron water oxidation and a two-electron oxygen reduction taking place under the given conditions.

Kinetic measurements of the catalyst's activity showed a similar profile of H_2O_2 generation as the FMN-containing system within the first 240 s (Figure 2, black). Upon further irradiation the Au- TiO_2 -based system reached a plateau^[24] with an equilibrium concentration of H_2O_2 3–4 times lower than that observed for FMN (ca. 600 μM). This heterogeneous water-splitting system is thus a milder source of *in situ*-generated hydrogen peroxide, which can be favorable for more sensitive biocatalysts than AmVHPO and C/VHPO.

In situ hydrogen-peroxide evolution using Au- TiO_2 under irradiation at 375 nm was then successfully applied to a bromination of 2,6-dimethoxybenzidine (**1e**) catalyzed by AmVHPO reaching results superior to the above mentioned flavin systems (Scheme 4). This shows a clear advantage of a milder source of H_2O_2 in an enzymatic reaction. For this reaction, non-oxidizable phosphate buffer was used to ensure that water is the sole source of electrons. The results of the control reactions (see SI) show a vital role of all reaction elements – light, photocatalyst, oxygen, and enzyme. It is also worth mentioning that the enzyme keeps its activity even in the presence of phosphate (10 mM), which is an inhibitor^[25] of VHPOs due to its isosteric nature to the crucial

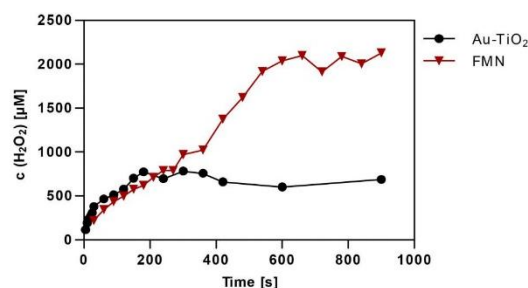


Figure 2. Kinetic of the H_2O_2 evolution by FMN in a MES-buffered solution and Au- TiO_2 in pure distilled water under standard conditions. H_2O_2 concentration was determined by horseradish peroxidase assay.

vanadate present in the active center of these enzymes. Moreover, the tolerance of UV light underlines the high robustness of this class of enzymes and makes it thus ideally suited for the use in photobiocatalysis.

In summary, we have shown that combining photocatalysis with biocatalysis represents a mild and environmentally benign approach to overcome the pending problem of supplying oxidative enzymes with their redox equivalents. The previously used, wasteful and thus far from ideal sacrificial electron donors, have been replaced by either redox-active buffers or even water itself, both ubiquitously present in enzymatic reactions. These *in-situ* H₂O₂-delivering setups stand out due to their practicability by simply utilizing light with the help of low-concentrated organic or heterogenous metal photocatalysts. Proof of concept towards the applicability of the buffer/FMN/visible light as well as the water/Au-TiO₂/UVA approach was given by establishing efficient photobiocatalytic halogenations using AmVHPO and CVHPO as convenient model enzymes. Both photochemical methods proved to be beneficial for sustaining halogenation activity over several hours. The described methods for oxidative H₂O₂ generation, however, are neither limited to (aromatic) halogenations nor to the VHPO class of enzymes. Having now a robust and biocompatible method in hands, expansion of this versatile principle to different transformations by utilizing even more delicate oxidation enzymes is currently conducted in our laboratories.

Acknowledgements

This work was funded by the Emmy-Noether (DFG, GU 1134-3) and Heisenberg (DFG, GU 1134-4) program of the German Research Foundation (DFG), the cluster of excellence CiPSM and the BMBF (FKZ 031B0111A). C.J.S. thanks the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (grant 20015/400) and A.K. the Fonds der Chemischen Industrie for a PhD fellowship. We acknowledge Prof. Dr. Kathrin Castiglione for providing genomic DNA of *A. marina* and Prof. Dr. M. Groll for technical support and advice.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: Biocatalysis · Photocatalysis · Water splitting · Sustainable Chemistry · Halogenation

- [1] D. J. Leak, R. A. Sheldon, J. M. Woodley, P. Adlercreutz, *Biocatal. Biotransform.* **2009**, *27*, 1–26.
 [2] B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 555–565.
 [3] A. Tuynman, M. K. S. Vink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 906–913.

- [4] M. P. J. Van Deurzen, K. Seelbach, F. van Rantwijk, U. Kragl, R. A. Sheldon, *Biocatal. Biotransform.* **1997**, *15*, 1–16.
 [5] K. Lee, S.-H. Moon, *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 261–268.
 [6] S. K. Karmee, C. Roosen, C. Kohlmann, S. Lütz, L. Greiner, W. Leitner, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1052–1055.
 [7] K. Okrasa, E. Guibé -Jampel, M. Therisod, *J. Chem. Soc.* **2000**, 1077–1079.
 [8] a) S. H. Lee, D. S. Choi, S. K. Kuk, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7958–7985.; b) J. A. Maciá-Agulló, A. Corma, H. Garcia, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10940–10959.
 [9] D. I. Perez, M. M. Grau, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2009**, 6848–6850.
 [10] For a more detailed discussion on the advantages and disadvantages of additive sacrificial electron donors please see ref. 8a.
 [11] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22.
 [12] Tertiary amines, such as EDTA and TEOA, have already been proven to be efficient sacrificial electron donors in photobiocatalysis. For an overview on most divers examples see ref. 8a.
 [13] A. Frank, C. J. Seel, M. Groll, T. Gulder, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2028–2032.
 [14] a) G. E. Meister Winter, A. Butler, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11805–11811; b) H. S. Soedjak, J. V. Walker, A. Butler, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12689–12696.
 [15] For **1a** halogenation was observed to some extent even in the absence of FMN suggesting a photocatalytic background reaction. Control experiments revealed that H₂O₂ is generated by a direct auto-oxidation of the electron-rich substrate **1a** (see SI for details).
 [16] a) Photochemically excited FMN can promote crosslinking of photosensitive side chains, such as Cys, His, Trp, or Tyr, in proteins. For examples see SI and D. Bhattacharya, S. Basu, P. C. Mandal, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, *47*, 173–180; b) J. D. Spikes, H.-R. Shen, P. Kopečková, J. Kopeček, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 130–137.
 [17] T. Hering, B. Mühlendorf, R. Wolf, B. König, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5342–5345; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5428–5431.
 [18] a) For previous examples on CVHPO being used in organic synthesis see: E. Fernández-Fueyo, M. van Wingerden, R. Renirie, R. Wever, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4035–4038; b) J. J. Dong, E. Fernández-Fueyo, J. Li, Z. Guo, R. Renirie, R. Wever, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 6207–6210; c) E. Fernández-Fueyo, S. H. H. Younes, S. v. Rootselaar, R. W. M. Aben, R. Renirie, R. Wever, D. Holtmann, F. P. J. T. Rutjes, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 5904–5907; d) H. B. ten Brink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker, R. Wever, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 91–98; e) H. B. ten Brink, A. Tuynman, H. L. Dekker, W. Hemrika, Y. Izumi, T. Oshiro, H. E. Schoemaker, R. Wever, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6780–6784.
 [19] M. Mifsud, S. Gargiulo, S. Iborra, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, A. Corma, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3145.
 [20] M. Teranishi, R. Hoshino, S.-I. Naya, H. Tada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12773–12777; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 12965–12969.
 [21] a) Y. Ni, E. Fernández-Fueyo, A. Gomez Baraibar, R. Ullrich, M. Hofrichter, H. Yanase, M. Alcalde, W. J. H. van Berkel, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 798–801; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 809–812; b) W. Zhang, B. O. Burek, E. Fernández-Fueyo, M. Alcalde, J. Z. Bloh, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15451–15455; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 15654–15658.
 [22] W. Zhang, E. Fernández-Fueyo, Y. Ni, M. van Schie, J. Gacs, R. Renirie, R. Wever, F. G. Mutti, D. Rother, M. Alcalde, F. Hollmann, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 55–62.
 [23] J. B. Priebe, J. Radnik, A. J. J. Lennox, M.-M. Pohl, M. Karnahl, D. Hollmann, K. Grabow, U. Benstrup, H. Junge, M. Beller, A. Brückner, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2137–2148.
 [24] X. Li, C. Chen, J. Zhao, *Langmuir* **2001**, *17*, 4118–4122.
 [25] N. Tanaka, R. Wever, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 625–631.

Manuscript received: June 1, 2018

Accepted Article published: June 25, 2018

Version of record online: July 25, 2018

4.3 Unveröffentlichte Ergebnisse

Im Rahmen des Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. B. S. Moore (Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego, La Jolla, CA, USA) wurde die heterologe Produktion und *in vitro* Charakterisierung der VHPO Mcl40 angestrebt. Dieser VHPO wird im Biosyntheseweg der Merochlorine eine Schlüsselrolle in der Makrochloroetherbildung ausgehend von Merochlorin D (**68**) zu Merochlorin C (**67**) zugesprochen. In Vorarbeiten der AG Moore wurde sowohl die Expression in *E. coli* (Rosetta DE3), als auch in *Streptomyces lividans* TK24 getestet. Bisher erwies sich nur ein C-terminales His-Tag Konstrukt (pET24b in *E. coli*) als vielversprechend, da prinzipiell eine Expression von *mcl40* zu beobachten war, allerdings ist das heterologe Protein hierbei unlöslich. Zunächst wurde daher eine Verbesserung der Löslichkeit dieses His-Tag-Konstruktes angestrebt. Hierfür wurde die Co-Expression mit Chaperonen (GroEL, GroES, GrpE, DnaJ und DnaK) zur Verbesserung der Faltung des Proteins getestet. Allerdings führte die Co-Expression nicht zu einer Erhöhung der Löslichkeit. Des Weiteren wurde versucht, das unlösliche Protein durch ein mildes Detergenz (*N*-Lauroylsarcosin) aus dem Pellet zu solubilisieren. Hierbei konnte zwar Resolubilisierung und Aufreinigung über die Ni-Säule erzielt werden, allerdings zeigte das aufgereinigte, solubilierte Enzym keine (Bromierungs-) Aktivität im MCD-Assay. Da diese Strategien also nicht zielführend waren, wurde die Klonierung von *mcl40* mit alternativen Tags (*N*-terminaler MBP- und SUMO-Tag) angestrebt, um die Faltung und Löslichkeit der Mcl40 zu verbessern. Das Mcl40-MBP-Tag-Konstrukt wurde schließlich in moderaten Ausbeuten löslichen Proteins erhalten und aufgereinigt. Dabei war die Aufreinigung sowohl mittels einer HitrapTM-Säule, wie

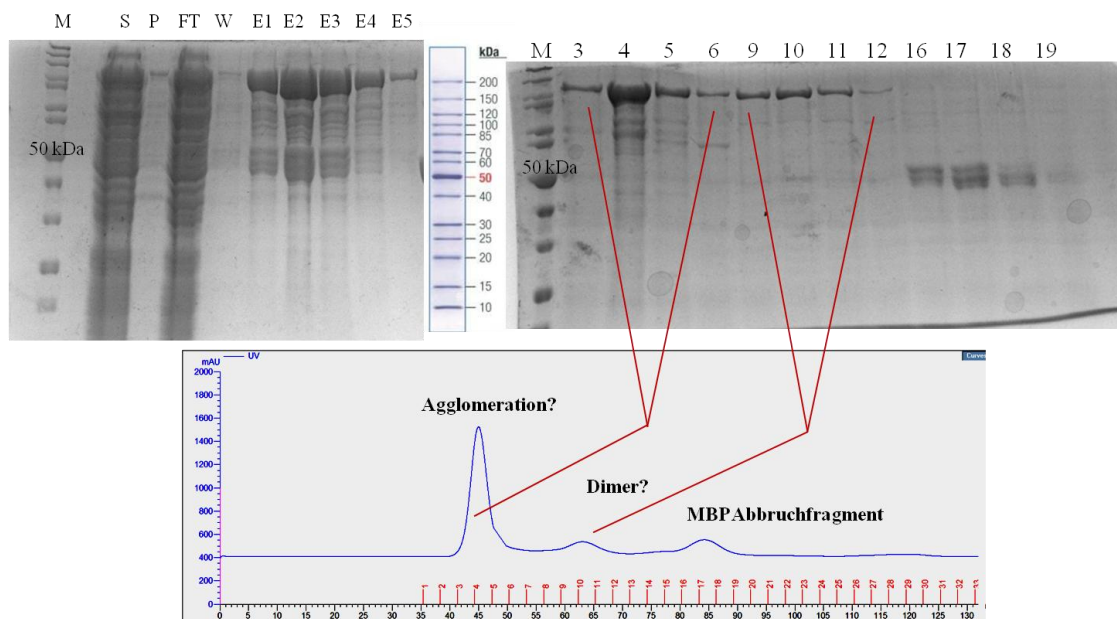


Abbildung 6. SDS-PAGE der Aufreinigung von Mcl40 mittels MBPTM-Säule und anschließender Größenausschlusschromatographie. Größe des Mcl40MBP-Konstruktes ~100 kDa. S = löslicher Überstand; P = Pellet; FT = Durchlauf; E1-E5 = Elutionsfraktionen, M = Proteinmarker.

auch eine MBPtrap™-Säule möglich, wobei die Ausbeuten löslichen Proteins bei der Aufreinigung mittels MBPtrap™-Säule höher waren. Dies könnte in einer besseren Affinität des MBP-Tags zur Säule und möglicherweise an einer schlechteren Zugänglichkeit des His-Tags begründet liegen. Proteinproduktion in Autoinduktionsmedium (AI) führte nicht zu verbesserter Ausbeute und Stabilität der Mcl40MBP. Das SUMO-Konstrukt führte lediglich zu der Produktion von unlöslichem Enzym in *E. coli* (BL21-Gold(DE3) und RIPL Zell-Linien getestet). Das aufgereinigte MBP-Tag Konstrukt wurde mittels Größenausschlusschromatographie weiter aufgereinigt (Abbildung 6). Die beobachtete Retentionszeit in der Größenausschlusschromatographie deutet auf das Vorliegen der Mcl40 als Homodimer hin. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der MBP-Tag mit TEV-Protease vollständig abspaltbar ist (Abbildung 7a). Die *in vitro* Aktivität der Mcl40 wurde zunächst anhand des Standard MCD-Assays evaluiert (Abbildung 7b). Wie zuvor erläutert (vgl. Kapitel 2.1.2) sind die VHPOs aus *Streptomyces* sp. typischerweise – obwohl sie Chlorperoxidasen sind – nur hinsichtlich der Bromierung im MCD-Assay aktiv. Sowohl das Mcl40MBP-Konstrukt, wie auch Mcl40 mit abgespaltenem MBP-Tag zeigten Bromierungsaktivität, wobei diese bei pH 6 höher war als bei pH 8. Chlorierungsaktivität gegenüber des Substrats **12** wurde erwartungsgemäß nicht detektiert. Zudem wurde die Vanadat-Abhängigkeit demonstriert. Die Bromierung von **12** erfolgt erst bei Zugabe von Vanadat zur Assaylösung, welche *apo*-Mcl40 enthält. Direkt nach der Zugabe setzt dann die Bromierung von **12** ein, somit scheint die Rekonstitution zur *holo*-Mcl40 sehr schnell zu

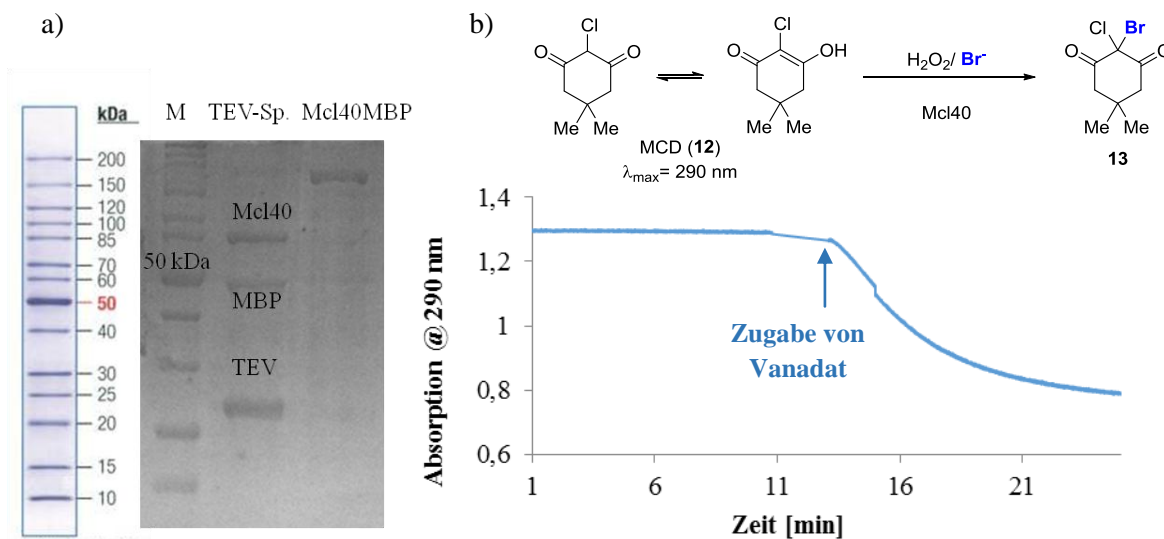


Abbildung 7. a) Abspaltung des MBP-Tags des Mcl40MBP-Konstrukts mittels TEV-Protease. M = Proteinmarker, TEV-Sp. = nach TEV-Spaltung. b) Monochlordimedon- (MCD) Assay für Mcl40MBP und Nachweis der Vanadat-Abhängigkeit.

erfolgen. Parallel wurde auch Mcl24 – die zweite VHPO des Merochlorin-Biosynthesecusters – heterolog produziert. Die heterologe Expression von *mcl24* in *E. coli* (BL21-Gold(DE3), N-terminaler 8His-Tag) wurde bereits zuvor in der AG Moore etabliert.^[65,68-69]

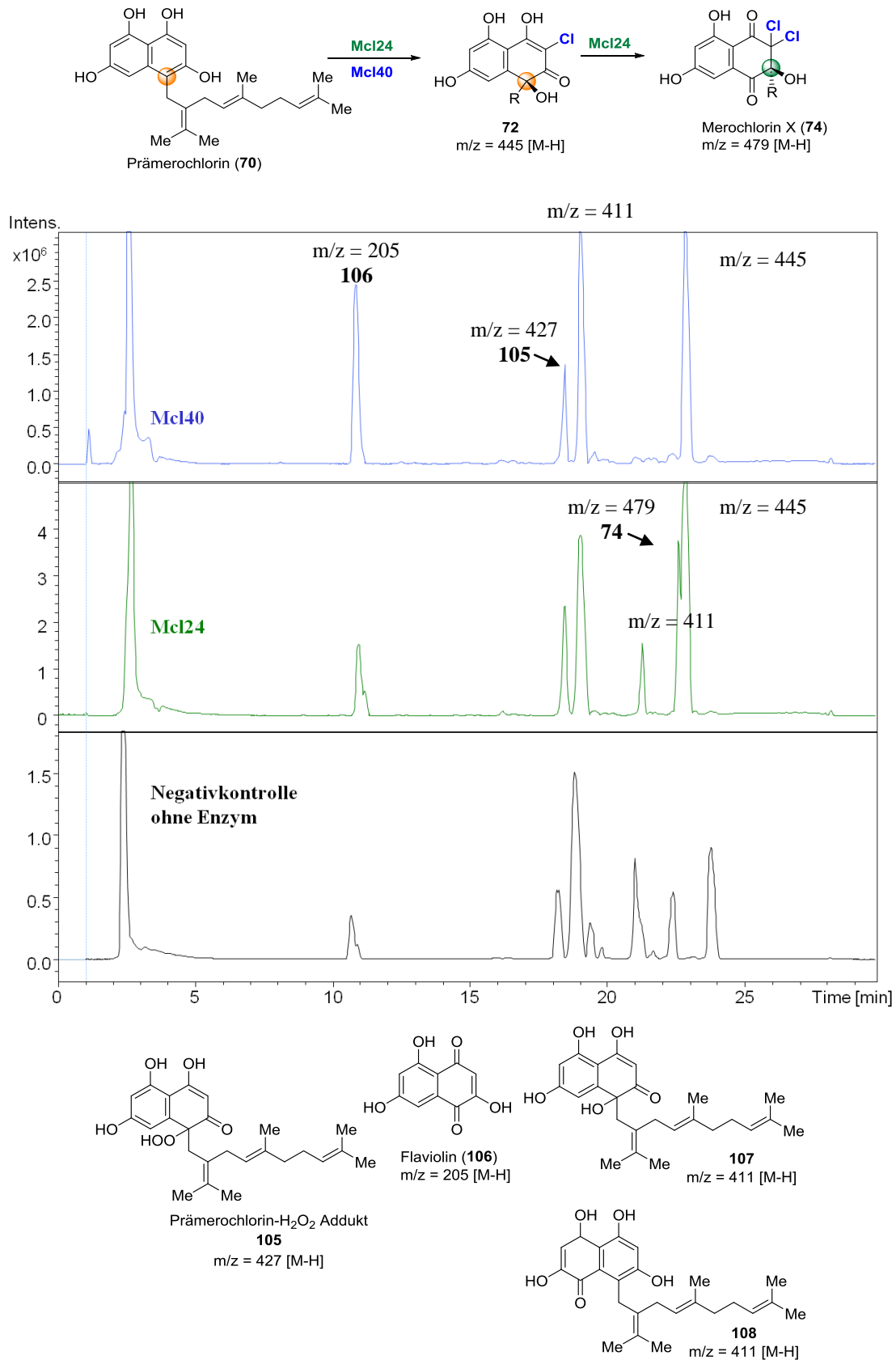
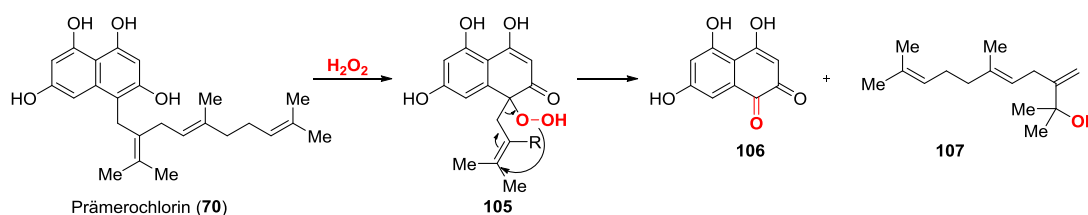


Abbildung 8 LC-MS Spuren (base peak) der enzymatischen Umsetzung von Prämerochlorin (**70**) mit Mcl24 (grün), Mcl40 (blau) sowie eine Negativkontrolle ohne VHPO (schwarz). Die Reaktionen wurden bei pH 8.0 durchgeführt, 16h Reaktionszeit bei rt.

Im nächsten Schritt wurden die VHPOs dann *in vitro* mit Prämerochlorin (**70**), dem zentralen Intermediat des Biosyntheseweges, als Substrat getestet (Abbildung 8). Die Reaktivität von Mcl24 in der enzymatischen Umsetzung von **70** ist hierbei bereits bekannt. Mcl24 katalysiert die Bildung von Merochlorin X (**74**) und die Struktur dieses biosynthetischen Intermediates wurde bereits aufgeklärt.^[72] Diese Reaktion diente als Vergleich. Interessanterweise zeigte auch Mcl40 *in vitro* Aktivität in der Umsetzung von **70**, wobei selektiv ein einfach chloriertes Produkt gebildet wurde ($m/z = 445$ [M-H], Isotopenmuster für einfache Chlorierung). Auch beim Einsatz von 2-3 Äq. H_2O_2 erfolgte keine weitere Chlorierung mit Mcl40 und **74** wurde nicht detektiert. Bei dem gebildeten Produkt handelt es sich vermutlich um die Verbindung **72**, allerdings konnte die Struktur bislang noch nicht anhand eines authentischen Standards oder NMR-Analytik verifiziert werden. Das Substrat **70** ist sehr Oxidations-empfindlich, daher wurden die Assays unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Dennoch wurden viele Nebenprodukte wie die Oxidationsprodukte **107** und **108** detektiert. Zusätzlich scheint **70** in Gegenwart von H_2O_2 ein Addukt **105** zu bilden ($m/z = 427$ [M-H]). Wie bereits für Mcl24 beobachtet, tritt als weitere Nebenreaktion die Bildung von Flaviolin (**106**) unter Verlust der Prenylseitenkette auf. Mechanistisch könnte die Bildung dieses Nebenprodukts aus dem H_2O_2 -Addukt **105** nachvollzogen werden. Das dabei gleichzeitig entstehende Produkt **107** kann per LC-MS nicht detektiert werden (keine Absorption im UV-Vis-Bereich), allerdings könnten anderen Methoden wie GC-MS diesen postulierten Mechanismus und die Bildung von **107** nachweisen. Die Nebenprodukte **105** - **108** treten auch in der Negativkontrolle ohne VHPO auf. Somit könnte deren Auftreten in Nebenreaktionen von **70** mit dem Oxidationsmittel H_2O_2 begründet liegen. Eine langsame Zugabe des Oxidationsmittels, oder eine *in situ* Generierung könnte die Nebenreaktionen minimieren.



Schema 14. Postulierter Mechanismus für die Bildung von Flaviolin (**106**) aus **70** unter Verlust der Prenylseitenkette.

Außerdem wurde Merochlorin D (**68**) durch Kultivierung des Produzentenstamms *Streptomyces* CNH-189 und Isolierung des Naturstoffes gewonnen (Abbildung 9, Ausbeute ca. 15 mg/1L Kultur). Anders als zuvor berichtet,^[66] wurde allerdings kein Merochlorin C (**67**) erhalten (Masse in der LC-MS nicht detektiert), obwohl die Kultivierungsbedingungen analog gewählt wurden. Zuvor wurde **67** als Hauptkomponente berichtet, wohingegen **68** von CNH-189 in geringeren Mengen als **67** produziert wurde. Die Kultivierung wurde noch mehrfach wiederholt

(mit jeweils 3-5 Parallelkulturen im 1L-Maßstab), es wurden auch verschiedene Cryokulturen des Stammes getestet. Schließlich wurde ein Peak identifiziert und isoliert, welcher gemäß HRMS-Analytik der exakten Masse sowie dem zu erwartenden Isotopenmuster von **67** entspricht und tendenziell auch zu der zuvor beobachteten HPLC-Retentionszeit passt. Ein genauer Abgleich konnte nicht vorgenommen werden, da keine authentische Referenz von **67** in der AG Moore vorlag und die isolierten Mengen nicht ausreichend für NMR-Analytik waren. Insgesamt scheint die Produktion der Merochlorine in *Streptomyces* CNH-189 also stark zu variieren. Bei der Verwendung von A1 als Medium für die Vorkultur von CNH-189 konnte **68** in besserer Reinheit isoliert werden als bei Verwendung von TSBY. Überdies scheint die Zusammensetzung des A1-Mediums entscheidend zu sein. Anstelle von Meerwasser kann der Meersalzmix Instant Ocean™ (30g/ 1L) verwendet werden. Die ursprünglichen Kultivierungsbedingungen nutzten jedoch filtrierte Meerwasser für das A1-Medium. Möglicherweise bedingt auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Salze und Spurenelemente im Medium für die Vorkultur die Produktion der Merochlorine. Bei Verwendung von Sea Salts (Sigma Aldrich) für das A1-Medium nimmt die Produktion von **68** drastisch ab und die produzierten Mengen reichen nicht für die Isolierung. Der Naturstoff **68** wurde als potentielles Substrat für

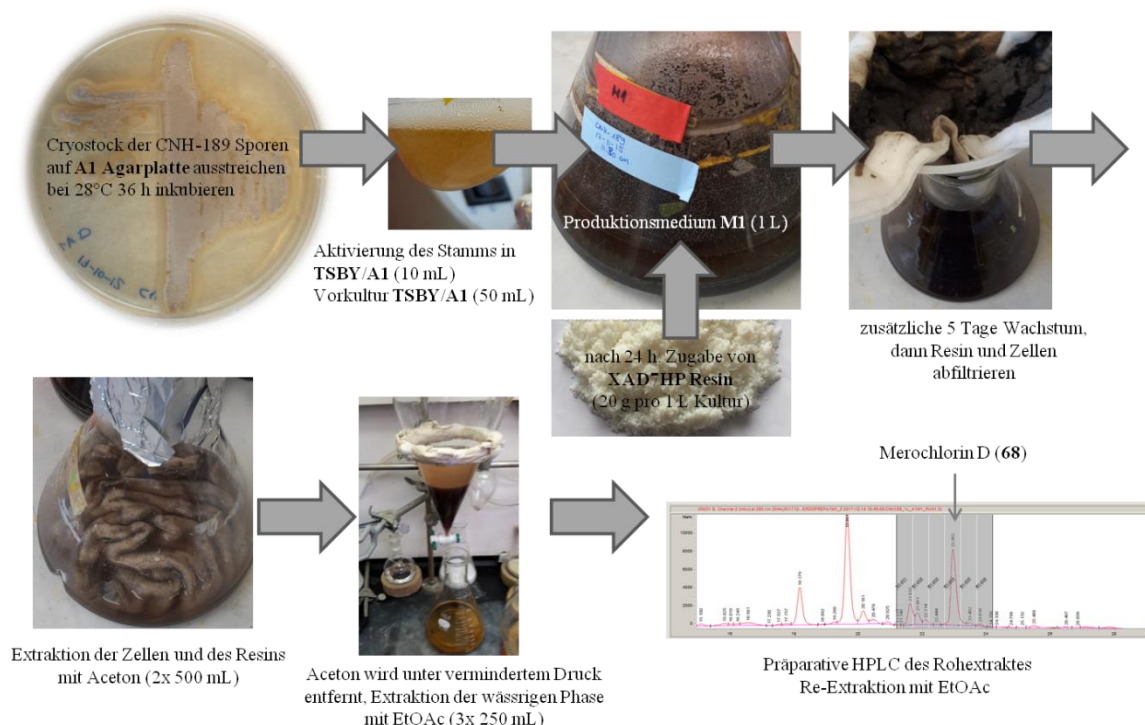


Abbildung 9. Isolierung des Naturstoffs Merochlorin D (**68**) aus *Streptomyces* CNH-189.

die Makrochloroetherbildung mit Mcl40 umgesetzt. Überraschenderweise katalysierte Mcl40 jedoch keine Umsetzung des Substrates **68**. Es wurde aber beobachtet, dass die zweite VHPO des Biosyntheseweges, Mcl24, **68** zu einem Produkt umsetzt, welches hinsichtlich der Masse und des Isotopenmusters mit Merochlorin C (**67**) übereinstimmt (Abbildung 10). Es zeigte sich

auch, dass Mcl24 –trotz der multiplen Rollen in der Biosynthese der Merochlorine – vermutlich sehr selektiv für Merochlorin D (**68**) als Substrat ist, da das strukturell ähnliche Merochlorin X (**74**) von Mcl24 nicht umgesetzt wurde (Abbildung 10, unten). Die Mcl24-katalysierte

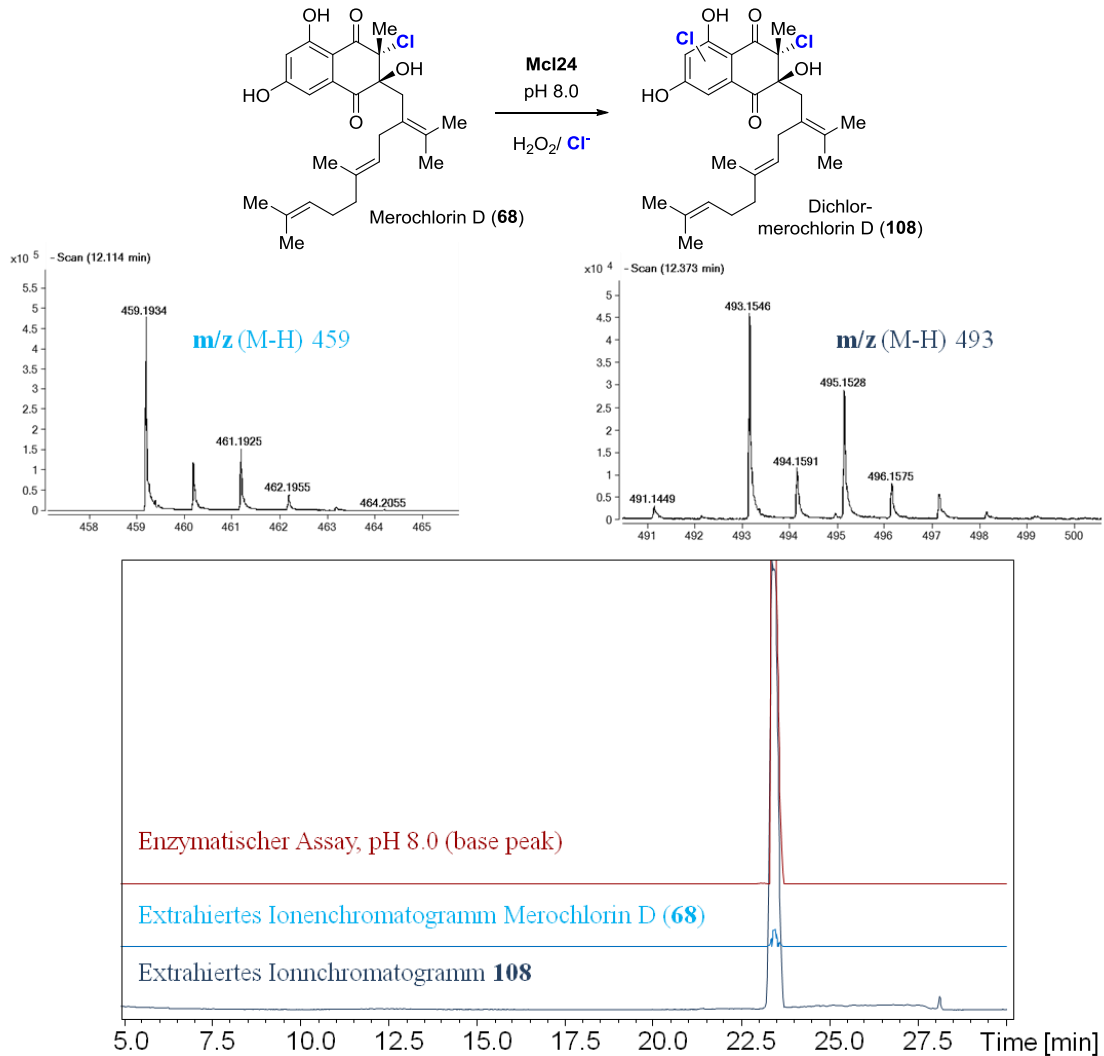


Abbildung 10. Vergleich des enzymatischen Assays von Mcl24 mit Merochlorin D (**68**) und Merochlorin X (**74**) als Substrat. Die LC-MS Spur des Mcl24/**68** Assays zeigt die Überlagerung der Retentionszeiten von **68** und **108**. Assaybedingungen: Substrat 1 mM, H_2O_2 1 mM, KCl 0.1 M, HEPES 50 mM pH 8.0, 20 μ M Mcl24, 16 h rt.

Umsetzung von **68** wurde sowohl bei pH 6, als auch bei pH 8 durchgeführt, wobei die Reaktion bei pH 6 polare Nebenprodukte hervorrief, die bei pH 8 nicht auftraten. Überdies verbesserte ein Aufarbeitungsschritt mit MeCN statt MeOH die Reinheit des Rohproduktes deutlich. Bei dem generierten Produkt handelt es sich aber nicht um **67**, sondern um ein acyclisches Isomer **108**, welches am Quinolin-Grundgerüst zweifach chloriert ist. Dieses Produkt hat dieselbe Retentionszeit wie **68** und ist daher von dem Startmaterial schwer trennbar. 2D-NMR-Analytik des Rohproduktes zeigte, dass das Doppelbindungssystem der Prenylseitenkette intakt und die Chlorierung am aromatischen Ring erfolgt ist. Eine Verbindung mit der gleichen Retentionszeit und Masse wie **108** konnte allerdings auch im Extrakt von CNH-189 detektiert werden. Es handelt sich also um einen zuvor unentdeckten Naturstoff, der in geringen Mengen auch im natürlichen Biosyntheseweg produziert wird (Abbildung 11a). Somit können enzymatische *in vitro* Assays auch zum Auffinden bislang unbekannter Naturstoffe beitragen. Zuvor wurden

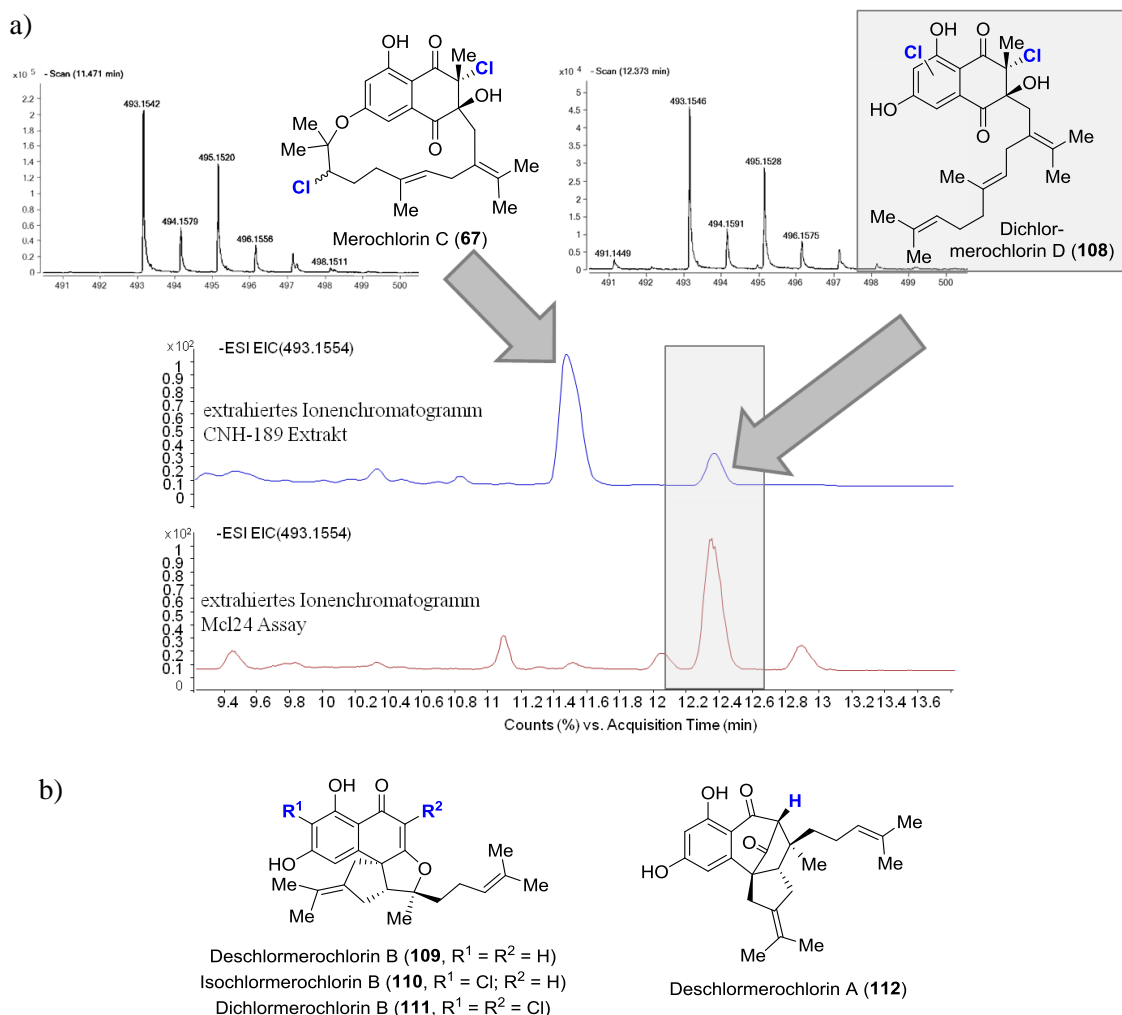
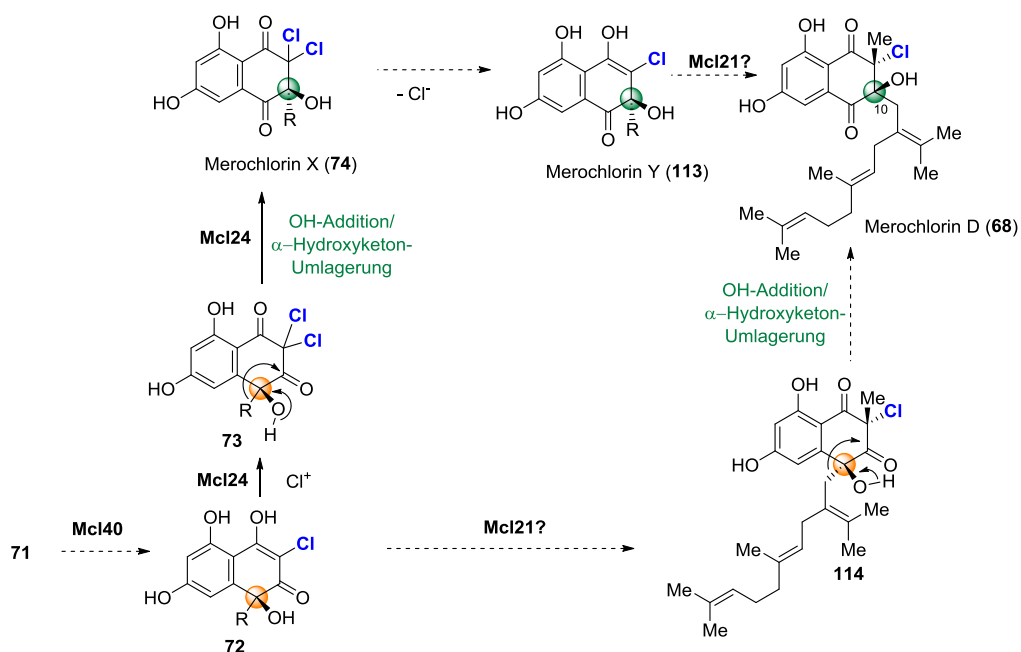


Abbildung 11. a) Vergleich des enzymatischen Assays von Mcl24 mit Merochlorin D (**68**) als Substrat mit dem Extrakt aus *Streptomyces* CNH-189, in dem sowohl die hochaufgelöste Masse von **67** wie auch von **108** zu finden sind. b) Natürlich vorkommende Merochlorin-Derivate **109** - **112**, die strukturell analog zu Merochlorin A und B (**65**, **66**) sind.

bereits Minderkomponenten aus der Reaktion von Prämerochlorin (**70**) mit Mcl24 entdeckt, die auch in geringem Maße von CNH-189 produziert werden.^[68] Chemische Chlorierungsmethoden (iPr₂NH, NCS) lieferten die Merochlorin-Derivate **109** - **112** in größeren Mengen und ermöglichten deren strukturelle Charakterisierung. Neben Deschlormerochlorin B (**109**), Isochlormerochlorin B (**110**), Deschlormerochlorin A (**112**) und Dichlormerochlorin B (**111**) (Abbildung 11b) gehört also auch das zweifach chlorierte Derivat **108** zur Naturstoffklasse der Merochlorine.

Bislang ist auch der biosynthetische Schritt zur Einbringung der Methylfunktionalität in **68** ungeklärt. Im *mcl*-Biosynthesecluster ist ein Gen enthalten (*mcl21*), welches für eine SAM-abhängige Methyltransferase kodiert. Das entsprechende Gen wurde in Vorarbeiten der AG Moore in einen pHis8-Vektor kloniert und das entsprechende Protein kann in guten, löslichen Ausbeuten in *E. coli* produziert werden. Allerdings wurde bislang keine *in vitro* Aktivität der Mcl21 mit diversen Substraten erzielt. Knock-out Studien der AG Moore zeigten eine Produktion von **74** bei Expression von *mclΔ21* (unveröffentlichte Ergebnisse). Im Rahmen des Kooperationsprojektes wurden die Substrate Prämerochlorin (**70**), THN (**59**), Merochlorin X (**74**), sowie das synthetische Derivat Merochlorin Y (**113**) getestet, jedoch wurde keine Methylierung beobachtet. Prinzipiell wäre die Einführung der Methylgruppe in verschiedenen Schritten der Biosynthese denkbar (Schema 15). Ein möglicher biosynthetischer Weg verläuft über die Dechlorierung des durch Mcl24-Katalyse gebildeten **74** zu **113**. Ein potentielles Dechlorierungsenzym (Mcl30, Eisen-Schwefel-Cluster-Protein mit Cobalamin-Bindestelle) ist zwar im *mcl*-Biosynthesecluster kodiert, allerdings zeigten Knockout-Experimente,^[68] dass



Schema 15. Potentielle biosynthetische Routen zu Merochlorin D (**68**) und mögliche Substrate für die Methyltransferase Mcl21.

Expression von *mclΔ30* zumindest die Merochlorine A, B und D (**65**, **66**, **68**) hervorbringt (Merochlorin C wurde im HPLC-Chromatogramm nicht gezeigt). Das dechlorierte Intermediat **113** könnte ein potientes Substrat für Mcl21 sein und wurde in der *mclΔ21* Expression beobachtet, dennoch wurde es *in vitro* nicht durch Mcl21 methyliert. Alternativ wäre ein Abfang des Intermediats **72** unter Methylierung und Bildung von **114** denkbar, welches dann durch die geminale Disubstitution zur α -Hydroxyketon-Umlagerung befähigt wäre. Enzymatische Kaskadenreaktionen ausgehend von Prämerochlorin (**71**) und Umsetzung mit einer der beiden VHPOs Mcl24 oder Mcl40 gefolgt von Zugabe der Mcl21 führten auch nicht zu methylierten Produkten.

Die Kristallisation von Mcl24 wurde in der AG Moore bereits in Vorarbeiten etabliert (unveröffentlichte Ergebnisse). Da bislang aber nur Prämerochlorin (**71**) als Substrat für Mcl24 bekannt war und dieses stark Oxidations-empfindlich ist, waren Co-Kristallisationsexperimente nicht möglich. Ausgehend von den neuen Erkenntnissen, dass auch Merochlorin D (**68**) als Substrat von Mcl24 umgesetzt wird und dieses deutlich stabiler ist, wurden Co-Kristallisations-experimente mit Mcl24 und **68** durchgeführt und hierbei initiale Kristalle erhalten, die sich in ihrer Morphologie von den Kristallen der *holo*-Mcl24 unterscheiden. Für die kristallographischen Experimente wurde Mcl24 über eine HitrapTM-Säule aufgereinigt, gefolgt von der

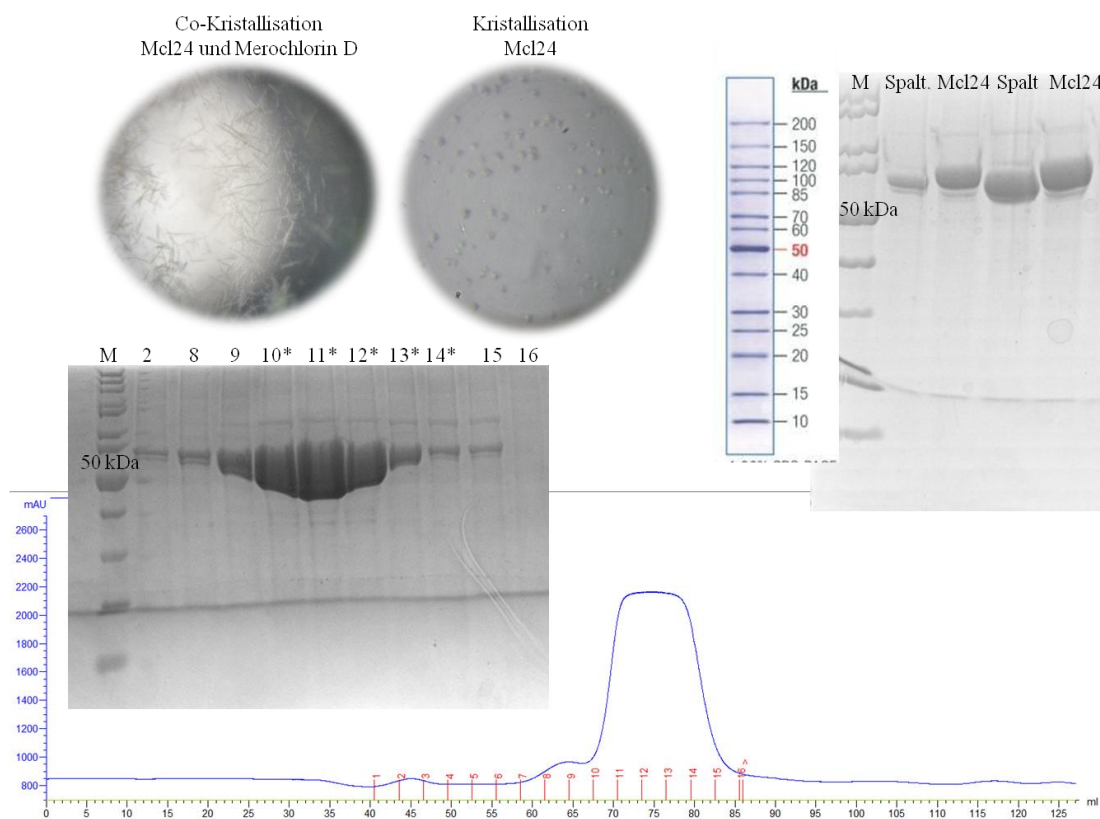
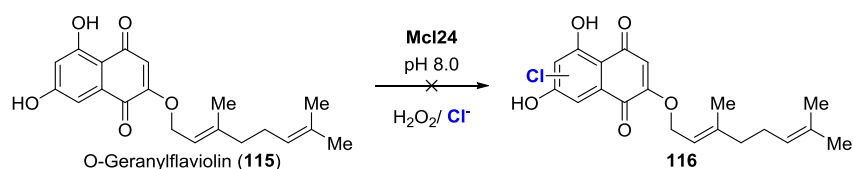


Abbildung 12. Aufreinigung der Mcl24 für die Kristallographie: Abspaltung des His-Tags mit Thrombin Protease und anschließende Größenausschlusschromatographie sowie Fotos von den erhaltenen Kristallen. Spalt. = Mcl24 ohne His-Tag; M = Proteinmarker. Der Kristallographie-Puffer wurde mit 5 mM Vanadat zur Rekonstitution der Mcl24 versetzt.

Abspaltung des His-Tags mit Thrombin Protease und weiterer Aufreinigung über Größenausschlusschromatographie (Abbildung 12). Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen (Optimierung der PEG- und $MgCl_2$ -Konzentration) wird derzeit in der AG Moore bearbeitet.

Es ist bemerkenswert, dass Mcl24 zwar multiple Funktionen im Biosyntheseweg der Merochlorine und somit eine relativ flexible Substratbreite aufweist, allerdings dennoch auch über distinkte Substratspezifität verfügt. Dies zeigt sich in der Unterscheidung zwischen den Substraten Merochlorin D (**68**) und Merochlorin X (**74**, Abbildung 10), aber auch in früheren Studien^[68] zu fehlender Umsetzung von Derivaten des Prämerochlorins (**70**) und einfacher Terpene. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *O*-Geranylflaviolin (**115**, bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Groß) als weiteres analoges Substrat in einer enzymatischen Umsetzung mit Mcl24 getestet und hierbei keine Chlorierungsreaktion beobachtet (Schema 16).



Schema 16. Enzymatischer Assay von Mcl24 mit *O*-Geranylflaviolin (**115**) als strukturell verwandtes Substrat zu **70** und **68**.

Zusammenfassend wurde erstmals die lösliche heterologe Expression des *mcl40*-Gens erzielt und die Aktivität von Mcl40 in der Umsetzung des Substrats Prämerochlorin (**71**) demonstriert. Die erwartete Rolle in der Makrochloroetherzyklisierung von **68** zu **67** wurde bislang *in vitro* noch nicht gezeigt. Grundsätzlich ist Mcl40 schwieriger zugänglich als Mcl24 und scheint auch eine geringere operationale Stabilität aufzuweisen. Für die Produktion der Mcl40MBP war die Zugabe von Glycerol zum TB-Medium (10%) essentiell, Enzympräparationen, die aus einer Expression in regulärem TB-Medium ohne zusätzliches Glycerol aufgereinigt wurden, waren inaktiv. Daher könnte die Zugabe von Stabilisierungsagenzien wie Glycerol zu den Assays bzw. die Zugabe von Saccharose während der Reinigung die Stabilität der Mcl40MBP erhöhen. Auch die langsame Zugabe des Oxidationsmittels über eine Spritzenpumpe wirkt sich möglicherweise positiv auf den Umsatz in den Assays aus. Die Testung alternativer Expressionsstämme wie *E. coli* OrigamiTM(DE3) oder TunerTM(DE3), alternativer Löslichkeits-Tags (z.B. mCherry) sowie die Expression mit schwächerer Induktion (pBAD Plasmid, Arabinose-induziert) stellen weitere Möglichkeiten dar, zukünftig die Produktion und Stabilität der Mcl40 zu erhöhen. Zusätzlich könnte eine weiterreichende Investigation der Stabilität über Fluoreszenz-basierte Bestimmung der Schmelztemperatur hilfreich sein. Ein Fütterungsexperiment von **68** zu einer *mcl40*-exprimierenden Kultur (TB) ergab ebenfalls keine Umsetzung zu **67**, das Experiment könnte jedoch unter Zugabe von

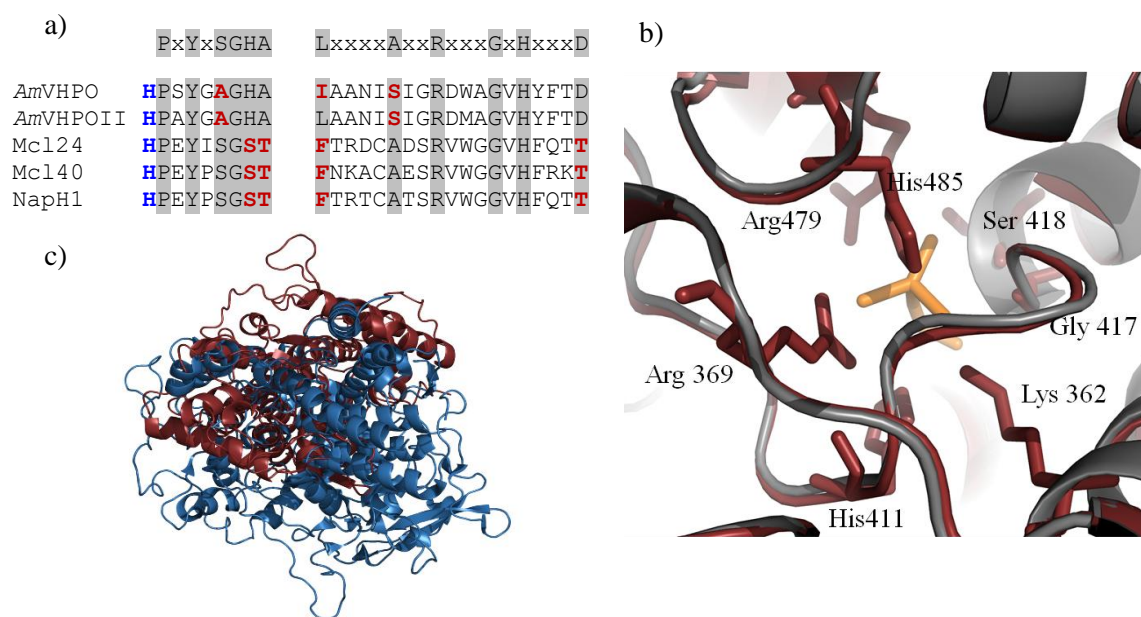


Abbildung 13 a) Vergleichendes Alignment der konservierten Domänen der VHPOs aus *A. marina* und einiger selektiver VHPOs aus marinen Streptomycceten (Mcl24, Mcl140 und NapH1). Von der konservierten Sequenz abweichende Aminosäuren sind in rot markiert, in blau ist eine Aminosäure hervorgehoben, für die ein Einfluss auf die Halogenidbindung postuliert wurde. b) Die Kristallstruktur der Mcl24 (rot) überlagert mit einem Homologiemodell von Mcl40 (grau), erstellt mittels Phyre2^[101] und basierend auf der Struktur von NapH1 (PDB 3W36). Die Aminosäuren des aktiven Zentrums der Mcl24 sind hervorgehoben, Sequenzidentität 50% (Mcl24 und Mcl40, E value $5 \cdot 10^{-173}$)^[99]. c) Die Überlagerung der Gesamtstruktur von Mcl24 (rot) und *Am*VHPO (blau), Sequenzidentität 36% (E value 0.17).^[99]

Glycerol zum Medium wiederholt werden. Denkbar ist auch, dass **68** nicht das native Substrat für die Zyklisierung ist und diese schon in einem früheren Schritt der Biosynthese erfolgt. Zusätzlich wurde eine neuartige Reaktivität der VHPO Mcl24 in der Umsetzung von **68** zu dem dichlorierten Produkt **108** gezeigt. Dies bietet neue Möglichkeiten für Co-Kristallisationsexperimente. Mcl24 zeigte eine distinkte Substratselektivität für die Chlorierung von **68** im Gegensatz zu **74**. Zukünftig könnte eine Isolierung von Merochlorin C (**67**) und dessen Derivatisierung zur Kristallisation angestrebt werden. Die Röntgenstrukturanalyse würde zur Aufklärung des stereogenen Zentrums an C-18 beitragen. Die VHPOs aus Streptomycceten sind sich untereinander sehr ähnlich, so auch die beiden VCPOs aus dem Merochlorin Biosynthesecuster (Sequenzidentität Mcl40 und Mcl24 50%). Ein Homologiemodell für Mcl40 zeigt erwartungsgemäß eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu der Kristallstruktur von Mcl24 (Abbildung 13b). Die VHPOs aus *A. marina* weisen hingegen viele Unterschiede zu den selektiven VHPOs aus *Streptomyces* sp. (Abbildung 13a,c) auf, so divergiert auch die Gesamtstruktur stark. Ein Lysin, welches für die Bildung eines Chloramins und Bindung der elektrophilen Chlorspezies nahe des aktiven Zentrums verantwortlich sein könnte, wird in den selektiven VHPOs als Determinant für die Selektivität postuliert. Ein solches Lysin konnte im

zum aktiven Zentrum ausgerichteten Tunnel in *Am*VHPO nicht identifiziert werden. Das Einbringen eines Lysins durch Mutagenese stellt demnach einen potentiellen Ansatz zur Selektivitätssteigerung der *Am*VHPO dar. Interessanterweise ist *Am*VHPO deutlich stabiler als die VHPOs aus Streptomycceten. Insgesamt zeigen vergleichende Studien zwischen VHPOs aus verschiedenen Organismen, Lebensräumen und Kontexten (Einbindung in biosynthetische Gencluster *versus* Vorliegen als einzelnes Gen) vielseitige neue Konzepte auf, um zukünftig das Verständnis für die generelle Funktionsweise, physiologische Bedeutung und Selektivität dieser Enzymklasse zu erweitern.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In Anbetracht der weit verbreiteten Anwendung halogener Verbindungen und der Limitierungen und Nachteile der heute zur Verfügung stehenden Methoden, besteht ein großer Bedarf, neuartige Zugänge zur selektiven Installation von Halogensubstituenten zu entwickeln. In diesem Zusammenhang ist die Nutzung von Enzymen anzustreben, da Enzymkatalyse prinzipiell Selektivität bietet, wohingegen die klassische, chemische Halogenierungsmethode der S_EAr keine Regioselektivität erzielt. Enzyme hingegen bieten den Vorteil, dass auch in Substraten mit mehreren reaktiven Positionen selektiv nur eine Position adressierbar ist und die Reaktivität sogar an desaktivierte Positionen dirigiert werden kann. Überdies ermöglicht Biokatalyse milde und umweltfreundliche Reaktionsbedingungen. Somit stellt die Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Halogenasen ein lohnenswertes Ziel dar, um nachhaltige Syntheselösungen zur Gewinnung von halogenierten, (hetero-) aromatischen Verbindungen zu etablieren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Enzymklasse der Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen (VHPOs) und zielt darauf ab, das Verständnis hinsichtlich der generellen Funktionsweise, Substrat- und Halogenspezifität zu erweitern.

Zu diesem Zweck wurde ein neuartiger Biokatalysator mittels BLAST-Suche identifiziert. Das so erhaltene Gen, welches als VHPO annotiert ist, stammt aus dem Genom des Cyanobakteriums *Acaryochloris marina*, eines der größten einzelligen Cyanobakterien-Genome.^[102] Die Aminosäuresequenz weist eine hohe Sequenzidentität zu bereits charakterisierten, funktionalen VHPOs aus Rotalgen auf. *A. marina* wird häufig als Epiphyt von Rotalgen gefunden und ist für die Produktion des ungewöhnlichen Pigments Chlorophyll D bekannt.^[103] Das *amvhp*-Gen wurde heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und das Protein *AmVHPO* wurde in guten, löslichen Ausbeuten produziert. In Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern (AG Prof. M. Groll, TU München) wurde außerdem die Kristallstruktur des Proteins gelöst. Dabei zeigte sich eine verblüffende strukturelle Ähnlichkeit zu den homologen Enzymen aus Rotalgen. Die Strukturvergleiche geben klare Hinweise auf eine evolutionäre Verwandtschaft dieser Organismen und eine mögliche Übertragung der für die Haloperoxidasen kodierenden Gene mittels horizontalen Gen-Transfers. Ähnlich wie die homologen Enzyme aus Rotalgen weist auch *AmVHPO* eine bemerkenswerte Robustheit auf, toleriert somit diverse organische Co-Solventien und ist thermostabil. Die dodekamere Struktur der *AmVHPO* wie auch die Stabilisierung über intra- und intermolekulare Disulfidbrücken trägt zu dessen Robustheit bei. Des Weiteren wurde das Halogenierungspotential des neuartigen Biokatalysators mit Standard-Assays untersucht, wodurch gezeigt wurde, dass auch *ex vivo* Funktionalität vorliegt. Erwartungsgemäß verfügte die annotierte Bromperoxidase über Bromierungs- und Iodierungsaktivität. VHPOs werden gemäß des elektronegativsten Halogenids klassifiziert, welches sie in der Lage sind zu oxidieren. Interessanterweise konnte jedoch auch eine schwache Chlorierungsaktivität über massenspektrometrische Untersuchungen

nachgewiesen werden. Die Chlorierungsaktivität ist per Definition eigentlich nur designierten Chlorperoxidasen vorbehalten. Dennoch zeigten bereits frühere Untersuchungen, dass auch Bromperoxidasen schwache Chlorierungsaktivitäten aufweisen können.^[42,100] Hieraus ergeben sich interessante Fragestellungen zu den Determinanten der Halogenspezifität sowie zu möglichen Mutagenesestrategien im Hinblick auf die Veränderung der Halogenspezifität. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine vereinfachte Anwendbarkeit der *AmVHPO* durch die Verwendung von lyophilisiertem löslichen Rohzelleextrakt möglich ist und das Enzym über einen Halo-Tag immobilisierbar ist.^[104]

Das natürliche Substrat der *AmVHPO* ist unbekannt, bislang wurden keine halogenierten Naturstoffe aus *A. marina* berichtet. Es wurde eine Anzucht des cyanobakteriellen Stamms aus Cryokulturen angestrebt (AG Prof. K. Castiglione, Universität Erlangen), allerdings wuchsen diese Kulturen nicht an. Cyanobakterien sind grundsätzlich schwer zu konservieren und die Inokulation aus Cryokulturen problematisch. Zukünftig könnte nach einem Zugang zu einer lebenden Kultur von *A. marina* in Stammbibliotheken gesucht werden und Untersuchungen von Extrakten des Produzentenstammes könnten Hinweise auf das physiologische Substrat liefern. Die *amvhp0* und *amvhp0II* Gene sind nicht Teil bekannter biosynthetischer Gencluster im Genom von *A. marina*. In Anbetracht der genetischen Verwandtschaft zu der VHPO aus *Synechococcus* sp. CC9311, welche wiederum eine hohe Sequenzidentität zu Phosphoenolpyruvatmutase aufweist, nehmen die VHPOs aus *A. marina* möglicherweise eine Rolle in der Biosynthese von halogenierten Phosphonat-Naturstoffen ein.^[3,105-106] Im Genom von *A. marina* wurden außerdem zwei Gene identifiziert, die als Tryptophan-Halogenasen annotiert sind. Diese sind möglicherweise Teil von biosynthetischen Genclustern (Gene AM1_RS22750 und AM_RS27445) und stellen somit ein interessantes Ziel für weitergehende Studien zu cyanobakteriellen Halogenasen dar.

Zusätzlich wurde die heterologe Produktion des Isoenzym aus *A. marina* (*AmVHPOII*), sowie der Chlorperoxidase aus *Curvularia inaequalis* (*CiVHPO*) erzielt. Das Konzept der photochemischen *in situ* H₂O₂-Erzeugung (Kooperationsprojekt AG Prof. B. König, Universität Regensburg) wurde mit den VHPOs als Modell-Biokatalysatoren weiterentwickelt. Hierbei wurde zum einen die Zugabe eines externen Elektronendonors umgangen, indem der Puffer als Elektronenquelle genutzt wurde, zum anderen wurde auch gezeigt, dass eine photochemische Wasserspaltung an das enzymatische System gekoppelt werden kann. Außerdem wurde das photobiokatalytische System im Detail untersucht. Als Photokatalysatoren dienten Flavinmononukleotid (FMN, **94a**) bzw. Au-TiO₂ für die Wasserspaltung. Anstelle der zuvor in der Literatur häufig genutzten Breitbandemissions-Lichtquelle für die Photobiokatalyse wurden LEDs zur gezielten Anregung der Photokatalysatoren bei deren jeweiligem Absorptionsmaximum genutzt. Hierbei zeigte sich, dass – anders als zuvor beschrieben^[91] – die optimale Anregung des Au-TiO₂ nicht mit sichtbarem Licht, sondern UV-Licht zu erzielen ist.

Außerdem wurden Strategien zur Umgehung ungewollter Nebenreaktionen durch den angeregten Zustand des Flavins, welcher unter Oxidation einiger elektronenreicher Substrate wie auch Seitenketten des Enzyms reagiert, entwickelt. Kinetische Untersuchungen der H₂O₂-Erzeugung durch die beiden verschiedenen photokatalytischen Systeme zeigten, dass die Au-TiO₂-vermittelte Wasserspaltung erwartungsgemäß langsamer H₂O₂ freisetzt als die Flavin-Photoredoxkatalyse. Die photokatalytischen Systeme wurden erfolgreich mit VHPO-Biokatalyse in Bromierungs- und Chlorierungsreaktionen kombiniert. Hierbei wurde keine ausgeprägte Regioselektivität beobachtet. Dies könnte entweder darin begründet liegen, dass *Am*VHPO nicht zur selektiven Halogenierung befähigt ist und frei diffundierende 'HOX'-Spezies produziert, oder dass die verwendeten Substrate nicht adäquat waren und sich stark vom natürlichen Substrat unterscheiden. Zur Optimierung der Selektivität bieten sich zukünftig gerichtete Evolution sowie die Suche nach der physiologischen Bedeutung der *Am*VHPO an. Die vorgestellten photobiokatalytischen Konzepte lassen sich allgemein auf andere H₂O₂-sensitive Enzyme übertragen und ermöglichen eine atomökonomische, langsame *in situ* Generation des Oxidationsmittels.

Um vergleichende Studien mit VHPOs aus anderen Organismen durchzuführen, wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in der AG von Prof. B. S. Moore (Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego, USA) die VHPOs aus dem Merochlorin (*mcl*)- Biosynthesekomplex untersucht. Ziel des Forschungsaufenthaltes war insbesondere die heterologe Produktion der VHPO Mcl40. Dieser VHPO wird eine entscheidende Rolle in der Chloronium-induzierten Makrozyklisierung ausgehend von Merochlorin D (**68**) zu Merochlorin C (**67**) zugesprochen. Erstmals gelang die lösliche heterologe Expression des *mcl40*-Gens als lösliches Mcl40-MBP-Tag-Konstrukt, welches in moderaten Ausbeuten produziert und aufgereinigt wurde (4 mg pro 1 L Kultur). Außerdem wurde Merochlorin D (**68**) durch Kultivierung des Produzentenstamms *Streptomyces* CNH-189 und Isolierung des Naturstoffes gewonnen. Überraschenderweise zeigte Mcl40 jedoch keine Umsetzung von **68**. Das Substrat Prämerochlorin (**70**) wurde hingegen umgesetzt, allerdings nicht zu dem dichlorierten und umgelagerten Produkt Merochlorin X (**74**), sondern zu einem monochlorierten Produkt, sogar in Gegenwart von überstöchiometrischen Mengen des Oxidationsmittels. Es wurde außerdem eine neuartige Reaktivität der zweiten VHPO des Biosyntheseweges, Mcl24, gezeigt. Mcl24 setzt Merochlorin D (**68**) zu einem Produkt um, welches hinsichtlich der Masse mit Merochlorin C (**67**) übereinstimmt. Das Produkt co-eluiert mit **68** und ist daher schwer trennbar. Ein Vergleich mit Extrakten von CNH-189 sowie 2D-NMR spektroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich bei dem Produkt nicht um **67** handelt und die Chlorierung stattdessen am aromatischen System erfolgt ist. Interessanterweise katalysiert Mcl24 nicht die Umsetzung des strukturell ähnlichen Merochlorin X (**74**). Dies könnte in der Elektronik der dichlorierten Verbindung **74** begründet liegen. Das enzymatisch generierte Produkt Dichlormerochlorin D (**108**) wurde auch im Extrakt

des Produzentenstamms detektiert, es handelt sich also um einen bislang unentdeckten Naturstoff, der als Minderkomponente produziert wird. Zusätzlich wurde die Rolle des Enzyms Mcl21 untersucht, um weiterreichende Einblicke in die bislang noch nicht vollständig aufgeklärte Biosynthese der Merochlorine C (**67**) und D (**68**) zu gewinnen. Zukünftig könnte die Verbesserung der Stabilität der Mcl40, Co-Kristallisation des Substrats **68** mit Mcl24 und die Isolierung sowie Derivatisierung von **67** zur Bestimmung der bislang unbekanntes absoluten Konfiguration des stereogenen Zenters an C-18 anvisiert werden.

Abschließend verbleiben noch einige interessante und anspruchsvolle Fragestellungen im Gebiet der VHPO- und allgemeiner der Halogenasen-Forschung. Die Suche nach weiteren *vhpo*-enthaltenden Biosyntheseclustern, halogenierten Metaboliten und die Charakterisierung neuer Halogenasen werden hierbei auf der Suche nach den Determinanten der Selektivität hilfreich sein. Für ein umfassendes Verständnis der Substratbindung und VHPO-Katalyse wird die Bestimmung des Bindungsmodus mittels Kristallographie unerlässlich sein. Dies wird auch der Wegbereiter für die Ableitung von Strategien für gerichtete Evolution sein.

6 Summary and Outlook

In view of the widespread applications of halogenated compounds and the limitations and disadvantages of the state of the art methodology, there is an ongoing demand to develop innovative methods for the selective installation of halogen substituents. In this context, the use of enzymes is desirable, since they generally provide a distinct selectivity in their transformations, while the classical chemical halogenation method of S_EAr lacks regioselectivity. Enzymes can address only one explicit position in substrates with more than one reactive site, and even steer the reactivity to intrinsically less activated positions. Moreover, biocatalysis is practicable under mild and environmentally benign reaction conditions. Thus, the identification and characterization of novel halogenases is significant for establishing sustainable alternatives for the selective synthesis of halogenated (hetero-)aromatic compounds. The present thesis focuses on the class of Vanadium-dependent haloperoxidases (VHPOs) and aims at an enhanced understanding of their mode of action, substrate and halogen selectivity.

For this purpose, a novel VHPO was identified in the genome of the cyanobacterium *Acaryochloris marina* – one of the largest single-celled cyanobacteria genomes^[102] – via BLAST analysis. The amino acid sequence shows a high sequence identity to other characterized, functional VHPOs from red sea weed. *A. marina* is found as a common epiphyte of red sea weed and is known to produce the unusual pigment chlorophyll d.^[103] The *amvhp* gene was heterologously expressed in *Escherichia coli* and soluble *AmVHPO* was obtained in good yields. In cooperation with our research partners (group of Prof. M. Groll, TU Munich) the crystal structure of *AmVHPO* was determined. The remarkable structural similarity between *AmVHPO* and homologous enzymes from red sea weed points to an evolutionary relationship between these organisms and a possible transmission of the gene encoding for the haloperoxidase via horizontal gene transfer. *AmVHPO* displays a remarkable robustness similar to the VHPOs from algae and thus tolerates different organic co-solvents and is thermostable. The dodecameric structure of *AmVHPO* as well as the stabilization by both intra- and intermolecular disulfide bonds contributes to its stability. In addition, the halogenation potential of *AmVHPO* as a novel biocatalyst was evaluated using biochemical assays and thus *ex vivo* functionality was demonstrated. Expectedly, the annotated bromoperoxidase showed bromination and iodination activity, since VHPOs are classified according to the most electronegative halide which they can oxidize. Unexpectedly, however, a weak chlorination activity was also observed by mass spectrometric analysis. According to the classification of VHPOs, chlorination activity is restricted to chloroperoxidases. A weak chlorination activity of certain bromoperoxidases, however, has already been reported in previous studies.^[42,100] This raises interesting questions concerning the determinants for halogen specificity and possible strategies for mutagenesis in order to manipulate the intrinsic halogen specificity. The use of

lyophilized soluble crude cell extract simplifies the application of *AmVHPO* and successful immobilization of the enzyme via a halo tag was also demonstrated.^[104]

To date, the natural substrate and ecological function of *AmVHPO* has not been identified and so far no halogenated metabolites from *A. marina* have been reported. The cultivation of *Acaryochloris marina* from cryostocks was envisioned (group of Prof. K. Castiglione, University Erlangen), but the cells could not be revived. Cyanobacteria are generally not well suited for conservation in cryostocks and the inoculation from these stocks is often problematic. As a future perspective, an access to living cells of *A. marina* from a culture collection and investigations of the extracts of the strain could provide insights into the physiological role and substrate of *AmVHPO*. The *amvhpo* und *amvhpoII* genes are not clustered with any known biosynthetic gene clusters in the genome of *A. marina*. In view of the genetic relation to the VHPO from *Synechococcus* sp. CC9311, which in turn possesses a high sequence identity to phosphoenolpyruvate mutase, rises speculation of a possible role in the biosynthesis of halogenated phosphonate natural products.^[3,105-106] The genome of *A. marina* includes two additional genes which encode for tryptophane halogenases (genes AM1_RS22750 and AM_RS27445). These genes might be part of biosynthetic gene clusters and thus constitute an interesting target for future investigations on cyanobacterial halogenation enzymes.

Furthermore, the heterologous production of the isoenzyme from *A. marina* (*AmVHPOII*) as well as the chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* (*CiVHPO*) was achieved. The concept of photochemical *in situ* H₂O₂ generation (collaborative project with Prof. B. König, University of Regensburg) was further explored using VHPOs as model enzymes. The addition of external sacrificial electron donors was circumvented either by the use of the buffer as a source of electrons or by coupling photochemical water-splitting to the enzymatic system. The resulting photobiocatalytic systems were examined in detail. Flavin mononucleotide (FMN, **94a**) served as a photocatalyst and Au-TiO₂ as a heterogenous photosensitizer for water oxidation. Instead of using a broad-emission lamp as a light source – as often reported in the literature – LEDs were employed in order to selectively excite the photocatalysts at their specific absorption maximum and thus enhance the photocatalytic efficiency. In contrast to previous reports,^[89] in our hands, the optimal excitation of Au-TiO₂ was not observed under visible light but under UV-irradiation. In addition, strategies were developed to circumvent unwanted side reactions promoted by the excited state of FMN, which decreased reaction efficiency *via* decomposing some of the electron-rich substrates and by reacting with side-chains of the enzyme. Kinetic measurements of the H₂O₂ generation by the two different photocatalytic systems confirmed that the Au-TiO₂ mediated water splitting, as expected, results in a slower release of H₂O₂ compared to flavin photoredox catalysis. The photocatalytic systems were successfully combined with VHPO biocatalysis in bromination and chlorination reactions of various organic substrates. No distinct regioselectivity was observed in

these reactions. A possibility for the lack in selectivity might be the fact that *Am*VHPO, in principle, does not show distinct substrate selectivity and rather forms a freely diffusible 'HOX'-species. Alternatively, the selected substrates for *in vitro* studies might not have been suitable because they differ from the natural substrate. In order to optimize the substrate selectivity in the future, directed evolution and investigations on the physiological role of *Am*VHPO will be crucial. The developed photobiocatalytic methodology is generally applicable to other H₂O₂-sensitive enzymes and enables an atom-economic, slow *in situ* generation of the oxidant.

Within a research stay in the group of Prof. B. S. Moore (Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego, US), comparative studies were conducted by investigating the VHPOs encoded in the merochlorin (*mcl*) biosynthetic gene cluster. The major goal of the research stay consisted in the heterologous production of the VHPO Mcl40. A vital role in the chloronium-induced macrocyclization converting merochlorin D (**68**) to merochlorin C (**67**) is attributed to Mcl40. For the first time, the heterologous expression of the *mcl40* gene as Mcl40MBP fusion protein was achieved yielding moderate amounts of soluble protein (4 mg per 1L culture) throughout the purification. Moreover, merochlorin D (**68**) was obtained by isolating the natural product from the native producer *Streptomyces* CNH-189. Surprisingly, Mcl40 did not convert **68** *in vitro*, whereas conversion of the substrate premerochlorin (**70**) was achieved. In contrast to an enzymatic assay using Mcl24 – the second VHPO within the *mcl40* cluster – the Mcl40 assay on **70** did not yield the dichlorinated and 1,2-shifted product merochlorin X (**74**). Instead, the Mcl40 assay resulted in the formation of a monochlorinated product. This product did not undergo further Mcl40-mediated chlorination towards **74**, not even in the presence of more than stoichiometric amounts of the oxidant. A novel reactivity of Mcl24 was also detectable, showing that Mcl24 converts **68** to a product whose mass is consistent with **67**. The product co-elutes with the substrate **68** and is thus difficult to separate. Comparing extracts of the producing strain CNH-189 as well as analyzing the crude product by 2D-NMR spectroscopy, however, revealed that the product is not identical to **67** and that the chlorination has occurred on the aromatic portion. Interestingly, Mcl24 does not catalyze chlorination of the structurally similar substrate **74**. This could be attributed to the electronics of the dichlorinated compound **74**. The enzymatically generated product dichloromerochlorin D (**108**) was also present in extracts of the producing strain as a so far undiscovered natural product, which is produced as a minor component. Additional studies on the methyltransferase Mcl21 were included in order to gain more insights into the not yet completely unraveled biosynthesis of the merochlorins C (**67**) and D (**68**). As a future perspective, enhancement of the stability of Mcl40, co-crystallization of the substrate **68** together with Mcl24 as well as isolation and derivatization of **67** for determination of its as yet undetermined stereogenic center at C-18 are envisioned.

Overall, many challenging and interesting questions in the field of VHPOs, and more generally halogenases research still need to be addressed. The search for additional *vhpo*-containing gene clusters, halogenated metabolites and the characterization of novel halogenases will eventually shed a light on the determinants for selectivity. In order to fully understand the substrate binding and VHPO-catalysis, determination of the substrate binding mode by crystallography will be crucial. This will also pave the way for directed evolution approaches.

II Experimenteller Teil

1 Experimentelle Details zu unveröffentlichten Ergebnissen

1.1 Medien

Tabelle 3. Medienbestandteile.

LB	TB	A1 ^a	TSBY	M1
10 g Pepton	12 g Trypton	10 g Stärke	30 g TSB (tryptic soy broth)	10 g Glucose
5 g Hefeextrakt	24 g Hefeextrakt	4 g Hefeextrakt	103 g Sucrose	20 g Grandma's molasses
10 g NaCl	5 g Glycerol	2 g Pepton	5 g Hefeextrakt	5 g Pepton
ad 1L miliQ H ₂ O	100 mL 10x TB Salze ^b ad 1L miliQ H ₂ O	30 g Instant Ocean™ ad 1 L miliQ H ₂ O	ad 1L miliQ H ₂ O	2 g CaCO ₃ 51 mg Mg(SO ₄)·7H ₂ O 200 mg KCl 200 mg KBr 40 mg Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·4H ₂ O ad 1L miliQ H ₂ O

^aA1 Produktionsmedium enthält zusätzlich 1 g CaCO₃; ^b10xTB Salze: 0.17 M KH₂PO₄ (23.1 g/L); 0.72 M K₂HPO₄ (125.4 g/L)

Das Autoinduktionsmedium (AI) besteht aus 4 Medienbestandteilen, die individuell hergestellt und autoklaviert werden:

Medienkomponente (1 L):

15 g Pepton (Casein)

30 g Hefeextrakt

6.25 g Glycerol

auf 1 L mit milliQ H₂O auffüllen und autoklavieren.

Glucose Lösung (100 mL):

5 g Glucose

auf 100 mL mit milliQ H₂O auffüllen und autoklavieren.

Lactose Lösung (250 mL):

5 g Lactose

auf 250 mL mit milliQ H₂O auffüllen und autoklavieren.

1 M KPi Puffer (pH 7.0) (250 mL):13.25 g KH_2PO_4 26.55 g K_2HPO_4 auf 250 mL mit milliQ H_2O auffüllen pH adjustieren und autoklavieren.**100 mL Autoinduktionsmedium enthalten:**

80 mL Mediumskomponente

9 mL 1 M KPi Puffer (pH 7.0)

10 mL Lactose Lösung

1 mL Glucose Lösung

Antibiotika zur Selektion

1.2 Transformation von *E. coli*

Chemokompetente *E. coli* Zellen (100 μL Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden pDNA (0.5 - 1 μL) oder Ligation vermischt. Infolge eines Hitzeschritts (55 s, 42°C) wurde das Plasmid in die Zellen eingebracht. Anschließend wurde LB-Medium (900 μL) zum Transformationsmix gegeben und bei 37°C unter Schütteln für 1 h inkubiert (Erholungskultur). Nach dem Ausplattieren (50 - 200 μL der Kultur oder gesamte Kultur für Ligationen) auf LB Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurden die Platten 16 h bei 37 °C inkubiert. Von den Platten wurden dann Einzelklone für DNA-Isolierung, Vorkulturen, Screening PCR etc. verwendet.

1.3 Co-Expression mit Chaperonen

Für die Co-Expression von pET24b::*mcl40* mit Chaperonen wurden chemokompetente Zellen hergestellt, welche das Chaperon-Plasmid beinhalteten. Hierfür wurde das Plasmid pG-KJE8 (TaKaRa Bio Inc., enthält die entsprechenden Gene für GroEL, GroES, GrpE, DnaJ und DnaK) in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen transformiert und eine LB Vorkultur (5 mL), die das Selektionsantibiotikum Chloramphenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration) beinhaltete, bei 37°C (~200 rpm) für 16 h kultiviert. Anschließend wurde diese Vorkultur (250 μL) für die Inokulation von LB Medium (25 mL) genutzt und die Zellen wurden bei 37°C (~200 rpm) bis zu einer OD_{600} von 0.6 angezogen. Nach einem Zentrifugationsschritt (3,500 g, 5 min, 4°C), wurde das Zellpellet vorsichtig auf Eis in einem Eis-gekühlten und steril filtrierten Puffer A (15 mL; 50 mM CaCl_2 , 10 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, pH 6.2) resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf Eis inkubiert (60 min) und erneut durch Zentrifugation abgetrennt (3,500 g, 5 min, 4°C), der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig auf Eis in einem Eis-gekühlten und steril filtrierten Puffer B (0.8 mL; 50 mM CaCl_2 , 10 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, 20% Glycerol, pH 6.2)

resuspendiert. Die chemokompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert (100 μL Aliquots). Der pET24b::*mcl40* Vektor wurde dann in diese Zellen transformiert und anschließend für die Inokulation von LB-Vorkulturen (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chloramphenicol und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin Endkonzentration) genutzt. Für die Co-Expressionsexperimente wurde LB-Medium (20 mL) mit Vorkultur (200 μL) inokuliert und Tetracyclin (5 ng/mL Endkonzentration) sowie L-Arabinose (0.5 mg/mL Endkonzentration) wurden hinzugefügt. Sobald eine OD_{600} von 0.6 erreicht war, wurden die Zellen auf 18°C gekühlt und bei dieser Temperatur für 1 h inkubiert (~ 200 rpm). Dann erfolgte die Induktion mit IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid, 0.1 mM Endkonzentration) und es wurde bei 18°C für 16 h weiter inkubiert (~ 200 rpm). Die Zellen wurden abzentrifugiert (3,500 g, 5 min, 4°C), das Zellpellet resuspendiert (1.5 mL; 50 mM TrisHCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol), mittels Ultraschall lysiert, zentrifugiert (13,000 rpm, 20 min, 4°C) und Pellet sowie löslicher Überstand wurden per SDS-PAGE (12% Acrylamid) analysiert.

1.4 Solubilisierung von Mcl40 aus dem unlöslichen Pellet nach der Zell-Lyse

Das pET24b::*mcl40* Plasmid wurde in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen transformiert, eine Flüssigvorkultur (LB) aus einem Einzelklon angezogen und daraus die Expressionskultur (1 L TB, 10% Glycerol, Kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration) mit 10 mL der Vorkultur inokuliert. Sobald eine OD_{600} von 0.6 erreicht war, wurden die Zellen auf 18°C gekühlt und bei dieser Temperatur für 1 h inkubiert (~ 200 rpm). Dann erfolgte die Induktion mit IPTG (0.1 mM Endkonzentration) und es wurde bei 18°C für 16 h weiter inkubiert (~ 200 rpm). Die Zellen wurden abzentrifugiert (7,000 g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet resuspendiert (40 mL; 50 mM TrisHCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol). Nach Zugabe von PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 100 μL , 0.1 M Lösung) wurden die Zellen mittels Ultraschall lysiert (Branson digitales Ultraschallgerät, 40% Intensität 15 s an/45 s aus Zyklus für 40 min). Nach Zentrifugation des Lysats (15,000 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand für die SDS-PAGE Analytik abdekantiert. Ein Teil des Zellpellets (2 g) wurde mit Solubilisierungspuffer (80 mL; 40 mM TrisHCl, pH 8.0, 0.2% *N*-Lauroylsarcosin) bei 20°C , 200 rpm für 16 h inkubiert. Anschließend wurde die nicht-solubilierte Fraktion durch Zentrifugation abgetrennt (15,000 g, 20 min, 4°C), der Überstand mit miliQ H_2O (80 mL) verdünnt und über eine HitrapTM-Säule (GE Healthcare) aufgereinigt. Hierfür wurde ein ÄKTA FPLC-System (GE Healthcare) und eine Flussrate von 2 mL/min verwendet. Die Ni-Säule wurde zunächst mit dem Solubilisierungspuffer (Puffer A: 20 mM TrisHCl, pH 8.0, 0.1% *N*-Lauroylsarcosin) equilibriert, mit dem Überstand beladen und ungebundenes Protein wurde in einem Waschschrift mit Puffer A (5 - 10 Säulenvolumen) entfernt. Schwach gebundenes Protein wurde in einem Gradienten-Waschschrift entfernt (0 - 10% Puffer B über 10 mL und anschließend 25 mL 10% Puffer B). Die Elution erfolgte in einem Gradienten (10 - 100%

Puffer B, 20 mM HEPES pH 7.8, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10% Glycerol). Das aufgereinigte Protein präzipitierte leicht beim Aufkonzentrieren, daher wurde das Eluat dialysiert (25 mM HEPES, 300 mM KCl, 0.1 % *N*-Lauroylsarcosin, 10 % Glycerol). Proteine wurden grundsätzlich aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Tabelle 4. a) PCR-Ansatz zur Klonierung der Mcl40-Konstrukte. b) Temperaturprogramm des Thermocyclers.

a) PCR Ansatz	[μ L]	b) Programm	[°C]	Zeit [min]
2x PrimeStar Puffer (GC enhancer)	25	Initiation	98	1
DNTPs (2.5 mM)	4	Denaturierung	98	10 s
<i>forward</i> Primer	1	Annealing	58	10 s
<i>reverse</i> Primer	1	Elongation	72	1.5
Templat-DNA	1	Abkühlung	72	5
H ₂ O	17	Endtemperatur	4	∞
PrimeStar Polymerase	1			

1.6 Klonierung der Mcl40-MBP- und SUMO-Konstrukte

Die folgenden Primer wurden für die Klonierung des Mcl40-MBP-Konstruktes verwendet (Homologiesequenzen für die Gibson Assembly sind unterstrichen):

Fw: 5' CTGTACTTCCAATCCGGATCCATGAAGACGTCCGGACACACCTCTGCCTCA 3'

Rv: 5' GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTCAGTTTCTGGTGTTCGGTTTTGATGTTGCCTT
TGACGTG 3'

Für die Gibson Assembly wurde das Restriktions-verdaute (BamHI/XhoI) und gereinigte MBP-Plasmid und das gereinigte PCR-Produkt (Insert : Plasmid in einem Verhältnis von 3 : 1) mit dem Gibson Assembly Mix (NEB, 5 μ L) in einem Gesamtvolumen von 10 μ L vermischt. Nach der Inkubation (40 min, 50°C) wurden 3 μ L des Assemblymixes in chemokompetente *E. coli* DH10 β Zellen transformiert und auf LB-Platten kultiviert (Kanamycin als Selektionsantibiotikum).

Die folgenden Primer wurden für die Klonierung des Mcl40-SUMO-Konstruktes verwendet (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen):

Fw: 5' AAAAAGGATCCATGAAGACGTCCGGACACACCTCT 3' (BamHI)

Rv: 5'AAAAACTGCAGTCAGTTTCTGGTGTTCGGTTTTGATGTTG 3' (PstI)

Für die Ligation wurde das Restriktions-verdaute (BamHI/PstI) und gereinigte pETSUMO-Plasmid sowie das Restriktions-verdaute (BamHI/PstI) und gereinigte gereinigte PCR-Produkt (Insert : Plasmid in einem Verhältnis von 5 : 1) in einem Gesamtvolumen von 20 μ L mit T4 DNA Ligase inkubiert. Nach der Inkubation (16°C, 16 h) wurden 5 μ L des Ligationmixes in chemokompetente *E. coli* DH10 β Zellen transformiert und auf LB-Platten kultiviert (Kanamycin als Selektionsantibiotikum).

Die erfolgreiche Insertion des Gens wurde durch Screening-PCR der Kolonien und analytischen Restriktionsverdau überprüft. Die Sequenz wurde mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

1.7 Expressionstests

Expressionstests wurden in kleinerem Maßstab durchgeführt (20 mL Kulturen), um den Einfluss verschiedener Medien (LB-, TB-, oder AI-Medium), Expressionsstämme (*E. coli* BL21-Gold (DE3) oder RIPL), IPTG-Konzentrationen oder Temperaturen zu testen. Der lösliche Überstand des Zell-Lysats wurde in kleinem Maßstab mittels Ni-NTA Spin-Säulen (Qiagen) durchgeführt.

1.8 Heterologe Produktion von Mcl40MBP

Das pETMBP::*mcl40* Plasmid wurde in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen transformiert, eine Flüssigvorkultur (LB) aus einem Einzelklon angezogen und daraus die Expressionskultur (1 L TB, 10% Glycerol, Kanamycin 50 μ g/mL Endkonzentration) mit 10 mL der Vorkultur inokuliert. Sobald eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht war, wurden die Zellen auf 18°C gekühlt und bei dieser Temperatur für 1 h inkubiert (~200 rpm). Dann erfolgte die Induktion mit IPTG (0.1 mM Endkonzentration) und es wurde bei 18°C für 16 h weiter inkubiert (~200 rpm). Die Zellen wurden abzentrifugiert (7,000 g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in Puffer A resuspendiert (40 mL; 50 mM TrisNaOH, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol). Nach Zugabe von PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 100 μ L, 0.1 M Lösung) wurden die Zellen mittels Ultraschall lysiert, zentrifugiert (15,000 g, 20 min, 4°C) und der Überstand wurde auf eine MBPTrap™-Säule (GE Healthcare) geladen. Ungebundenes Protein wurde in einem Waschschrift ausgewaschen (Puffer A). Anschließend wurde das Zielprotein eluiert (80 mL Puffer A, der mit 40 mg Maltose versetzt wird). Für die Größenausschlusschromatographie wurde Puffer A verwendet (Superdex S200 16/60 Säule, GE Healthcare, Flussrate 1.0 mL/min). Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford Assay bestimmt (siehe 1.12). Die heterologe Expression von *mcl40* ergab 4.4 mg aufgereinigtes Protein pro 1 L Kultur. Für die TEV-Spaltung des MBP-Tags wurden die Elutionsfraktionen mittels Zentrifugation (3,500 g, 4°C) in Amicon Ultra-15 30,000 MWCO Spin-Konzentrator (EMD Millipore) auf 1.5 mL aufkonzentriert, dann wurde TEV (200 μ L) zugegeben und für 16 h bei 4°C inkubiert.

1.9 Heterologe Produktion von Mcl21

Das pHis8::*mcl21* Plasmid (Kanamycin-Resistenz) wurde in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen transformiert. Die Expression und Aufreinigung erfolgte wie in 1.4 beschrieben (Puffer A: 25 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol; Puffer B: 25 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol). Das eluierte Protein wurde aufkonzentriert und mittels PD-10 Entsalzungssäule (GE Healthcare) in den Lagerungspuffer (25 mM HEPES, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerol) überführt. Es wurden 34.5 mg Protein pro 1 L Kultur erhalten.

1.10 Heterologe Produktion von Mcl24

Das pHis8::*mcl24* Plasmid (Kanamycin-Resistenz) wurde in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen transformiert. Die Expression und Aufreinigung erfolgte wie in 1.4 und 1.9 beschrieben. Als Lagerungspuffer diente 25 mM HEPES, pH 7.6, 200 mM NaCl, 10% Glycerol. Es wurden 55 mg Protein pro 1 L Kultur erhalten. Die Abspaltung des His-Tags erfolgte durch Zugabe von Thrombin (200 μ L) und Inkubation für 16 h bei 4°C bei gleichzeitiger Dialyse in den Größenausschlusschromatographie-Puffer (15 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% Glycerol).

1.11 Kristallisation von *holo*-Mcl24 und Co-Kristallisation

Die rekombinante und über Größenausschlusschromatographie gereinigte Mcl24 wurde mittels der Dampfdiffusionsmethode (hängender Tropfen) kristallisiert. Hierfür wurden 1 μ L Proteinlösung (6 - 10 mg/mL Protein-Endkonzentration) mit 1 μ L Kristallisationslösung (21 - 27% PEG-600, 10 - 50 mM MgCl₂, 50 mM HEPES pH 7.0) vermischt und bei 7°C inkubiert. Initiale Kristalle wurden nach 16 h beobachtet (21% PEG-600, 10 mM MgCl₂, 6 mg/mL Protein). Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen können MgCl₂- (10 - 30 mM), PEG-600- (15 - 21%) sowie Protein-Konzentrationen (4 - 8 mg/mL) optimiert werden.

Tabelle 5. a) Proteinlösung zur Kristallisation von *holo*-Mcl24 mit variierender Proteinkonzentration. b) Proteinlösung für die Co-Kristallisation von *holo*-Mcl24 mit Merochlorin D (68).

Proteinlösung <i>holo</i> -Mcl24	[μ L]	Proteinlösung Co-Kristallisation	[μ L]
Na ₃ VO ₄ (50 mM)	2	Merochlorin D (68, 10 mM in DMSO)	2
Mcl 24 (22 mg/mL)	x	Na ₃ VO ₄ (50 mM)	2
Puffer (15 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% Glycerol)	ad 20 μ L	Mcl 24 (22 mg/mL)	x
		Puffer (15 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% Glycerol)	ad 20 μ L

1.12 Bradford Assay

Tabelle 6. Zusammensetzung des Bradford Assays zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

Assay-Komponenten	[μL]
H ₂ O	1200
Bradford-Mix	300
Enzym	1

Die Assay-Mischung wurde gut durchmischt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Absorption einer Blank-Messung ohne Enzym wurde abgezogen. Der ermittelte Wert wurde dann anhand einer Kalibriergeraden (erstellt aus einer BSA-Verdünnungsreihe, Abbildung 14) in die Proteinkonzentration umgerechnet.

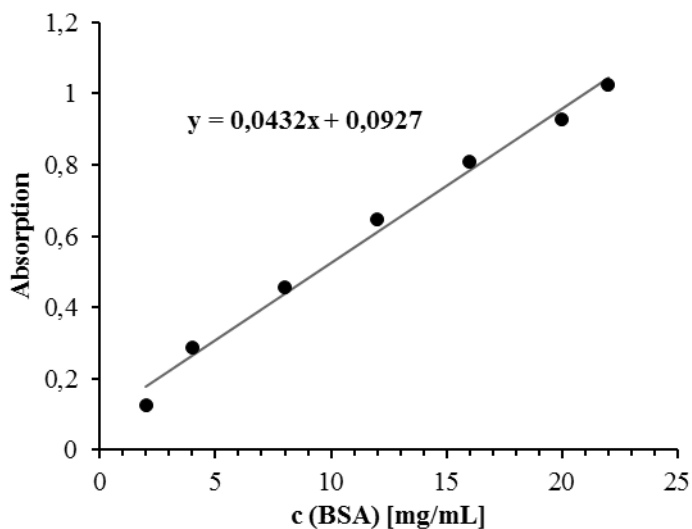


Abbildung 14. Kalibriergerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay anhand einer Verdünnungsreihe von BSA (Bovines Serum Albumin).

1.13 Kultivierung von *Streptomyces* CNH-189

Ein Glycerolstock von Sporen des Produzentenstamms *Streptomyces* CNH-189 (100 μL) wurde auf einer A1 Agarplatte ausgestrichen und vereinzelt. Nach Inkubation bei 27°C für 2 Tage wurde die A1 Platte bei rt gelagert. Für Flüssigkulturen wurde entweder der Glycerolstock (50 μL) oder eine vereinzelt Kolonie von der A1 Agarplatte für die Inokulation von TSBY oder A1 Medium (10 mL in einem 50 mL Kulturkolben mit Sprungfeder) genutzt. Die Aktivierungskultur wurde bei 27°C für 24 h inkubiert (~200 rpm), dann wurde daraus eine größere Vorkultur inokuliert (100 μL der Aktivierungskultur für die Inokulation von 30 mL TSBY oder A1) und erneut bei 27°C für 24 h kultiviert (~200 rpm). Die Kulturen in Produktionsmedium (jeweils 1 L M1 Medium) wurden mit 30 - 50 mL der Vorkultur inokuliert

und bei 27°C für 24 h kultiviert (~200 rpm). Vor der Zugabe zur Kultur wurde der XAD7HP Resin (20 g je 1L Kultur) mit MeOH (50 mL) für 16 h inkubiert, dann wurde MeOH abdekantiert, der Resin mit H₂O gewaschen (3 × 100 mL), autoklaviert und bei 60°C getrocknet. Der Resin wurde dann zur Kultur (Produktionsmedium) gegeben und die Kultur wurde für weitere 5 Tage bei 27°C inkubiert (~200 rpm).

1.14 Naturstoff-Isolierung

Zellen und Resin wurden durch Filtration durch ein Seihtuch abgetrennt und der Filtrerrückstand wurde mit Aceton (2 × 500 mL) extrahiert und bei 27°C für 30 min (~200 rpm) inkubiert. Aus den vereinten Extrakten wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 250 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 200 - 400 mg des Rohprodukts pro 1 L Kultur (braunes Öl) erhalten. Das Rohprodukt wurde über eine präparative Phenomenex Luna C18(2), 5 µm, 100 x 21.5 mm Säule mit einer Flussrate von 10 mL/min und folgendem Gradienten aufgereinigt: H₂O (0.1% TFA)/MeCN (0.1% TFA): 50/50 für 5 min; 50/50 → 5/95 in 15 min; 5/95 für 5 min; 5/95 → 50/50 in 2 min; 50/50 für 3 min. Merochlorin D (**68**) enthaltende Fraktionen wurden vereint, durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert und MeCN wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Wurde A1- statt TSBY-Medium für die Vorkultur verwendet, dann wurde **68** in verbesserter Reinheit erhalten (Ausbeute: 15 mg Merochlorin D (**68**), gelbliches Öl, pro 1 L Kultur).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 11.72 (s, 1H), 7.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.35 (br s, 1H, OH), 5.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J* = 15.1, 6.7 Hz, 1H), 2.59 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 2.41 (m, 2H), 2.32 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.20 (s, 3H) ppm.

MS (Ion Trap): = 459 [M-H]; R_t = 23.5 min

HRMS (EI) berechnet für C₂₆H₃₂ClO₅⁻ [M-H⁻] 459.1943, gefunden 459.1934.

RP-HPLC-MS Analytik wurde mit einer Phenomenex Luna C18(2), 5 µm, 150 x 4.6 mm Säule und folgendem Gradienten durchgeführt : 10 → 100% B (20 min), 100% B (4 min), 100 → 10% B (3 min), 10% B (3 min), mit A = H₂O mit 0.1% Ameisensäure und B = MeCN mit 0.1% Ameisensäure (Flussrate: 0.75 mL/min).

LC: Agilent Technologies 1200 Series System mit einem Dioden-Array-Detektor

MS: Bruker Amazon SL ESI-Ion Trap Massenspektrometer

Datenauswertung: Bruker Compass Data Analysis 4.2 SR2

Hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS) wurde mit einer Phenomenex Luna C18(2), 5 μm , 150 x 4.6 mm Säule und folgendem Gradienten durchgeführt: 10% B (2 min), 10 \rightarrow 100% B (6 min), 100% B (5 min), 100 \rightarrow 10% B (2 min), mit A = H_2O mit 0.1% Ameisensäure und B = MeCN mit 0.1% Ameisensäure (Flussrate: 0.75 mL/min).

LC: Agilent Technologies 1200 Series System mit einem Dioden-Array-Detektor

MS: Agilent Technologies 6530 akkurates Q-TOF Massenspektrometer

Datenauswertung: MassHunter

1.15 Enzymatische Assays

VHPO *in vitro* Assays wurden in einem Gesamtvolumen von 0.1 - 1 mL durchgeführt und beinhalteten Substrat (1 - 10 μL einer 100 mM Stocklösung in DMSO; 10 mM Endkonzentration im Assay), MES or HEPES Puffer (pH 6.0 oder pH 8.0, 50 mM), KCl (0.1 M), Na_3VO_4 (0.1 mM), H_2O_2 (0.5 mM - 1mM) und VHPO (20 μM). Assays mit Prämerochlorin (**70**) als Substrat wurden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Für die Analytik wurden 50 μL des Assays entnommen und MeOH (50 μL) hinzugegeben, um das Enzym auszufällen. Nach Zentrifugation (13,000 g, 2 min) und Filtration der Probe durch einen Spritzenfilter wurde die Probe per LC-MS analysiert. Assays in größerem Maßstab enthielten 2 - 5 mg Merochlorin D (**68**) in einem Gesamtvolumen von 10 mL. Für optimalen Umsatz sowie minimale Bildung von Nebenprodukten wurde der Assay bei pH 8.0 durchgeführt und das Gesamtvolumen von 10 mL auf Einzelreaktionen von 1 mL aufgeteilt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCN zu den kombinierten Einzelreaktionen (10 mL) zur Präzipitation des Enzyms gestoppt. Die mit MeCN versetzte Assay-Lösung wurde im Ultraschallbad inkubiert (10 min) und nach Zentrifugation (4,000 rpm, 4°C, 15 min) wurde der Überstand abdekantiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert (3 \times 10 mL), die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels ^1H - und 2D-NMR Spektroskopie untersucht.

1.16 MCD Assay^[74]

Eine 1 mM Stocklösung von MCD (**12**) wurde in 2 M wässriger NaOAc-Lösung hergestellt. Assays wurden in Quartz-Küvetten in einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Zu der

Reaktionslösung (900 μL) bestehend aus MES Puffer (50 mM, pH 6.0) oder HEPES Puffer (50 mM, pH 8.0), MCD (50 μM), KBr (200 mM) or KCl (200 mM), Na_3VO_4 (1 μM) und VHPO (1 μL des aufgereinigten und aufkonzentrierten Enzyms oder Verdünnungen hiervon) wurde H_2O_2 (100 μL , 1 mM Endkonzentration) hinzugegeben. Die Abnahme der Absorption bei 290 nm wurde photometrisch über mehrere Minuten detektiert.

1.17 Assays mit Mcl21

Eine Mischung aus HEPES (500 mM, pH 8.0, 100 μL), KCl (1 M, 100 μL), Glycerol (50%, 100 μL), DTT (Dithiothreitol, 10 mM, 5 μL) und H_2O (80 μL) wurde mit Argon gespült und unter Argon gehalten. Anschließend wurde Mcl21 (140 μL , 6.9 mg/mL), SAM (100 mM, 50 μL) und Substrat (**70**, **74**, **113** oder **59**, 70.5 μL einer 100 mM Stocklösung in DMSO) hinzugegeben. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von MeOH (500 μL , mit 0.1% Ameisensäure) gestoppt und per LC-MS analysiert.

1.18 Kaskadenreaktionen

Kaskadenreaktionen wurden wie in 1.15 beschrieben in einem Gesamtvolumen von 100 μL durchgeführt. Nach 5 h Inkubation bei rt, wurde Mcl21 (12 μL , 6.9 mg/mL) und SAM (100 mM, 1 μL) hinzugefügt.

1.19 Fütterungsexperiment

Für das Fütterungsexperiment wurde TB-Medium (50 mL) mit 2% einer LB-Vorkultur inokuliert und 2.5 h bei 37°C (~200 rpm) inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Temperatur auf 18 °C verringert und die Kultur 1 h auf diese Temperatur abgekühlt (~200 rpm), bevor die Induktion mit IPTG (0.1 mM Endkonzentration) erfolgte. Nach 3 h wurde Merochlorin D (**68**, 1 mg in 10 μL DMSO) und Na_3VO_4 (50 μL , 10 mM) zugegeben und für 14 h bei 18°C (~200 rpm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (7,000 g, 5 min, 4°C) und Zellpellet sowie Kulturüberstand extrahiert. Der Überstand wurde mit EtOAc (3 \times 50 mL) extrahiert, die vereinten organischen Extrakte über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Zellpellet wurde mit MeOH (25 mL) unter Beschallung im Ultraschallbad (30 min) extrahiert, zentrifugiert (7,000 g, 5 min, 4°C), der Überstand abdekantiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Rohextrakte aus Pellet und Überstand wurden separat per LC-MS analysiert und in beiden Proben wurde lediglich **68** detektiert.

III Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AaeUPO	Peroxygenase aus <i>Agrocybe aegerita</i>
Abs	Absorption
abs.	absolut
AmVHPO	VHPO aus <i>Acaryochloris marina</i>
AmVHPOII	Isoenzym II, VHPO aus <i>Acaryochloris marina</i>
AnVHPO	VHPO aus <i>Ascophyllum nodosum</i>
AnVHPOII	Isoenzym II, VHPO aus <i>Ascophyllum nodosum</i>
Äq.	Äquivalente
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
calc./ber.	berechnet
CiVHPO	VHPO aus <i>Curvularia inaequalis</i>
CND	Kohlenstoff Nanodots
CoA	Coenzym A
CoVHPO	VHPO aus <i>Corallina officinalis</i>
CPO	Häm-Fe-Chlorperoxidase aus <i>Caldariomyces fumago</i>
CpVHPO	VHPO aus <i>Corallina pilulifera</i>
CYP, P450	Cytochrom P450 Monooxygenasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DpVHPO	VHPO aus <i>Delisea pulchra</i>
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	electron impact, Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gaschromatographie

gef.	gefunden
GOx	Glucose Oxidase
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HRMS	high resolution MS, hochaufgelöste Massenspektrometrie
HRP	horseradish peroxidase
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
<i>i</i> PrNH ₂	Isopropylamin
<i>i</i> Pr ₂ NH	Diisopropylamin
<i>i</i> PrOH	Isopropanol
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
LB	lysogeny broth
LC-MS	Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
LED	light emitting diode
<i>Ln</i> VHPO	VHPO aus <i>Laurencia nipponica</i>
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
m.p.	melting point, Schmelzpunkt
MBP	Maltosebindungsprotein
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MCD	Monochlordimedon
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
nd	not determined, nicht bestimmt
NMR	nuclear magnetic resonance, kernmagnetische Resonanz
Nu	beliebiges Nukleophil
OD	optische Dichte

PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PDB	protein data bank
PET	Positron-Emissions-Tomographie
Ph	Phenyl
PLP	Pyridoxalphosphat
PVC	Polyvinylchlorid
QD	quantum dot
quant.	quantitativ
R _f	relative Wanderungsgeschwindigkeit
Rf	Riboflavin
RFTA	Riboflavintetraacetat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rt	room temperature, Raumtemperatur
SAM	(S)-Adenosylmethionin
SET	single electron transfer
sp.	species, Spezies
SUMO	small ubiquitin-related modifier, kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator
T	Temperatur
TB	terrific broth
TBCA	2,4,4,6-Tetrabrom-2,5-cyclohexadienon
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TEV	tobacco etch virus
TFA	Trifluoressigsäure
THN	1,3,6,8-Tetrahydronaphthalin
TON	turnover number, katalytische Produktivität
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
VBPO	Vanadium-abhängige Bromperoxidase
VCPO	Vanadium-abhängige Chlorperoxidase
VHPO	Vanadium-abhängige Haloperoxidase
VIPO	Vanadium-abhängige Iodperoxidase
Vis	visible light, sichtbares Licht
vol%	Volumenanteil in %
ZgVHPO	VHPO aus <i>Zobellia galactanivorans</i>
λ _{max}	Absorptionsmaximum

IV Danksagung

Zunächst möchte ich meiner Betreuerin Frau *Prof. Dr. Tanja Gulder* für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, die interessante Themenstellung und die Gewährleistung vieler Freiheiten in der flexiblen Erarbeitung meiner Projekte danken. Ich weiß das entgegengebrachte Vertrauen sowie die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen sehr zu schätzen. Auch für die Gelegenheit der Forschungsaufenthalte in San Diego, der Teilnahme an spannenden nationalen und internationalen Konferenzen und für die gewährten Einblicke in das Erstellen von Forschungsanträgen bin ich sehr dankbar. Zuletzt gilt mein Dank dem kritischen Korrekturlesen und der Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn *Prof. Dr. Thomas Brück* für die Übernahme des Zweitgutachtens, Herrn *Prof. Dr. Markus Nett* für das Erstellen des externen Gutachtens sowie dem Drittprüfer Herrn *Prof. Dr. Michael Groll* und der Vorsitzenden Frau *Prof. Dr. Corinna Hess*.

Frau *Kerstin Voigt* danke ich für die freundliche und kompetente Unterstützung in vielen bürokratischen Angelegenheiten. Der gesamten NMR-Abteilung der TU München und insbesondere *Christine Schwarz* danke ich für das Durchführen von Sondermessungen. Herrn *Burghard Cordes* danke ich für die Einweisung in HRMS-Messungen und *Markus, Volker* und *Barbara* für Unterstützung bei technischen Fragen und der Durchführung von LC-HRMS-Messungen.

Der *Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU)* möchte ich an dieser Stelle nicht nur für die Gewährung eines Promotionsstipendiums, sondern insbesondere auch für die ideelle Förderung danken. Ich habe die Stipendiatenseminare, den Austausch mit Doktoranden diverser Fachrichtungen und die Möglichkeit, über den Tellerrand zu schauen und innovative Umweltprojekte kennenzulernen, sehr genossen. Meinem DBU-Betreuer Herrn *Dr. Hans-Christian Schaefer* danke ich außerdem für seine Unterstützung und für ermutigende Gespräche. Für weitere finanzielle Unterstützung durch *BaCaTec*, *DAAD*, *GDCh*, *CiPSM* und die *TUM Graduate School* bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön gilt allen Mitgliedern der *AK TaGulder*, *AK ToGulder* und *AK Bach*. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Gespräche, die Bereitstellung von Chemikalien und Geräten und die angenehme Atmosphäre. *Anna* ich danke dir für deine Freundschaft, die tolle Zeit in Würzburg, Sevilla und Bayreuth, viele ehrliche Gespräche, unzähliges Korrekturlesen von Folien und Texten sowie für deine Backkünste! Herrn *Prof. Dr. Tobias Gulder* und Herrn

Prof. Dr. Michael Groll danke ich für die Bereitstellung ihrer Biolabore, ihre Unterstützung und für die erfolgreiche Kooperation. Insbesondere möchte ich mich auch bei *Christian, Elke, Anna, Becki* und *Katharina* für viele hilfreiche Tipps und die Labororganisation bedanken sowie bei *Alois, Hartmut, Basti* und *Anica* für die lustige Auflockerung neben Proteinaufreinigungen und die schöne gemeinsame Zeit im Labor. *Haissi* danke ich nicht nur für fachliche Hilfestellungen, sondern auch für die grandiose gemeinsame Zeit in San Diego, Unterstützung bei der Wohnungssuche, Ausflüge und vieles mehr!

Ganz besonders danke ich allen Kooperationspartnern, die mir stets neue Blickwinkel und eine Methodenvielfalt ermöglicht haben, die sonst nicht vorstellbar gewesen wäre:

Zunächst danke ich *Annika* für ihre Einführung in mikrobiologische und kristallographische Methoden, die tolle Zusammenarbeit, Freundschaft, das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie viele gemeinsame Kaffeepausen und Freizeitaktivitäten. Es war ein perfekter Start in die Doktorarbeit, mit dir zusammen zu arbeiten!

Außerdem danke ich Herrn *Prof. Dr. Burkhard König* für die spannende Kooperation und die photochemische Expertise. Vielen Dank, *Melli* für die schöne Zusammenarbeit und das gemeinsame Experimentieren in Regensburg und München. *Tonda*, I really appreciate all your effort, patience and thorough investigations to finally make this project a success! It was a pleasure to meet you in Regensburg, Munich and Prague not only on a scientific basis, but also to get to know the best Czech restaurants.

Frau *Prof. Dr. Kathrin Castiglione* möchte ich für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen sowie die Bereitstellung genomischer DNA und Kryokulturen von *A. marina* danken. *Lara*, vielen Dank für die Einweisung in die Nutzung der Blasensäulen und für schöne gemeinsame Mittags- und Kaffeepausen. *Florian Sedlmair* und *Katrin Gärtner* sowie Herrn *Dr. Haslbeck* bin ich dankbar für tatkräftige Unterstützung in Klonierung, Proteinaufreinigung und der Messung von CD-Spektren.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank *Johannes Döbber* und Frau *Prof. Martina Pohl*. Vielen Dank für die anregenden Diskussionen auf der Biotrans Konferenz und die daraus entstandene Kooperation zur Immobilisierung von Halogenierungsenzymen.

I would like to thank *James Payne* for exchanging interesting ideas on VHPOs, DFT calculations and for showing me around the institute in Stanford.

A huge appreciation goes to *Paul* for our great team work. It was an absolute pleasure and so much fun to work together with you, thanks for teaching me so many methods in the lab, for your genome mining efforts, proof-reading of English texts and last but not least of course for our really exciting joint project on the biosynthesis of cyanobacterin!

I owe my gratitude to *Prof. Bradley Moore* for giving me the opportunity to work as a research intern in his lab, it was a truly unforgettable time! Thanks to all the members of the Moore lab, for your kindness, good mood and support. Special thanks goes to *Shaun* for introducing me to natural product isolation methods and the VHPOs studied in the Moore lab. Thanks for all the laughter, help and motivation...VHPO team! And of course thanks to the whole TG gang! Thanks to *Lauren, Fergus* and *Renata* for so much fun not only in the lab, but also during our great trips and activities. *Anya, Jon* and *Michelle* thank you for advice in culturing conditions, protein crystallography and your friendliness.

Meinen Forschungspraktikanten *Yelyzaveta Tetko, Philipp Thiele, Philipp Anger Alexander Albert* danke ich für das Interesse und die fleißige Mitarbeit an meinen Forschungsprojekten.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich stets sehr unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Danke für euren Rückhalt! Ebenso danke ich meiner gesamten Familie und all meinen Bonner und Münchner Freunden, ihr habt mit euren lieben, ermutigenden Worten und Freizeit-Ablenkungen mein Durchhaltevermögen sehr bestärkt.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann *Martin* für seine bedingungslose Unterstützung danken, nicht nur während der Doktorarbeit, sondern auch während des Studiums, ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen! Danke, dass du immer an mich glaubst, für die vielen wunderbaren gemeinsamen Erlebnisse und Erinnerungen und für alles, was wir zusammen gemeistert haben.

V Literaturverzeichnis

- [1] G. W. Gribble, *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4044-4136.
- [2] K. K. J. Chan, D. O'Hagan, in *Methods in Enzymology*, Vol. 516 (Ed.: D. A. Hopwood), Academic Press, **2012**, pp. 219-235.
- [3] V. Agarwal, Z. D. Miles, J. M. Winter, A. S. Eustáquio, A. A. El Gamal, B. S. Moore, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5619-5674.
- [4] M. Groll, R. Huber, B. C. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136-5141.
- [5] T. A. M. Gulder, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9346-9367.
- [6] W. G. Kim, J. P. Kim, C. J. Kim, K. H. Lee, I. D. Yoo, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 20-25.
- [7] J. G. Lee, I. D. Yoo, W. G. Kim, *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 795-797.
- [8] L. E. X. Leong, S. Khan, C. K. Davis, S. E. Denman, C. S. McSweeney, *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *8*, 55.
- [9] B. M. Howard, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 41-44.
- [10] https://njardarson.lab.arizona.edu/sites/njardarson.lab.arizona.edu/files/2016Top200PharmaceuticalRetailSalesPosterLowResV3_0.pdf.
- [11] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061-5084.
- [12] Y. Lu, T. Shi, Y. Wang, H. Yang, X. Yan, X. Luo, H. Jiang, W. Zhu, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2854-2862.
- [13] P. Metrangolo, H. Neukirch, T. Pilati, G. Resnati, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 386-395.
- [14] O. Jacobson, X. Chen, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1048-1059.
- [15] <https://www.lernhelfer.de/schuelerlexikon/chemie-abitur/artikel/halogenierte-kohlenwasserstoffe>.
- [16] <http://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/dioxine>.
- [17] D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1763-1768.
- [18] L. P. Hager, D. R. Morris, F. S. Brown, H. Eberwein, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1769-1777.
- [19] R. Wever, H. Plat, E. de Boer, *BBA Protein. Struct. Mol. Enzym.* **1985**, *830*, 181-186.
- [20] R. Wever, B. E. Krenn, R. Renirie, in *Methods in Enzymology*, Vol. 605 (Ed.: B. S. Moore), Academic Press, **2018**, pp. 141-201.
- [21] S. Tegtmeier, F. Ziska, I. Pisso, B. Quack, G. J. M. Velders, X. Yang, K. Krüger, *Atmos. Chem. Phys.* **2015**, *15*, 13647-13663.
- [22] D. Rehder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 148-167.
- [23] P. Ortiz-Bermúdez, K. C. Hirth, E. Srebotnik, K. E. Hammel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2007**, *104*, 3895-3900.
- [24] J. Latham, E. Brandenburger, S. A. Shepherd, B. R. K. Menon, J. Micklefield, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 232-269.
- [25] C. Leblanc, H. Vilter, J.-B. Fournier, L. Delage, P. Potin, E. Rebuffet, G. Michel, P. L. Solari, M. C. Feiters, M. Czjzek, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301-302*, 134-146.
- [26] C. Wagner, M. El Omari, G. M. König, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 540-553.
- [27] A. Butler, M. Sandy, *Nature* **2009**, *460*, 848-854.
- [28] A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1996**, *93*, 392-396.
- [29] J. M. Winter, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18577-18581.
- [30] R. Gupta, G. Hou, R. Renirie, R. Wever, T. Polenova, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5618-5628.
- [31] J. Littlechild, E. Garcia-Rodriguez, A. Dalby, M. Isupov, *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 291-296.
- [32] M. Weyand, H.-J. Hecht, M. Kiess, M.-F. Liaud, H. Vilter, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 595-611.
- [33] M. N. Isupov, A. R. Dalby, A. A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G. N. Murshudov, J. A. Littlechild, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1035-1049.
- [34] J. Littlechild, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237*, 65-76.
- [35] E. Garcia-Rodriguez, T. Ohshiro, T. Aibara, Y. Izumi, J. Littlechild, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 275-282.

- [36] J.-B. Fournier, E. Rebuffet, L. Delage, R. Grijol, L. Meslet-Cladière, J. Rzonca, P. Potin, G. Michel, M. Czjzek, C. Leblanc, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 7561-7573.
- [37] W. Hemrika, R. Renirie, S. Macedo-Ribeiro, A. Messerschmidt, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23820-23827.
- [38] R. Renirie, W. Hemrika, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11650-11657.
- [39] N. Tanaka, Z. Hasan, R. Wever, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *356*, 288-296.
- [40] T. Ohshiro, J. Littlechild, E. Garcia-Rodriguez, M. N. Isupov, Y. Iida, T. Kobayashi, Y. Izumi, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1566-1571.
- [41] H. S. Soedjak, A. Butler, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 5015-5017.
- [42] T. Ohshiro, W. Hemrika, T. Aibara, R. Wever, Y. Izumi, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 595-601.
- [43] J. Littlechild, E. Garcia Rodriguez, M. Isupov, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 617-621.
- [44] U. Christmann, H. Dau, M. Haumann, E. Kiss, P. Liebisch, D. Rehder, G. Santoni, C. Schulzke, *Dalton Trans.* **2004**, 2534-2540.
- [45] Z. Hasan, R. Renirie, R. Kerkman, H. J. Ruijssenaars, A. F. Hartog, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9738-9744.
- [46] E. de Boer, H. Plat, M. G. Tromp, R. Wever, M. C. Franssen, H. C. van der Plas, E. M. Meijer, H. E. Schoemaker, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 607-610.
- [47] M. Shimonishi, S. Kuwamoto, H. Inoue, R. Wever, T. Ohshiro, Y. Izumi, T. Tanabe, *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 105-110.
- [48] E. E. Coupe, M. G. Smyth, A. P. Fosberry, R. M. Hall, J. A. Littlechild, *Protein Expr. Purif.* **2007**, *52*, 265-272.
- [49] A. Butler, J. N. Carter-Franklin, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 180-188.
- [50] D. Wischang, J. Hartung, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9456-9463.
- [51] D. Wischang, M. Radlow, H. Schulz, H. Vilter, L. Viehweger, M. O. Altmeyer, C. Kegler, J. Herrmann, R. Müller, F. Gaillard, L. Delage, C. Leblanc, J. Hartung, *Bioorg. Chem.* **2012**, *44*, 25-34.
- [52] N. Itoh, A. K. Hasan, Y. Izumi, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 477-484.
- [53] J. J. Dong, E. Fernández-Fueyo, J. Li, Z. Guo, R. Renirie, R. Wever, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6207-6210.
- [54] J. N. Carter-Franklin, J. D. Parrish, R. A. Tschirret-Guth, R. D. Little, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3688-3689.
- [55] J. N. Carter-Franklin, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15060-15066.
- [56] F. Akio, A. Mya, T. Yasunori, N. Masao, T. Mamoru, M. Akio, *Chem. Lett.* **1994**, *23*, 2307-2310.
- [57] J. Ishihara, Y. Shimada, N. Kanoh, Y. Takasugi, A. Fukuzawa, A. Murai, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8371-8382.
- [58] R. A. Tschirret-Guth, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 411-412.
- [59] J. S. Martinez, G. L. Carroll, R. A. Tschirret-Guth, G. Altenhoff, R. D. Little, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3289-3294.
- [60] E. de Boer, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12326-12332.
- [61] N. Itoh, Y. Izumi, H. Yamada, *Biochemistry* **1987**, *26*, 282-289.
- [62] M. Sandy, J. N. Carter-Franklin, J. D. Martin, A. Butler, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12086-12088.
- [63] H. B. ten Brink, A. Tuynman, H. L. Dekker, W. Hemrika, Y. Izumi, T. Oshiro, H. E. Schoemaker, R. Wever, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6780-6784.
- [64] A. But, J. Le Nôtre, E. L. Scott, R. Wever, J. P. Sanders, *ChemSusChem* **2012**, *5*, 1199-1202.
- [65] S. M. K. McKinnie, Z. D. Miles, B. S. Moore, in *Methods Enzymol*, Vol. 604, (Ed.: B. S. Moore), Academic Press, **2018**, pp. 405-424.
- [66] L. Kaysser, P. Bernhardt, S. J. Nam, S. Loesgen, J. G. Ruby, P. Skewes-Cox, P. R. Jensen, W. Fenical, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11988-11991.
- [67] G. Sakoulas, S. J. Nam, S. Loesgen, W. Fenical, P. R. Jensen, V. Nizet, M. Hensler, *PLoS One* **2012**, *7*, e29439.

- [68] S. Diethelm, R. Teufel, L. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11023-11026.
- [69] R. Teufel, L. Kaysser, M. T. Villaume, S. Diethelm, M. K. Carbullido, P. S. Baran, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11019-11022.
- [70] H. P. Pepper, J. H. George, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12170-12173.
- [71] R. Meier, S. Strych, D. Trauner, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2634-2637.
- [72] Z. D. Miles, S. Diethelm, H. P. Pepper, D. M. Huang, J. H. George, B. S. Moore, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 1235-1242.
- [73] J. M. Winter, M. C. Moffitt, E. Zazopoulos, J. B. McAlpine, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16362-16368.
- [74] P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyanaga, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4268-4270.
- [75] C. Wagner, I. M. Molitor, G. M. König, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 323-332.
- [76] S. M. K. McKinnie, Z. D. Miles, P. A. Jordan, T. Awakawa, H. P. Pepper, L. A. M. Murray, J. H. George, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 17840-17845.
- [77] L. A. M. Murray, S. M. K. McKinnie, H. P. Pepper, R. Erni, Z. D. Miles, M. C. Cruickshank, B. López-Pérez, B. S. Moore, J. H. George, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11009-11014.
- [78] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.
- [79] S. K. Ritter, *Chem. Eng. News* **2010**, *88*, 45-47.
- [80] H. Mukherjee, C. A. Martinez, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1010-1013.
- [81] D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140.
- [82] D. Holtmann, M. W. Fraaije, I. W. Arends, D. J. Opperman, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13180-13200.
- [83] G. E. Meister Winter, A. Butler, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11805-11811.
- [84] A.-W. Struck, M. L. Thompson, L. S. Wong, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2642-2655.
- [85] A. Tuynman, M. K. S. Vink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 906-913.
- [86] K. Lee, S.-H. Moon, *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 261-268.
- [87] K. Okrasa, E. Guibe-Jampel, M. Therisod, *J. Chem. Soc.* **2000**, 1077-1079.
- [88] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762-782.
- [89] S. H. Lee, D. S. Choi, S. K. Kuk, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7958-7985.
- [90] W. Zhang, E. Fernández-Fueyo, Y. Ni, M. van Schie, J. Gacs, R. Renirie, R. Wever, F. G. Mutti, D. Rother, M. Alcalde, F. Hollmann, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 55-62.
- [91] W. Zhang, B. O. Burek, E. Fernández-Fueyo, M. Alcalde, J. Z. Bloh, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15451-15455.
- [92] E. Churakova, M. Kluge, R. Ullrich, I. Arends, M. Hofrichter, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10716-10719.
- [93] D. I. Perez, M. Mifsud Grau, I. W. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2009**, 6848-6850.
- [94] F. Sabuzi, E. Churakova, P. Galloni, R. Wever, F. Hollmann, B. Floris, V. Conte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 3519-3525.
- [95] T. L. Johnson, B. Palenik, B. Brahamsha, *J. Phycol.* **2011**, *47*, 792-801.
- [96] P. A. Babay, C. A. Emilio, R. E. Ferreyra, E. A. Gautier, R. T. Gettar, M. I. Litter, *Int. J. Photoenergy* **2001**, *3*, 193-199.
- [97] A. Frank, C. J. Seel, M. Groll, T. Gulder, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2028-2032.
- [98] C. J. Seel, A. Králík, M. Hacker, A. Frank, B. König, T. Gulder, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 3960-3963.
- [99] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.
- [100] H. S. Soedjak, J. V. Walker, A. Butler, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12689-12696.
- [101] L. A. Kelley, M. J. Sternberg, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 363-371.

- [102] W. D. Swingley, M. Chen, P. C. Cheung, A. L. Conrad, L. C. Dejesa, J. Hao, B. M. Honchak, L. E. Karbach, A. Kurdoglu, S. Lahiri, S. D. Mastrian, H. Miyashita, L. Page, P. Ramakrishna, S. Satoh, W. M. Sattley, Y. Shimada, H. L. Taylor, T. Tomo, T. Tsuchiya, Z. T. Wang, J. Raymond, M. Mimuro, R. E. Blankenship, J. W. Touchman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2008**, *105*, 2005-2010.
- [103] A. Murakami, H. Miyashita, M. Iseki, K. Adachi, M. Mimuro, *Science* **2004**, *303*, 1633-1633.
- [104] unveröffentlichte Ergebnisse AG Gulder und AG Pohl.
- [105] G. P. Horsman, D. L. Zechel, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5704-5783.
- [106] W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 65-94.

VI Erlaubnisscheine der Verlage

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 25, 2018

This Agreement between Ms. Catharina Seel ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4435841310007
License date	Sep 25, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	ChemBioChem
Licensed Content Title	Characterization of a Cyanobacterial Haloperoxidase and Evaluation of its Biocatalytic Halogenation Potential
Licensed Content Author	Annika Frank, Catharina Julia Seel, Michael Groll, et al
Licensed Content Date	Sep 22, 2016
Licensed Content Volume	17
Licensed Content Issue	21
Licensed Content Pages	5
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 25, 2018

This Agreement between Ms. Catharina Seel ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4435840808752
License date	Sep 25, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	ChemCatChem
Licensed Content Title	Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations
Licensed Content Author	Catharina Julia Seel, Antonín Králík, Melanie Hacker, et al
Licensed Content Date	Jul 25, 2018
Licensed Content Volume	10
Licensed Content Issue	18
Licensed Content Pages	4
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No

VII Anhang

Kopie der „Supporting Information“ der beiden Publikationen (ohne ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren)

CHEMBIOCHEM

Supporting Information

Characterization of a Cyanobacterial Haloperoxidase and Evaluation of its Biocatalytic Halogenation Potential

Annika Frank[†], Catharina Julia Seel[†], Michael Groll, and Tanja Gulder^{*[a]}

cbic_201600417_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of Contents

1. General Information	1
2. Cloning, Protein Production and Purification	2
3. Protein Crystallization	3
4. Data Collection and Processing	3
5. Qualitative Assays	4
5.1 Thymol Blue Assay	4
5.2 Phenol Red Assay	5
6. Enzyme Kinetics	6
6.1 MCD Assay	6
6.2 Triiodide Assay	7
7. pH Profile	8
8. Operational Stability	9
8.1 Solvent Stability	9
8.2 Hydrogen Peroxide Stability	10
8.3 Thermal Stability	10
9. Reconstitution of the Enzyme with Vanadate	11
10. Activity Assay under Crystallization Conditions	11
11. Phylogenetic Analysis	12
12. Supplementary Figures	14
13. Enzymatic Reactions	20
13.1 General Procedure	20
13.2 Bromination of 1,3-Dimethoxybenzene (9)	20
13.3 Bromination of 1,3,5-Trimethoxybenzene (5)	22
13.4 Bromination of Thymol (12)	23
13.5 Synthesis of the Brominated Reference Material	25
13.6 Comparative Chemical Brominations	26
13.7 Verification of the Chlorinated Products 4 , 6 and 8 by HRMS	30
14. References	33
15. NMR Spectra	34

1. General Information

Solvents used in reactions were p.A. grade. Solvents for chromatography were technical grade and distilled prior to use. Reagents were purchased at the highest commercial quality and used without further purification. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on Merck silica gel aluminium plates with F-254 indicator using UV light as the visualizing agent. Silica gel Merck 60 (particle size 0.63 – 0.2 mm) was used for flash column chromatography. Solvent mixtures are reported as volume/volume (v/v). NMR spectra were recorded on Bruker AV300, Bruker AV400 or Bruker AV500 spectrometers. The spectra were calibrated using residual undeuterated solvent as an internal reference (CHCl_3 @ 7.26 ppm, ^1H NMR, CHCl_3 @ 77.00 ppm). The following abbreviations (or combinations thereof) are used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, dt = doublet of triplets, q = quartet, m = multiplet, br = broad. In addition, the following abbreviations are used: EtOAc = ethyl acetate, MeCN = acetonitrile, rt = room temperature, sat = saturated, MES = 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, NaOAc = sodium acetate, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethane, HEPES = 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid, TFA = trifluoroacetic acid, MCD = monochlorodimedone, TB = thymol blue, PR = phenol red, NaOAc = sodium acetate, IPTG = isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; Ni-NTA = nickel-nitrilotriacetic acid. Mass spectra were determined on a Thermo LCQ fleet coupled with a Dionex UltiMate 3000 HPLC. HR-ESI-MS, HR-LC-ESI-MS, HR-APCI-MS and HR-LC-APCI-MS mass spectra were recorded with a Thermo LTQ FT Ultra coupled with a Dionex UltiMate 3000 HPLC system. Gas chromatography (GC) was performed on a HP 6890 Series GC instrument (Agilent, equipped with a FID detector and a HP-5 capillary column [length = 29.5 m]). Hydrogen was used as the carrier gas and the constant-flow mode (flow rate = 1.8 mL min^{-1}) with a split ratio of 1:20 was used. The following temperature-program was used: 60°C for 3 min, $15^\circ\text{C min}^{-1}$ to 250°C , and 250°C for 5 min. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed on a HITACHI Chromaster employing the following conditions: 150 x 4 mm Eurospher II (KNAUER®), 100 \AA , $5 \mu\text{m}$, C18, 25°C , flow rate: 1.0 mL min^{-1} , water (+0.01% TFA)/MeCN (+0.01% TFA) gradient: 90/10 \rightarrow 0/100 in 13 min. Protein concentrations were determined using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, $\epsilon(\text{AmVHPO}+\text{His}) = 66530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). UV/Vis spectra were recorded on a BioTek® Eon spectrophotometer. The following chemicals were purchased: reference **6c** (Alfa Aesar, 98% purity), NaOCl (Acros, 10-15%), KBr and KCl (Grüssing, 99.5%). Bromoperoxidase from *Corallina officinalis* (CoVHPO) was purchased from Sigma-Aldrich.

2. Cloning, Protein Production and Purification

For recombinant production of the *Acaryochloris marina* haloperoxidase I (Genbank accession number WP_012165216), the codon-optimized synthetic gene (IDTDNA) was introduced into a pET28-based *E. coli* expression vector by sequence and ligation independent cloning (SLIC). Successful insertion of the gene and the absence of undesired mutations were verified by Sanger sequencing (GATC). As a consequence of the cloning process, the VHPO open reading frame was modified by the addition of an *N*-terminal hexahistidine sequence, followed by a human rhinovirus (HRV) 3C protease recognition site.

The obtained pET28-*Am*VHPO expression vector was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells for protein production. Recombinant cells were grown on LB agar plates and subsequently used for inoculation of LB liquid cultures. All media contained kanamycin as a selective antibiotic at a final concentration of 30 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cells were grown in 3 – 6 liter expression cultures at 37°C while shaking at 150 – 180 rpm. At an optical density of 0.6, protein production was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM and cultures were incubated overnight at 18°C. Cells were harvested by centrifugation and washed with 50 mM Tris pH 7.0 and 300 mM NaCl. Pellets were stored at 18°C until further use.

For protein purification, pellets were resuspended in Ni-NTA wash buffer (50 mM Tris pH 7.0, 300 mM NaCl and 30 mM imidazole). After addition of Pefabloc protease inhibitor, cells were disrupted by sonication after which soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 21,000 rpm (40,000 g) for 30 min. The supernatant was heated to 65°C for 30 min, followed by centrifugation at 40,000 g for 30 min. The soluble protein fraction was subsequently loaded onto a 5 mL HisTrap FF column (GE Healthcare) equilibrated with wash buffer. The column was then washed with 10 column volumes of the same buffer prior to elution of the target protein with a 10 column volume gradient from 30 to 500 mM imidazole. Protein peak fractions were analyzed by SDS-PAGE and those containing the haloperoxidase were pooled for subsequent size-exclusion chromatography. After concentration to the appropriate volume, the protein was loaded onto an S200 16/60 size-exclusion chromatography column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris pH 7.0 and 300 mM NaCl. The obtained peak fractions were analyzed by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) prior to pooling and freezing the protein of highest apparent purity in liquid nitrogen and storing it at -80°C until further use.

Table S1. Specific activities of the employed protein from different purification batches.

c [mg mL⁻¹]	A_{spec} (Br) [U mg⁻¹]	used for
2.30	17.5	$K_M^{\text{Br}^-}$; $K_M^{\text{I}^-}$; $K_M^{\text{H}_2\text{O}_2}$; k_{cat} ; pH profile; reconstitution with vanadate; assay under crystallization conditions
0.23	23.3	solvent stability; H ₂ O ₂ stability
3.00	6.41	thermal stability; enzymatic reactions

3. Protein crystallization

Recombinant *Am*VHPO was crystallized using the hanging-drop vapour diffusion method. 1 μL of reservoir solution (0.1 M Tris pH 8.5, 1.25 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5 mM K_3VO_4) was mixed with 2 μL of protein at a concentration of 10 – 15 mg mL^{-1} and incubated at 20°C. After 24 h, initial crystals formed and these increased in size for a further 3 d. For data collection, crystals were cryoprotected in reservoir solution supplemented with 25% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen.

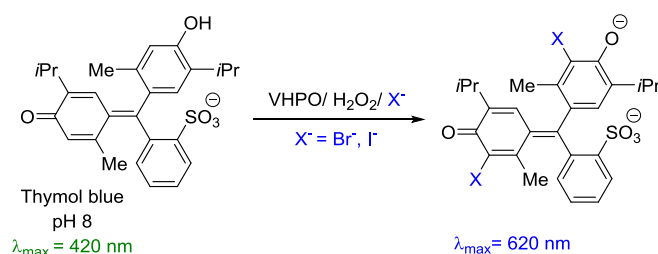
4. Data collection and processing

For structure determination, X-ray diffraction images were collected at beamline ID23-1 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, France. Complete Datasets were processed and refined using XDS^[1] and the ccp4 suite programs.^[2]

The *Am*VHPO structure was determined by molecular replacement using MOLREP^[3] and the *Corallina pilulifera* VBPO coordinates (PDB ID: 1UP8)^[4] as a Patterson search model. Iterative rounds of model building and refinement were carried out using COOT^[5] and REFMAC5^[6] to give final R values of $R_{\text{work}} = 20.7\%$ and $R_{\text{free}} = 24.9\%$, a root mean square deviation (r.m.s.d) for bond lengths of 0.004 Å and r.m.s.d for bond angles of 0.909°. All data processing and refinement statistics are summarized in Table 1 in the manuscript. The stereochemistry was evaluated by the Ramachandran plot in COOT prior to deposition of the coordinates and structure factors with the RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 5LPC).

5. Qualitative Assays

5.1 Thymol Blue Assay^[7]



A stock solution of TB (1 mM) was prepared in H₂O/DMSO (4/1). *Am*VHPO was added to a mixture of TB (100 μ M), phosphate buffer (pH 8.0, 60 mM), KBr or KI (142 mM), hydrogen peroxide (2.8 mM) and NH₄VO₃^[8] (8.6 μ M). The assay was carried out in 96 well microplates (Brand® F-bottom, pureGrade™) and the recorded UV/VIS spectra of the products showed the UV maxima characteristic for the brominated and iodinated products. Halogenation under the same conditions catalyzed by the commercially available *Co*VHPO served as positive control for this assay. A negative control was also performed using the same reaction mixture but without addition of enzyme.

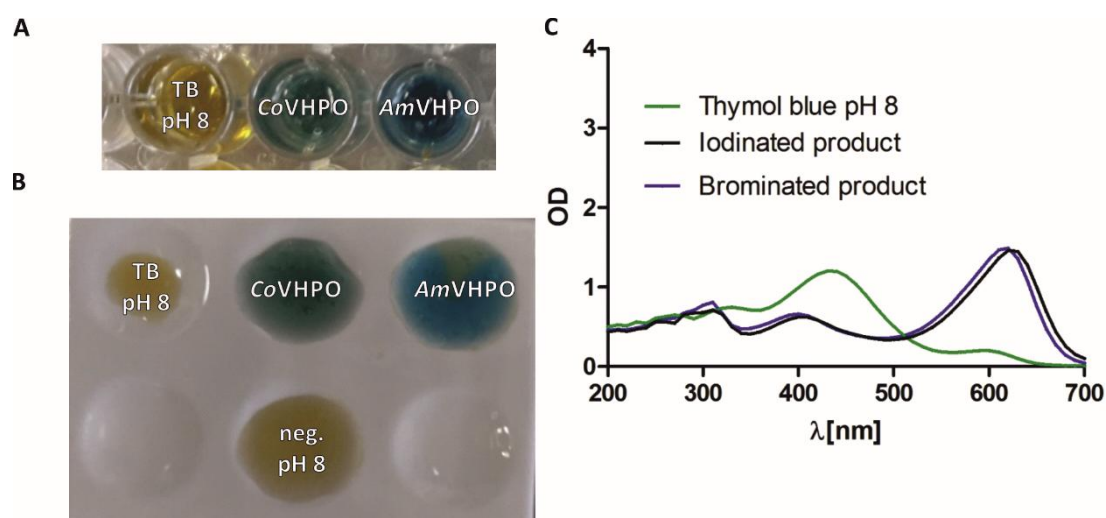
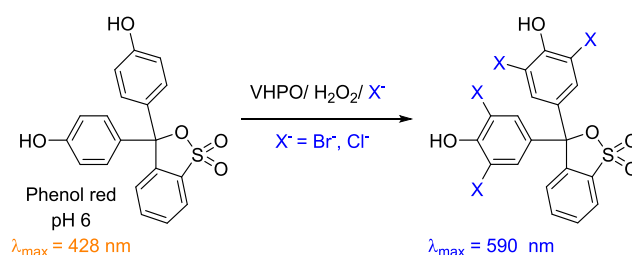


Figure S1. Colorimetric thymol blue assay for (A) bromination and (B) iodination. The change in the absorbance maxima due to bromination and iodination is shown in C. TB = thymol blue, *Co*VHPO = VHPO from *C. officinalis*, *Am*VHPO = VHPO from *A. marina*.

5.2 Phenol Red Assay^[9]



A stock solution of PR (100 μM) was prepared in an aqueous solution containing 1 vol% 0.1 M NaOH. AmVHPO was added to the reaction mixture consisting of PR (14.3 μM), phosphate buffer (pH 8.0, 598 mM) or MES buffer (pH 6.0, 598 mM), KBr or KCl (142 mM), hydrogen peroxide (2.8 mM) and NH_4VO_3 (8.6 μM). The assay was carried out in 96-well microplates (Brand® F-bottom, pureGrade™) and the recorded UV/VIS spectra of the products showed the UV maxima characteristic for the brominated and chlorinated products. Halogenation under the same conditions catalyzed by the commercially available CoVHPO served as positive control for this assay. A negative control was also performed using the same reaction conditions without addition of enzyme.

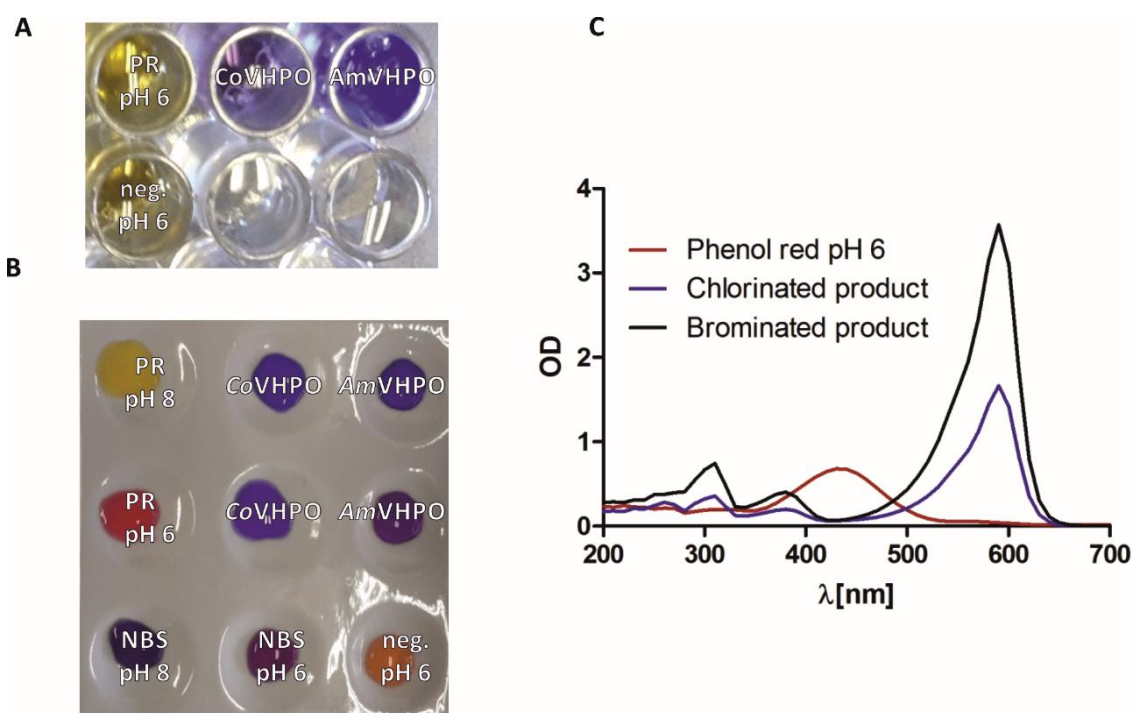
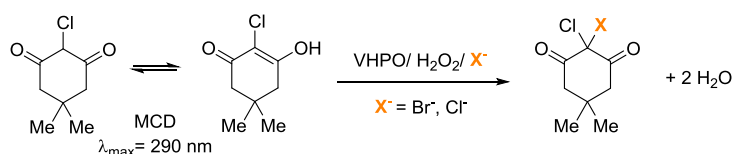


Figure S2. Colorimetric phenol red assay for (A) chlorination and (B) bromination. The change in the absorbance maxima due to bromination and chlorination is shown in C. PR = phenol red, NBS = *N*-bromo succinimide, CoVHPO = VHPO from *C. officinalis*, AmVHPO = VHPO from *A. marina*.

6. Enzyme kinetics

In order to determine the K_M values for the different substrates (bromide, iodide, and hydrogen peroxide), saturating levels of the respective remaining substrates at the optimum pH value (pH 6.0) were applied. Pseudo-first order kinetics were determined by performing either the MCD or triiodide assay at 30°C as described below.

6.1 MCD Assay^[10]



A 1 mM stock solution of MCD was prepared in 2 M NaOAc. Assays were performed in triplicate in 96-well polystyrene microplates (Brand® F-bottom, UV-transparent, pureGrade™). 30 μ L of H₂O₂ (10 mM final) were added to 270 μ L of reaction mixture, consisting of MES buffer (50 mM, pH 6.0), MCD (50 μ M), KBr (200 mM) or KCl (200 mM), K₃VO₄ (1 μ M) and *Am*VHPO (0.23 mg mL⁻¹, 1 μ L). Bromide concentrations were varied from 0.1 – 4.0 mM to determine the $K_M^{\text{Br}^-}$ value and $K_M^{\text{H}_2\text{O}_2}$ was obtained from measurements in a range of 10 μ M – 10 mM H₂O₂ (the concentration of the 100 mM stock solution was verified by titration using KMnO₄).

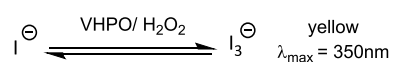
The decrease in absorbance at 290 nm was monitored continually while keeping the temperature at 30°C and mixing at 410 rpm. Halogenation under the same conditions, catalyzed by the commercially available *Co*VHPO, served as positive control for this assay. The concentration of converted MCD was calculated from A_{290} using the equation:

$$c(\text{MCD})[\text{mM}] = \frac{A_{290}}{(\epsilon_{\text{MCD}} * d)}$$

$$\text{with } \epsilon_{\text{MCD}} = 19.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ and } d = 0.91 \text{ cm}$$

Graphs were plotted using non-linear regression analysis (GraphPad Prism 5).

6.2 Triiodide Assay^[11]



Assays were performed in triplicate in 96-well polystyrene microplates (Brand® F-bottom, pureGrade™). 30 μL of H₂O₂ (2 mM final) were added to 270 μL of reaction mixture consisting of MES buffer (0.5 M, pH 6.0), KI (200 mM), K₃VO₄ (1 μM) and *Am*VHPO (0.23 mg mL⁻¹, 1 μL). In parallel, the same measurements were conducted without addition of the enzyme. The velocities of these background reactions were subtracted from those of the enzyme-catalyzed reactions. Iodide concentrations were varied in a range from 0.50 – 100 mM to determine the $K_M^{\text{I}^-}$ value.

7. pH Profile

In order to determine the pH-dependence of enzyme activity, the MCD assay was carried out in triplicate as described in section 6.1, using saturating concentrations of bromide (200 mM) and H₂O₂ (10 mM) in a variety of 50 mM buffers (NaOAc pH 4.0 and 5.0; MES pH 6.0; Tris pH 6.9 and 8.0; HEPES pH 9.0).

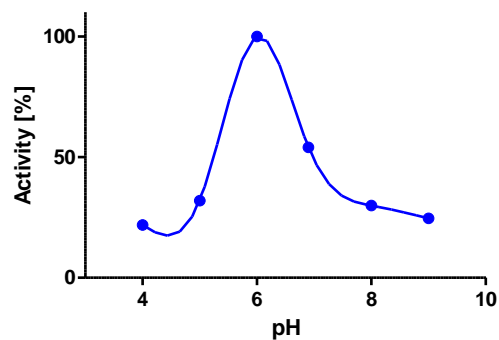


Figure S3. pH profile of *AmVHPO* activity.

8. Operational Stability

8.1 Solvent Stability

Stability towards common organic solvents (methanol, ethanol, isopropanol and acetone) was estimated by pre-incubating the purified enzyme in 50 mM MES buffer (pH 6.0) and 25, 50 or 75 vol% of the corresponding organic solvent, respectively. Residual activity was measured in duplicates using the MCD assay as described in section 6.1 with saturating concentrations of bromide (200 mM) and H₂O₂ (10 mM). The assay was performed immediately after mixing the reaction components and at t = 1, 2, 14 and 20 d of incubation at 25°C. The percentage of residual activity was calculated with respect to full activity at t = 0 d.

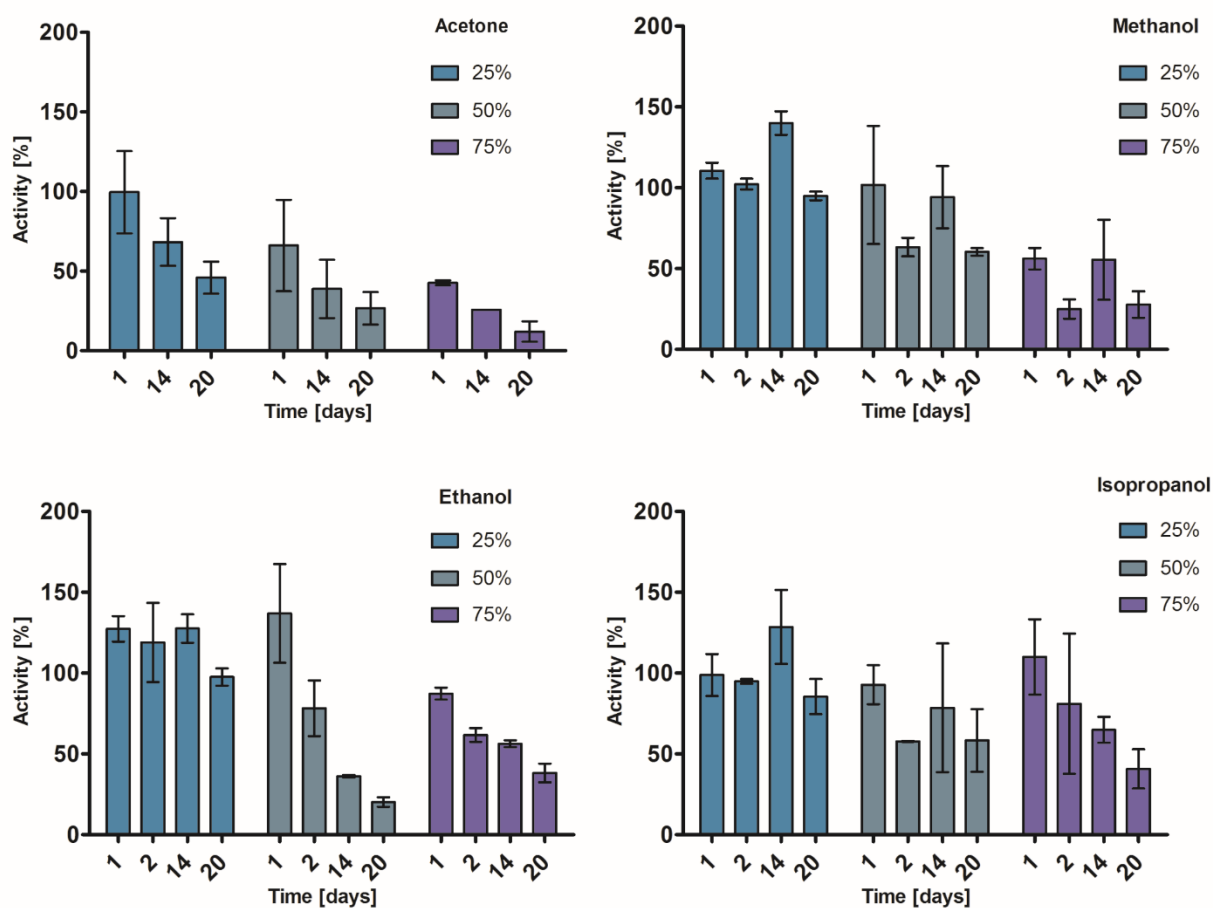


Figure S4. Stability of AmVHPO in a variety of organic solvents measured over a total period of 20 d. (error bars correspond to standard errors of the mean value)

8.2 Hydrogen Peroxide Stability

Stability towards H₂O₂ was estimated by pre-incubating the purified enzyme in 10, 50 and 100 mM of H₂O₂ at pH 6.0. Residual activity was determined using the MCD assay as described in section 6.1 and with a saturating concentration of bromide (200 mM). The assay was performed in triplicates immediately after mixing of the reaction components and at t = 1.5, 3.0 and 7.0 h of incubation at 25°C. The percentage of residual activity was calculated according to full activity at t = 0 h (for the corresponding H₂O₂ concentration).

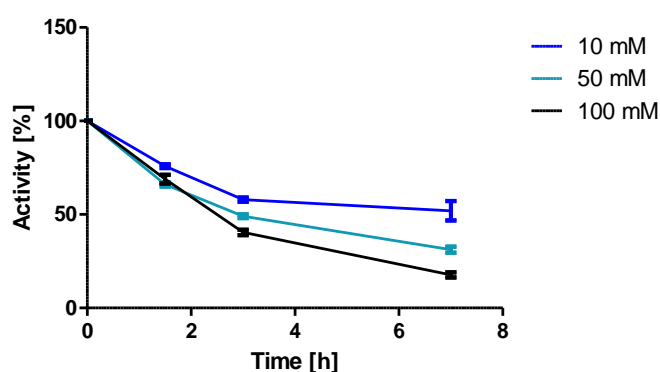


Figure S5. Residual activity of *AmVHPO* at varying H₂O₂ concentrations over a total period of 7 h.

8.3 Thermal Stability

The enzyme was submitted to a heat incubation step as part of the purification process (65°C, 30 min, see section 2). These conditions were applied to an enzyme batch that was purified without heat treatment and the residual activity was determined after 1 h reconstitution at 25°C and after 4 d at 4°C. The percentage of residual activity was calculated with respect to full activity without heat treatment (mean value from triplicate measurement).

Table S2. Reconstitution of *AmVHPO* activity after heat treatment (65°C, 30 min).

	1 h	4 d
residual activity	37%	100%

9. Reconstitution of the Enzyme with Vanadate (V)

The MCD assay as described in section 6.1 was carried out in triplicates, prior to incubation of the apo enzyme (dialyzed against 50 mM Tris pH 7.0 and 300 mM NaCl; see section 2) with K_3VO_4 ($1 \mu\text{M}$ final concentration) and at $t = 1, 2.25, 3.5$ and 6.25 h of incubation.

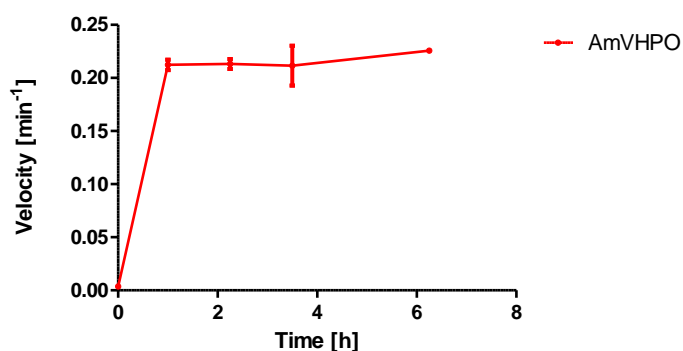


Figure S6. Activity reconstitution for apo *AmVHPO* after incubation with vanadate(V). (error bars correspond to standard errors of the mean value)

10. Activity Assay under Crystallization Conditions

The MCD assay was carried out as described in section 6.1 using $1.25 \text{ M NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $0.5 \text{ mM K}_3\text{VO}_4$ and replacing MES with Tris buffer (pH 8.5, 0.1 M), thus mimicking the crystallization conditions. Since no halogenation activity was observed, it was concluded that the enzyme is in an inactive holo-form, binding the isosteric phosphate instead of vanadate in the active site, due to the high phosphate concentration in the reservoir solution.

11. Phylogenetic Analysis

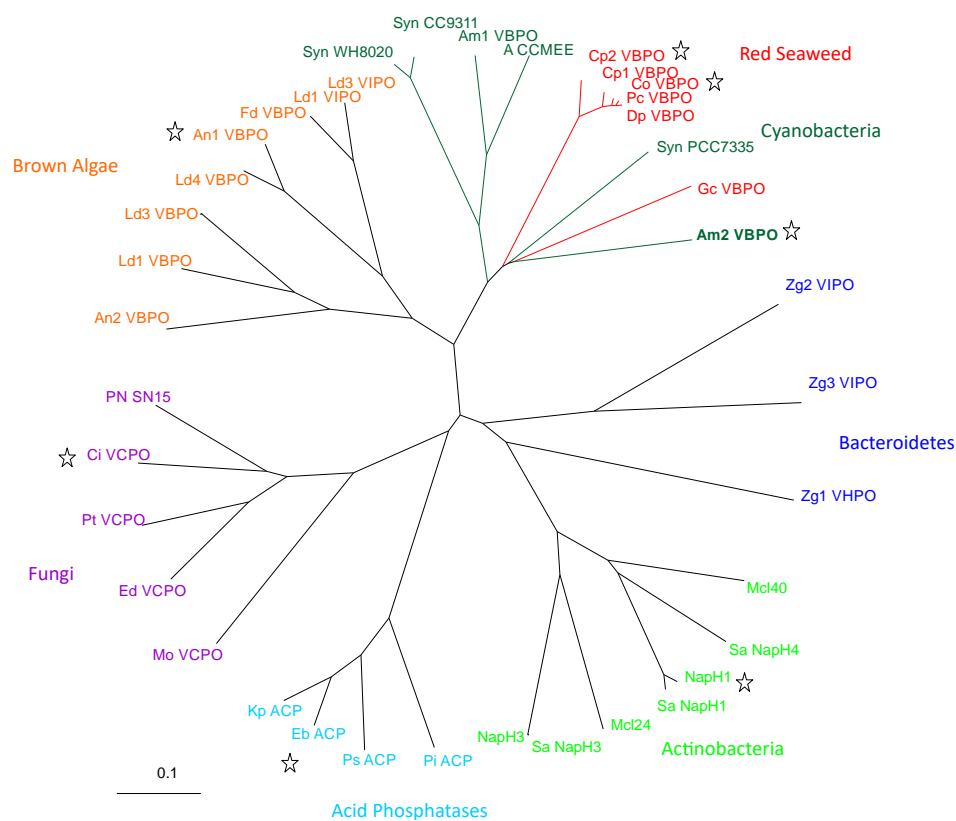


Figure S7. Evolutionary relationship of VHPOs and acid phosphatases identified in different organisms. A multiple sequence alignment of 34 putative VHPOs from eukaryotic and bacterial species and 4 bacterial acid phosphatases was performed using ClustalW^[12] and the unrooted neighbor-joining tree was visualized by TreeView. The scale bar indicates 0.1 changes per amino acid. The corresponding GenBank accession numbers are provided in Table 4. Available X-ray structures are indicated by a star.

Table S3. List of GenBank accession numbers, species of origin and catalytic activity of proteins compared in the phylogenetic analysis (Figure S1).

Species	Activity	GenBank Accession	Tree Label
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8020	VBPO	ADO20318	Syn WH8020
<i>Synechococcus</i> sp. CC9311	VBPO(2)	WP_011620573	Syn CC9311
<i>Acaryochloris marina</i>	VBPO(1)	WP_012161787	Am1 VBPO
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	PAP2	WP_006454446	Syn PCC7335
<i>Acaryochloris</i> sp. CCMEE 5410	VBPO	WP_010471680	A CCMEE
<i>Acaryochloris marina</i>	VBPO(2)	WP_012165216	Am2 VBPO
<i>Corallina officinalis</i>	VBPO	AAM46061	Co VBPO
<i>Corallina officinalis</i>	rVBPO	1UP8.A	rCo VBPO
<i>Corallina pilulifera</i>	VBPO(1)	BAA31261	Cp1 VBPO
<i>Corallina pilulifera</i>	VBPO(2)	BAA31262	Cp2 VBPO
<i>Gracilaria changii</i>	VBPO	AGE00855	Gc VBPO
<i>Plocamium cartilagineum</i>	VBPO	— ^(a)	Pc VBPO
<i>Delisea pulchra</i>	VBPO	— ^(a)	Dp VBPO
<i>Laminaria digitata</i>	VBPO1	CAD37191	Ld1 VBPO
<i>Laminaria digitata</i>	VIPO1	CAF04025	Ld1 VIPO
<i>Laminaria digitata</i>	putative VBPO3	CAQ51441	Ld3 VBPO
<i>Laminaria digitata</i>	putative VBPO4	CAQ51442	Ld4 VBPO
<i>Laminaria digitata</i>	putative VIPO3	CAQ51446	Ld3 VIPO
<i>Ascophyllum nodosum</i>	VBPO(1)	P81701	An1 VBPO
<i>Ascophyllum nodosum</i>	VBPO(2)	CCD42013	An2 VBPO
<i>Fucus distichus</i>	VBPO	AAC35279	Fd VBPO
<i>Curvularia inaequalis</i>	VCPO	CAA59686	Ci VCPO
<i>Embellisia didymospora</i>	VCPO	CAA72622	Ed VCPO
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	VCPO	XP_001933850	Pt VCPO
<i>Parastagonospora nodorum</i> SN15	hypothetical protein	XP_001800221	PN SN15
<i>Magnaporthe oryzae</i>	VCPO	XP_003708974	Mo VCPO
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-525	VCPO NapH1	ABS50486	NapH1
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-525	VCPO NapH3	ABS50491	NapH3
<i>Streptomyces aculeolatus</i>	VCPO NapH3	ABS50458	Sa NapH1
<i>Streptomyces aculeolatus</i>	VCPO NapH4	ABS50464	Sa NapH4
<i>Streptomyces aculeolatus</i>	VCPO NapH3	ABS50463	Sa NapH3
<i>Streptomyces</i> sp. CNH189	VCPO Mcl24	AGH68909	Mcl24
<i>Streptomyces</i> sp. CNH189	VCPO Mcl40	AGH68925	Mcl40
<i>Zobellia galactanivorans</i>	VHPO	WP_013993606	Zg1 VHPO
<i>Zobellia galactanivorans</i>	VIPO	WP_013993446	Zg2 VIPO
<i>Zobellia galactanivorans</i>	VIPO	WP_013992627	Zg3 VIPO
<i>Escherichia blattae</i>	acid phosphatase	BAA84942	Sb ACP
<i>Providencia stuartii</i>	PhoN acid phosphatase	CAA46032	Ps ACP
<i>Prevotella intermedia</i>	PIACP acid phosphatase	BAA33148	Pi ACP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PhoC protein	CAB59725	Kp ACP

^(a)Sequences were taken from ^[13]

12. Supplementary Figures

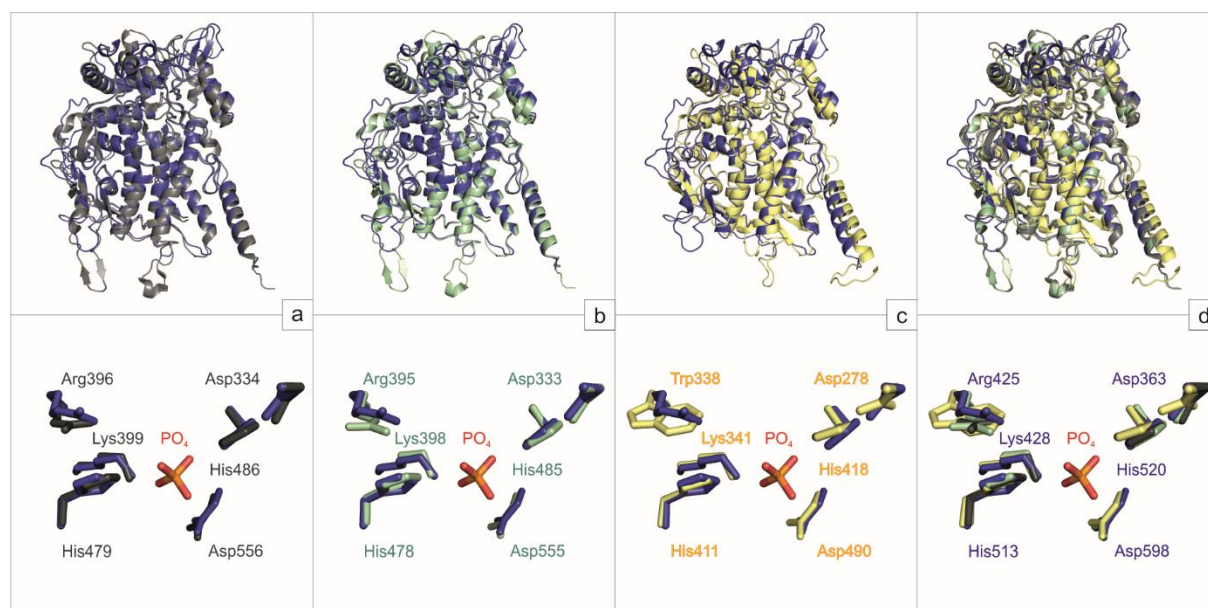


Figure S8. Structural superposition of the vanadium-dependent haloperoxidases from red and brown seaweed species with the *AmVHPO*. The alignment of *AmVHPO* (blue) and a) the *C. officinalis*^[14] and b) *C. pilulifera*^[4] VHPOs (PDB IDs: 1UP8, grey, and 1QHB, green, respectively) reveals a strong structural conservation, especially around the helical core region. Excluded from this are the extended loops, which contain small beta-sheet regions protruding from the *Corallina* enzymes' compact center. The position and orientation of the catalytic residues surrounding the vanadium cofactor (replaced by a phosphate in the *AmVHPO*) are highly conserved. c) The structural superposition of *AmVHPO* with the *A. nodosum*^[15] VHPO (PDB ID: 1QI9, yellow) closely resembles the *Corallina* alignments. Here, the differences in the peripheral loop regions are less pronounced but the most *N*-terminal helix is shifted by approximately 3 Å. As before, the active sites overlap closely. Arg425 (*AmVHPO* numbering), however, is replaced by a tryptophan in *A. nodosum* d) The alignment of all structures highlights the clear overall conservation within the algal species and with respect to the new cyanobacterial structure.

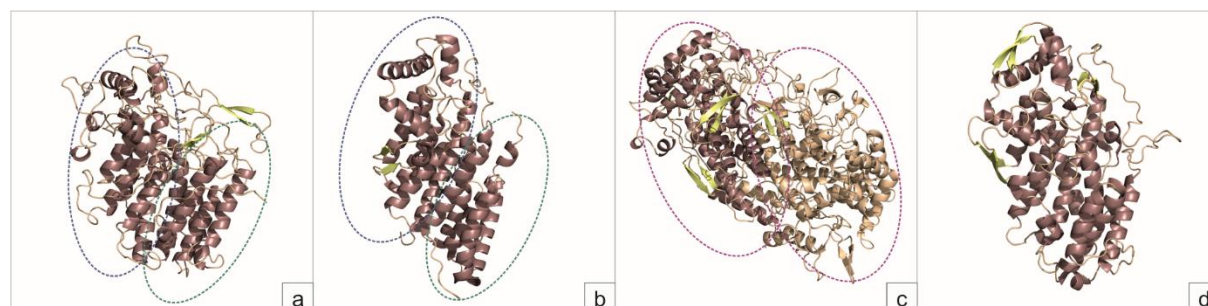


Figure S9. Arrangements of helical bundles in vanadium chloro- and bromoperoxidases. a) The fungal VCPO from *C. inaequalis*^[16] (PDB ID: 1VNI) shows a distinct separation into an *N*-terminal and a *C*-terminal helical bundle (highlighted with green and blue circles, respectively). b) The same arrangement was observed for the recently characterized vanadium iodoperoxidase from *Z. galactanivorans*^[17] (PDB ID: 4CIT). c) In all algal

VHPOs as well as in the *Am*VHPO, the C-terminal helix bundle is structurally replaced by the N-terminal bundle of the neighboring monomer. d) In the vanadium chloroperoxidase from *Streptomyces* sp. CNQ-525 (PDB ID: 3W36), two helical bundles are present but embedded in a more complex tertiary structure.^[18]

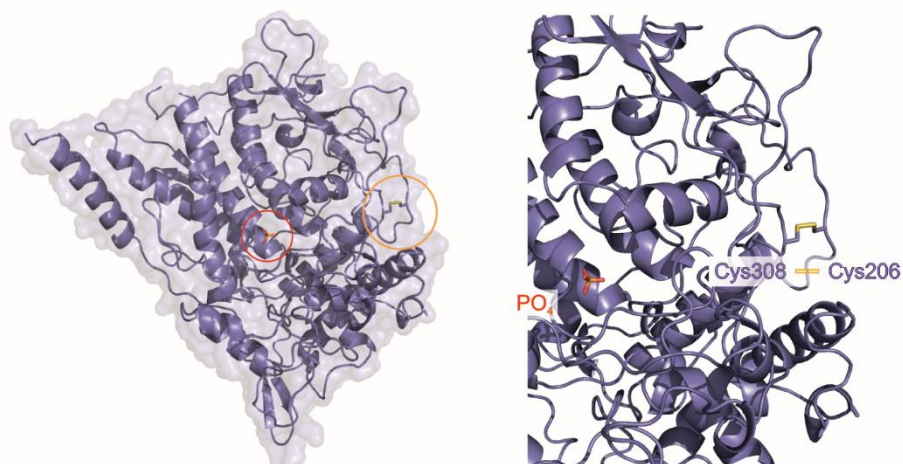


Figure S10. Intramolecular disulfide bonds in *Am*VHPO. In contrast to the homologous *Corallina* VHPOs, the *Am*VHPO contains both inter- as well as intramolecular disulfide bonds. The latter connect two loops on the outside of the enzyme, opposite to the first N-terminal helix and at a distance of approximately 25 Å from the cofactor binding site.

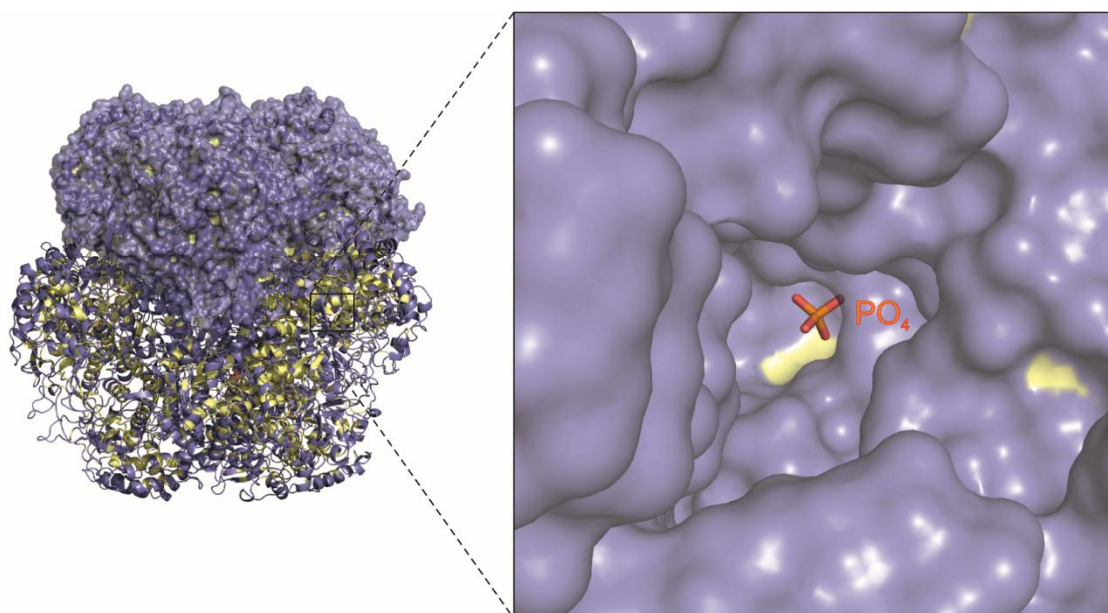


Figure S11. Surface exposure of the *Am*VHPO dodecamer. When residues are highlighted with respect to their individual surface exposure (purple = exposed, yellow = non-exposed), differences between the internal and the external faces of the protein become apparent. The catalytic centers and interfaces between the monomers in particular are shielded from solvent, which is likely to contribute to the enzyme's stability. A magnified view into the active site cavity shows that the phosphate (replacing the native enzyme's vanadate) is positioned in front of a non-exposed pocket. This may be a suitable substrate binding site.

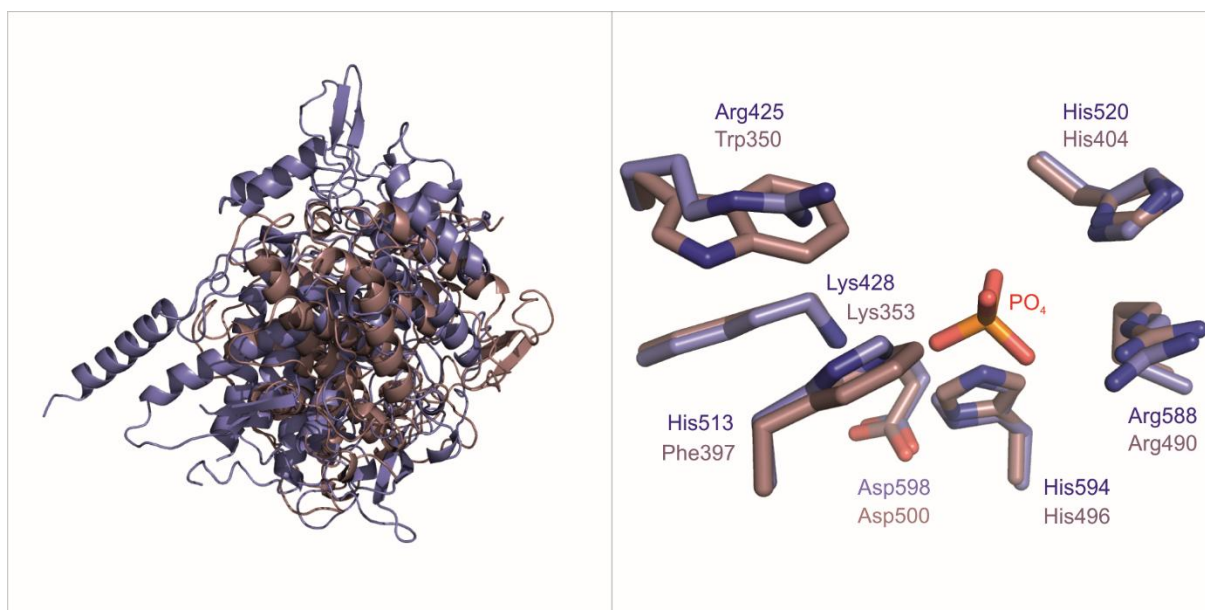


Figure S12. Superposition of the *AmVHPO* and *C. inaequalis* VCPO active sites. Despite significant differences in their overall structure (left), the active site of *AmVHPO* and the *C. inaequalis*^[16] VCPO can be superimposed and show structural conservation in the position and orientation of most active site residues. As with the *A. nodosum*^[15] enzyme, Arg425 (*AmVHPO* numbering) is substituted with a tryptophan. In addition, the fungal haloperoxidase lacks a second histidine in the position equivalent to His513. The latter is replaced by a phenylalanine although position and orientation of the side chain are conserved.


```

          1      10      20      30      40
Am_VBPO  . . . . . MNRTRQQAQNIRNNAEELAAAN . RPHFQHINNKEEYERPKKDGNE
Cp_VBPO  . . . . . MGIPADNLQSRAKASFDTRVAAAELALN . RGVVPSFANGEELLYRNPDNDTD
Co_VBPO  . . . . . MGIPADNLQSRAKASFDTRVAAAELALA . RGAVPSFANGEELLYRNSE . . TGD
An_VBPO  ETCSTSDDDADPTPPNERDDEAFASRVAAAKRELEGTGTVC . . . . . QINNGE
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          50      60      70      80      90      100
Am_VBPO  PSHIANFTKGLPHDEHTGLLNSADYDQFVLGIQSGDITDFARTE L G P A E L P K V H G C L S K
Cp_VBPO  PSFIASF TKGLPHDDN . G A I I D P D D F L A F V R A I N S G D E K E I A D L T L G P A R D P E T . . . . .
Co_VBPO  PSFIASF TKGLPHDDN . G A I I D P D D F L A F V R A I N S G D E K E I A A L T L G P A R D P E T . . . . .
An_VBPO  TDLAAKFHKSLPHDDLGO . V D A D A F A A L E D C I L N G D L S I C E D V P V G N S . . . . .
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          110      120      130      140      150
Am_VBPO  QKIDCDDHRSRSGFWKSOI A Q G A A G G D G A . . . . . K L R A W E S A G A G L V F D L E G F D
Cp_VBPO  . . . . . G L P I W R S D L A N . . . . . S L E L . . . . . E V R G W E N S S A G L I F D L E G F D
Co_VBPO  . . . . . G L P I W R S D L A N . . . . . S L D L . . . . . E V R G W E N S S A G L I F D L E G F D
An_VBPO  . . . . . Y N T N Y I L P W N H V G L E . . . . . E G D . . . . . F V G R L V N P R A F A I D I S G F A
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          160      170      180      190      200
Am_VBPO  A Q A V T M P P A P R L . E S P E M . . . . . T S E I A E V Y S Q A L L R D T H F S Q L R D P G L G D Q V
Cp_VBPO  A Q S I A M P P A P V L . T S P E M . . . . . V A E I A E L Y L M A L G R E I E F S E F D S P K N A E Y I
Co_VBPO  A Q S V A M P P A P V L . T S P E M . . . . . I A E M A E L Y L M A L G R D I E F S E F D S P K N A A F I
An_VBPO  F S A T T I P P V P T L . P S P E M . . . . . A A Q L A E V Y W M A L A R D V P F M Q Y G T D D I T V T A
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          210      220      230      240      250
Am_VBPO  N A C D S C P T Q L S I Y E A I D L L N T V Q T E G Q . . N F S A N C C D L . . T . . . . D D E Q A R Q R P L V T R
Cp_VBPO  Q . . . . . F A I D Q L N G L . E W F N T P A K L G . D P . . . . . P A E I R R R R G E V T V
Co_VBPO  R . . . . . S A I E R L N G L . E W F N T P A K L G . D P . . . . . P A E I R R R R G E V T V
An_VBPO  . . . . . A A N L A G M . E G F P N L D A . . . . . V S I G S D G T V D P L
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          260      270      280      290      300
Am_VBPO  Q N F R G I A F G D D V G P Y L S Q F L I G N N A L G G G V F G Q . . . . . E A G H I G Y G A T R I D Q
Cp_VBPO  G N L F R G I L F G S E V G P Y L S Q Y I I V G S K Q I G S A T V G N K T L V S F N A A D E F D G E I A Y G S I T S Q
Co_VBPO  G N L F R G I L F G S E V G P Y L S Q F I I V G S K Q I G S A T V G N K T L V S F N A A D E F D G E I A Y G S I T S Q
An_VBPO  S Q L F R A T F V G V E T G P F S Q L L V N S . . . . . F T I D S I T V E P
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          310      320      330
Am_VBPO  R V R K A T P C K D F M . . . . . T N F E T W L . . . . . D V Q N G A D L R G L E T Y V D A D . . P G
Cp_VBPO  R V R I A T P G R D F M . . . . . T D L K V F L . . . . . D V Q D A A D F R G F E S Y E . . . . .
Co_VBPO  R V R I A T P G R D F M . . . . . T D L K V F L . . . . . D V Q D A A D F R G F E S Y E . . . . .
An_VBPO  K Q E I F A P D V N Y M . . . . . V D F D E W L . . . . . N I Q N G G P P A G P E L L D . . . . .
Ci_CIVCPO
NapH1

```

```

          340      350      360      370
Am_VBPO  K . . . . . C R E F P A Y R V I T T P R D L A T Y V H Y D A L Y E A Y L N A C L . . . . .
Cp_VBPO  . . . . . P G A R L I R T I R D L A T W V H F D A L Y E A Y L N A C L . . . . .
Co_VBPO  . . . . . P G A R L I R T I R D L A T W V H F D S L Y E A Y L N A C L . . . . .
An_VBPO  . . . . . D E L R F V R N A R D L A R V T F T D N I N T E A Y R G A L . . . . .
Ci_CIVCPO
NapH1

```

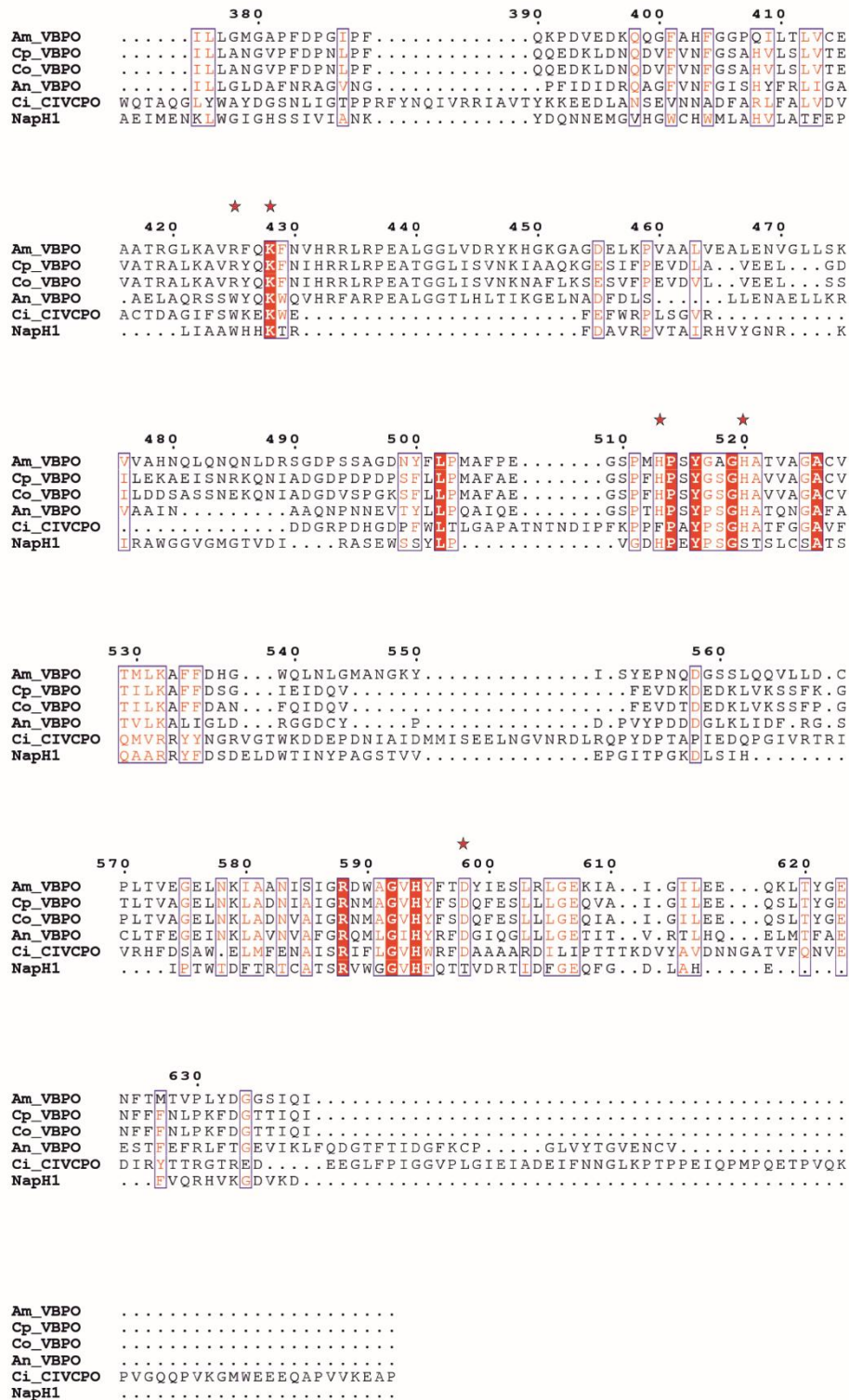


Figure S13. Sequence alignment for AmVBPO, VBPOs from *Corallina* and *Ascophyllum* species as well as chloroperoxidases from the fungus *C. inaequalis* and *Streptomyces sp.* CNQ-525 (NapHI).^[4,14-17] Fully conserved residues are highlighted by red, shaded bars; partial sequence conservation is indicated by blue bars. Active site residues implied in substrate binding and catalysis are marked with stars.

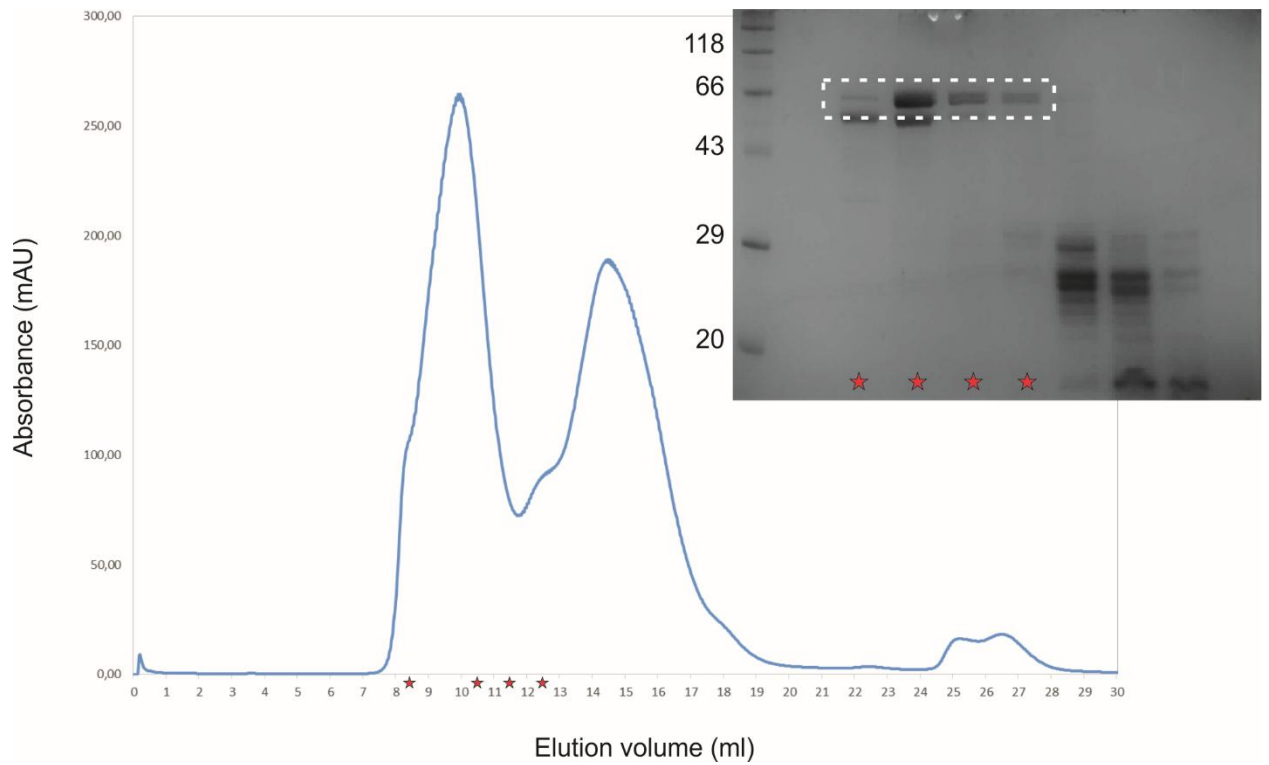


Figure S14. UV-absorbance and SDS PAGE analysis of *AmVHPO* using a Superdex S200 analytical size-exclusion chromatography column (GE healthcare). Peak fractions of the haloperoxidase are marked with red stars. The corresponding protein bands are highlighted with a dashed line on the gel image. A protein marker was run in parallel, its corresponding molecular weights are stated in kilodaltons. *AmVHPO* elutes shortly after the expected column void volume, indicating the formation of a large oligomer in solution.

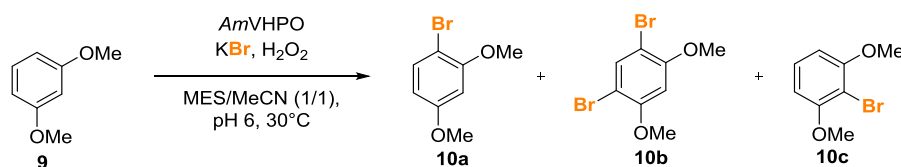
13. Enzymatic Reactions

13.1 General Procedure

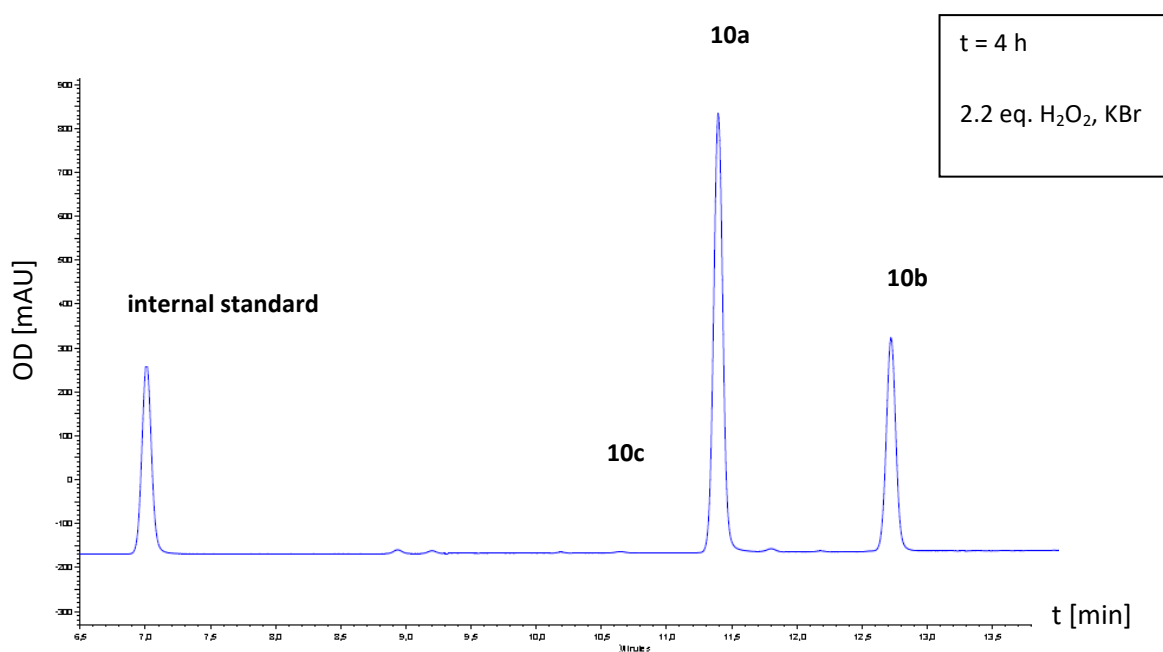
The enzymatic reactions were performed in a MES buffered (pH 6.0, 62.5 - 55.5 mM) mixture of MeCN/water (1/1) in a total volume of 1.6 to 1.8 mL. *AmVHPO* (300 μ L; 3 mg mL⁻¹; 6 U; preincubated with 300 μ L of 30 mM K₃VO₄), KBr and H₂O₂ (equivalents indicated below) were added to 11.9 μ mol of substrate. The reaction was heated to 30°C and mixed at 300 rpm. The reactions were stopped by the addition of sat. NaCl and sat. (NH₄)₂SO₄ solution in order to separate precipitated enzyme and to allow phase separation. EtOAc (300 μ L) and 100 μ L of a stock solution of internal standard (0.06 M phenol for HPLC; 0.06 M dodecane for GC analysis) were added, the mixture was extracted with EtOAc and the organic phase was analyzed.

13.2 Bromination of 1,3-Dimethoxybenzene (9)

Table S4. Ratios and conversions of the enzymatic bromination of 1,3-dimethoxybenzene (9).



Entry	t	eq. (KBr, H ₂ O ₂)	Conversion	10a	10b	10c
1	72 h	1.1	96%	97%	3%	<1%
2	4 h	2.2	100%	70%	30%	<1%



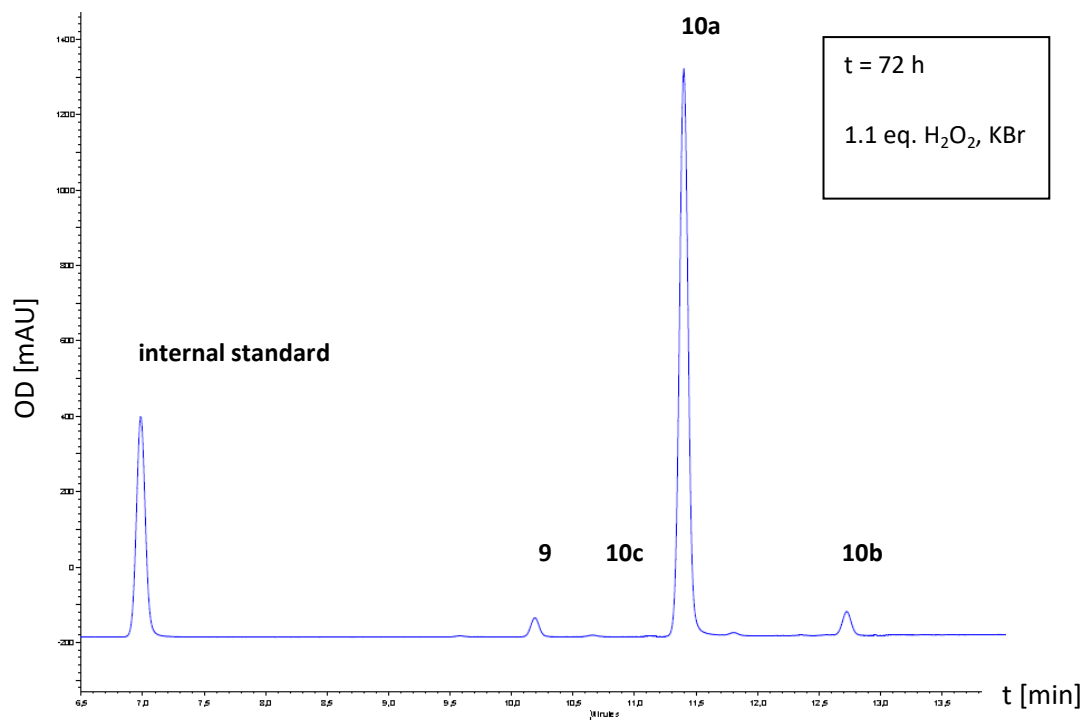
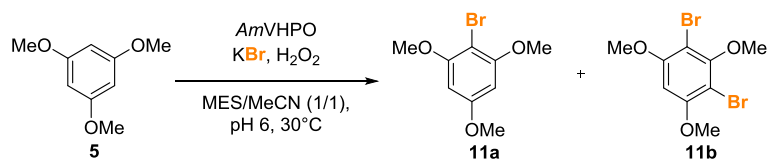


Figure S15. HPLC chromatograms of the enzymatic bromination of 1,3-dimethoxybenzene (**9**). Phenol was used as internal standard.

13.3 Bromination of 1,3,5-Trimethoxybenzene (5)

Table S5. Ratios and conversions of the enzymatic bromination of 1,3,5-trimethoxybenzene (5).



Entry	t	eq. (KBr, H ₂ O ₂)	Conversion	11a	11b
1	72 h	1.1	93%	99%	1%
2	4 h	2.2	100%	62%	38%

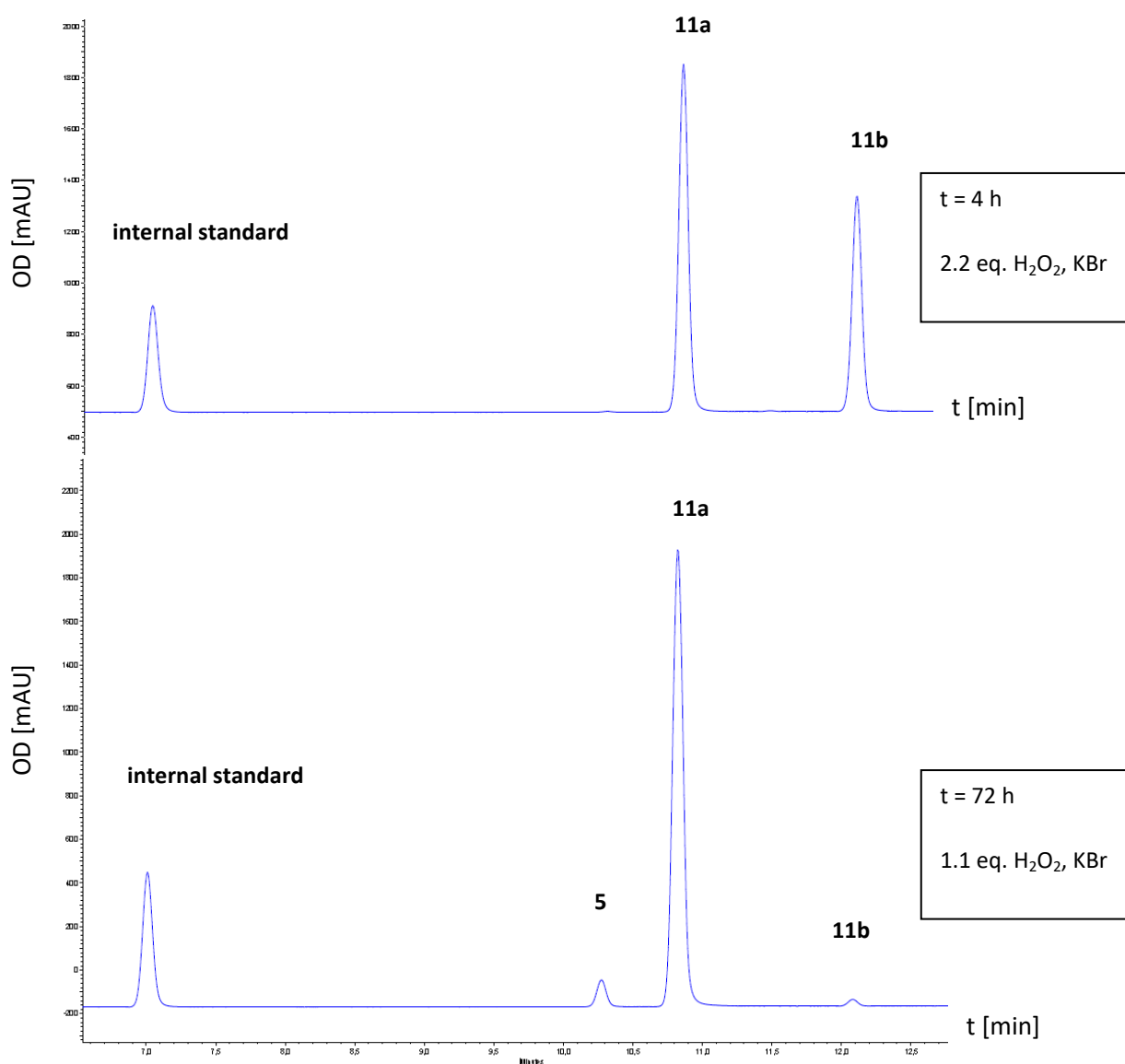
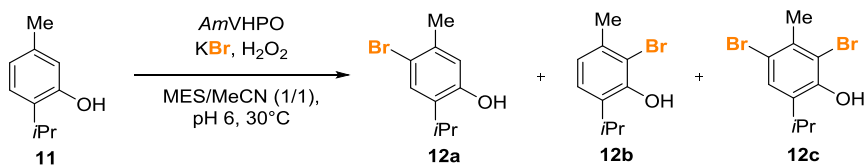


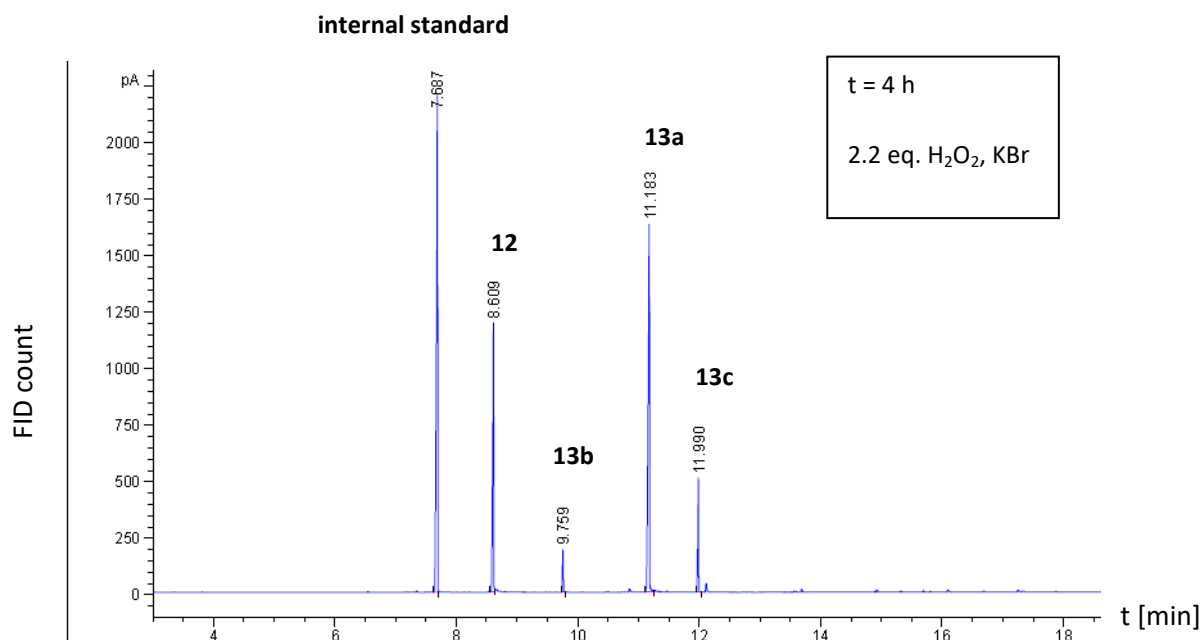
Figure S16. HPLC chromatograms of the enzymatic bromination of 1,3,5-trimethoxybenzene (5). Phenol was used as the internal standard.

13.4 Bromination of Thymol (12)

Table S5. Ratios and conversions of the enzymatic bromination of thymol (12).



Entry	t	eq. (KBr, H ₂ O ₂)	Conversion	12a	12b	12c
1	72 h	1.1	86%	88%	6%	6%
2	4 h	2.2	71%	80%	4%	16%



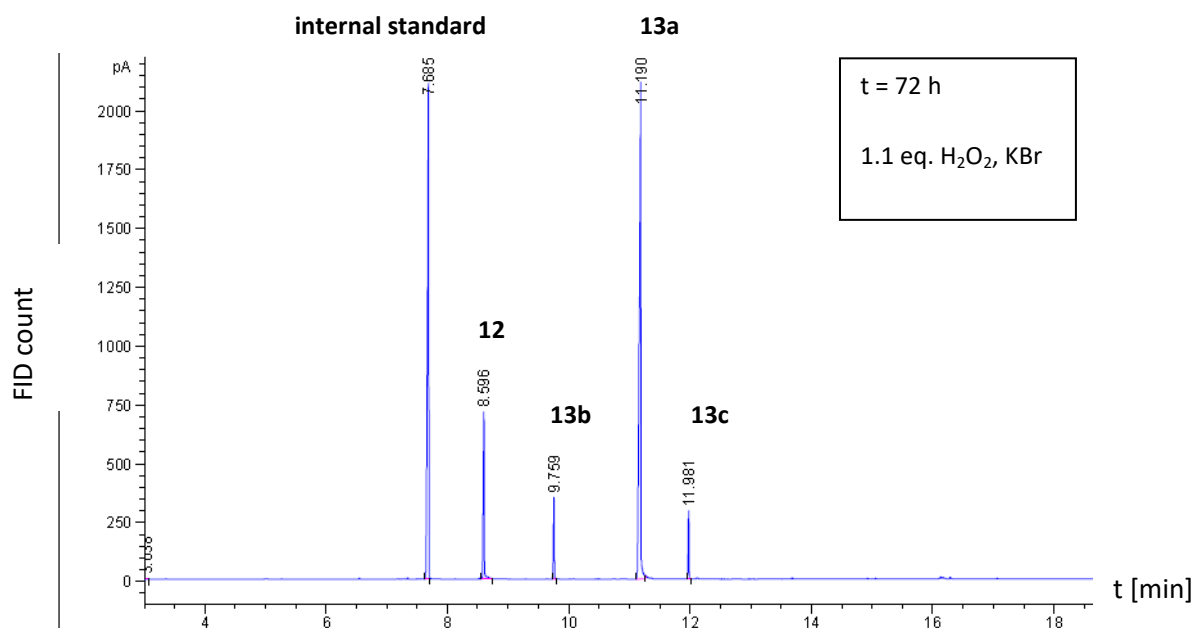
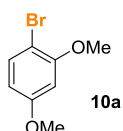


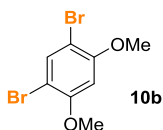
Figure S17. GC chromatograms of the enzymatic thymol (**12**) bromination. The chemical structures of **13a**, **13b** and **13c** were confirmed by authentic references. Dodecane was used as the internal standard.

13.5 Synthesis of the Brominated Reference Material^[19]

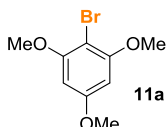
The brominated references **10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **13a** and **13c** were synthesized according to the following procedure. Hydrobromic acid (48%, 1.1 eq. or 2.2 eq.) in DMSO (1.1 eq. or 2.2 eq.) was added to a solution of starting material (3 mmol, 1.0 eq.) in EtOAc (20 mL) and the mixture was heated to 60°C. The reaction was allowed to proceed until full conversion was detected by TLC. After cooling to rt, water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The mixture was purified by reversed phase chromatography on C18 silica (water/MeCN gradient: 70/30 → 0/100 in 18 min).



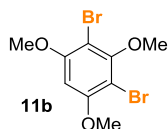
1-Bromo-2,4-dimethoxybenzene (10a): yellow oil; $t_R = 15.2$ min (HPLC); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.41$ (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.40 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.80 (s, 4H) ppm.



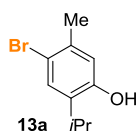
1,5-Dibromo-2,4-dimethoxybenzene (10b): white solid; $t_R = 12.7$ min (HPLC); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.67$ (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 3.92 (s, 6H) ppm.



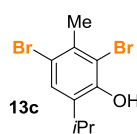
2-Bromo-1,3,5-trimethoxybenzene (11a): white solid; $t_R = 10.8$ min (HPLC); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 6.17$ (s, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.82 (s, 3H) ppm.



2,4-Dibromo-1,3,5-trimethoxybenzene (11b): white solid; $t_R = 12.1$ min (HPLC); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 6.35$ (s, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.87 (s, 3H) ppm.

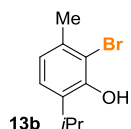


4-Bromo-2-isopropyl-5-methylphenol (13a): yellowish oil; $t_R = 11.2$ min (GC); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.30$ (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.62 (s, 1H), 3.13 (dq, $J = 13.8, 6.9$ Hz, 1H), 2.30 (s, 3H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H) ppm.



2,4-Dibromo-6-isopropyl-3-methylphenol (13c): yellowish oil; $t_R = 12.0$ min (GC); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.34$ (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 3.28 (dq, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.55 (s, 3H), 1.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H) ppm.

The brominated reference **13b** was synthesized according to a different procedure. To a solution of thymol (**12**, 500 mg, 3.33 mmol, 1.0 eq.) in a solution of MeCN/water (1/1, 10 mL) was added KBr (436 mg, 3.66 mmol, 1 eq.), H_2O_2 (3.66 mL of 1 M, 3.66 mmol, 1 eq.), perchloric acid (292 μL of 70% (w/w), 1 eq.) and NH_4VO_3 (5.55 mL of 30 mM, 5 mol%). The mixture was stirred at rt until full conversion was detected by TLC. The organic solvent was evaporated under reduced pressure, subsequently, the mixture was extracted with EtOAc (3 \times 25 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The mixture was purified by reversed phase chromatography on C18 silica (water/MeCN gradient: 70/30 \rightarrow 0/100 in 18 min).



2-bromo-6-isopropyl-3-methylphenol (13b): yellowish oil; $t_R = 9.8$ min (GC); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.04$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 3.29 (dq, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H) ppm.

The spectroscopic data are in agreement with those reported in the literature.^[20]

13.6 Comparative Chemical Brominations

Procedure A

Hypobromic acid was freshly prepared before each reaction according to procedures reported in the literature.^[21,22] The HOBr solution was obtained from 80 mM NaOCl and 90 mM KBr. The concentration of a NaOCl solution was confirmed photometrically ($\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the formation of HOBr was quantified at alkaline pH ($\epsilon_{329} = 332 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) prior to adjusting the pH to 7.4. The reactions were performed in mixtures of acetonitrile/water (1/1) in a total volume of 1.6 mL. HOBr (equivalents indicated below) was added to 11.9 μmol of substrate and the pH was adjusted by addition of HClO_4 (1 eq.; pH 1). The reaction was heated to 30°C and mixed at 300 rpm. The reactions were stopped by the addition of sat. NaCl solution in order to allow phase separation. EtOAc (300 μL) and 100 μL of a stock solution of internal standard (0.06 M phenol for HPLC; 0.06 M dodecane for GC analysis) were added, the mixture was extracted with EtOAc and the organic phase was analyzed by HPLC UV and GC MS, respectively.

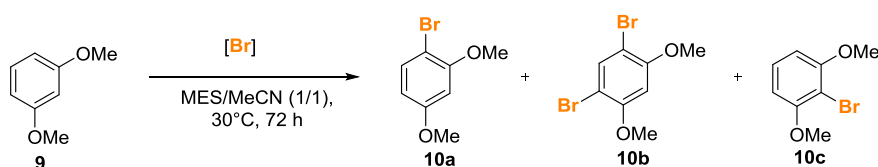
If the reaction was performed at pH 6 (62.5 mM, MES-buffered mixture of MeCN/water (1/1)) no conversion of the substrates **5**, **9**, **12** and **12** was observed.

Procedure B

The reactions were performed in mixtures of acetonitrile/water (1/1) in a total volume of 1.6 mL. NH_4VO_3 (5 mol%), KBr and H_2O_2 (equivalents indicated below) were added to 11.9 μmol of substrate and the pH was adjusted by addition of HClO_4 (1 eq.; pH 1). The reaction was heated to 30°C and mixed at 300 rpm. The reactions were stopped by the addition of sat. NaCl in order to allow phase separation. EtOAc (300 μL) and 100 μL of a stock solution of internal standard (0.06 M phenol for HPLC; 0.06 M dodecane for GC analysis) were added, the mixture was extracted with EtOAc and the organic phase was analyzed by HPLC UV and GC MS, respectively.

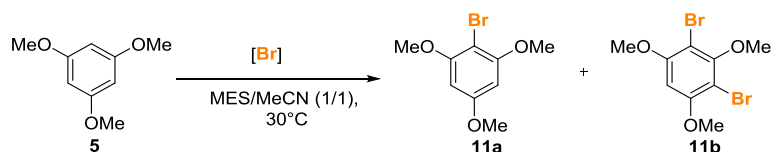
If the reaction was performed at pH 6 (62.5 mM, MES-buffered mixture of MeCN/water (1/1)) no conversion of the substrates **5**, **9**, **12** and **12** was observed.

Table S6. Ratios and conversions of the chemical bromination of 1,3-dimethoxybenzene (**9**).



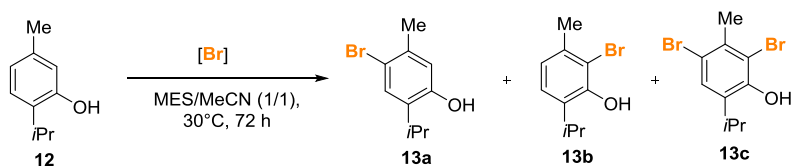
Entry	[Br]	[Br] eq.	pH	Conversion	10a	10b	10c
1 ^b	NH_4VO_3 ; KBr; H_2O_2	1.1	1	60%	99%	<1%	–
2 ^b	NH_4VO_3 ; KBr; H_2O_2	1.1	6	–	–	–	–
3 ^b	NH_4VO_3 ; KBr; H_2O_2	2.2	1	100%	34%	66%	–
4 ^b	NH_4VO_3 ; KBr; H_2O_2	2.2	6	–	–	–	–
5 ^a	HOBr	1.1	1	<5%	traces	traces	–
6 ^a	HOBr	1.1	6	–	–	–	–
7 ^a	HOBr	2.2	1	5%	traces	traces	–
8 ^a	HOBr	2.2	6	–	–	–	–

^aprocedure A; ^bprocedure B

Table S7. Ratios and conversions of the chemical bromination of 1,3,5-trimethoxybenzene (**5**).

Entry	[Br]	[Br] eq.	pH	t	Conversion	11a	11b
1 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	1.1	1	24 h	23%	100%	–
2 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	1.1	1	72 h	83%	100%	–
3 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	1.1	6	72 h	–	–	–
4 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	2.2	1	72 h	100%	44%	56%
5 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	2.2	6	72 h	–	–	–
6 ^a	HOBr	1.1	1	24 h	<5%	traces	traces
7 ^a	HOBr	1.1	1	72 h	<5%	traces	traces
8 ^a	HOBr	1.1	6	72 h	–	–	–
9 ^a	HOBr	2.2	1	24 h	<5%	traces	traces
10 ^a	HOBr	2.2	1	72 h	<5%	traces	traces
11 ^a	HOBr	2.1	6	72 h	–	–	–

^aprocedure A; ^bprocedure B

Table S8. Ratios and conversions of the chemical bromination of thymol (**12**).

Entry	[Br]	[Br] eq.	pH	Conversion	13a	13b	13c
1 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	1.1	1	66%	95%	5%	–
2 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	1.1	6	–	–	–	–
3 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	2.2	1	100%	2%	50%	48%
4 ^b	NH ₄ VO ₃ ; KBr; H ₂ O ₂	2.2	6	–	–	–	–
5 ^a	HOBr	1.1	1	>5%	traces	–	–
6 ^a	HOBr	1.1	6	–	–	–	–
7 ^a	HOBr	2.2	1	6%	traces	–	traces
8 ^a	HOBr	2.1	6	–	–	–	–
9 ^{c,d}	Br ₂	1.0	1-2	68%	50%	–	50%

^aprocedure A; ^bprocedure B; ^cprocedure C; ^d no further conversion of starting material **12** was observed after 30 min;

Procedure C

Thymol (178.6 mg; 1.19 mmol; 1.0 eq.) was dissolved in glacial acetic acid (10 mL). The solution was cooled to 0 °C and kept in the dark. A solution of bromine (1 M in *t*BuOH; 1.2 mL; 1.0 eq.) was added dropwise. The mixture was equilibrated to rt and conversion was monitored by TLC. The reaction was quenched by the addition of sat. Na₂S₂O₃ solution and the aqueous phase was neutralized by

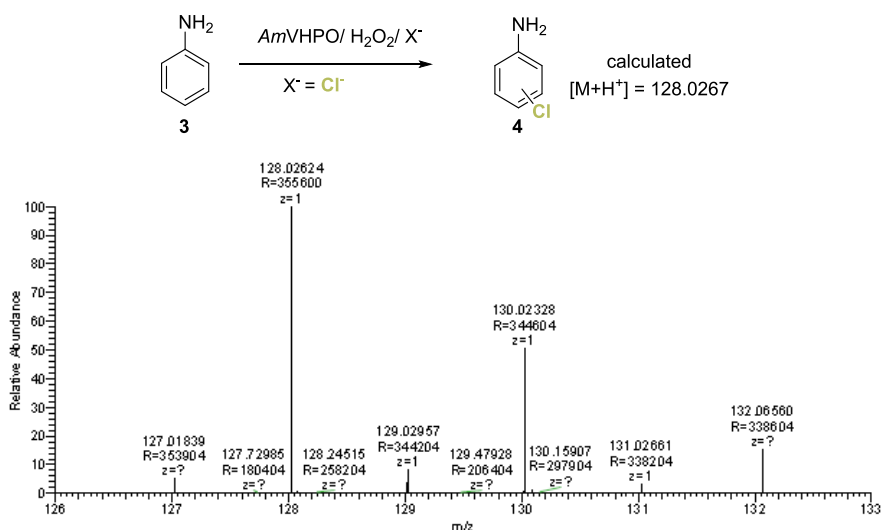
adding 2 M NaOH. Subsequently, the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 25 mL), dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. Conversion and product distribution was determined by GC MS and ¹H-NMR from the crude mixture.

13.7 Verification of the Chlorinated Products 4, 6 and 8 by HRMS

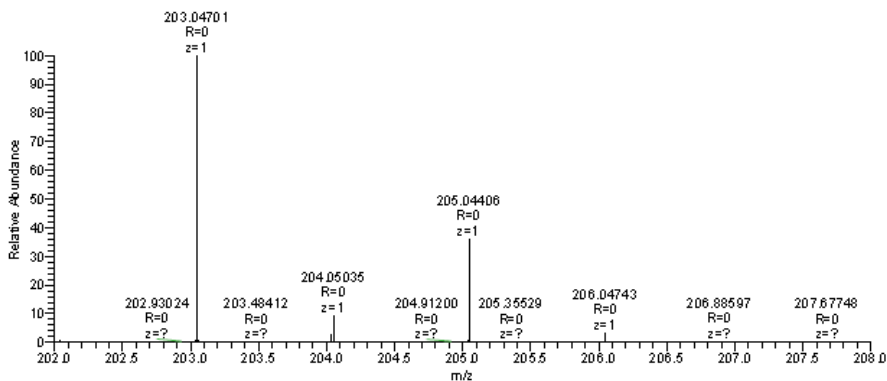
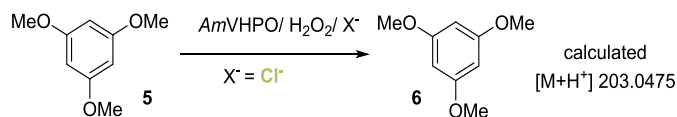
Chlorination of Aniline (3) and 1,3,5-Trimethoxybenzene (5)

The reactions were performed in a MES buffered (pH 6.0, 62.5 mM) mixture of MeCN/water (1/1) in a total volume of 1.6 mL. AmVHPO (800 μ L; 1.1 mg mL⁻¹; 6 U; preincubated with 300 μ L of 30 mM K₃VO₄), KCl (81.25 mM) and H₂O₂ (1.1 eq) were added to 11.9 μ mol of substrate. The reaction was heated to 30°C and mixed at 300 rpm. The reactions were stopped by the addition of sat. NaCl and sat. (NH₄)₂SO₄ solution in order to separate precipitated enzyme and to allow phase separation. EtOAc (300 μ L) was added to the organic layer, the mixture was extracted with EtOAc and the organic phase was analyzed.

In addition, the reaction was carried out without addition of enzyme in order to proof the absence of a non-enzymatic background reaction.

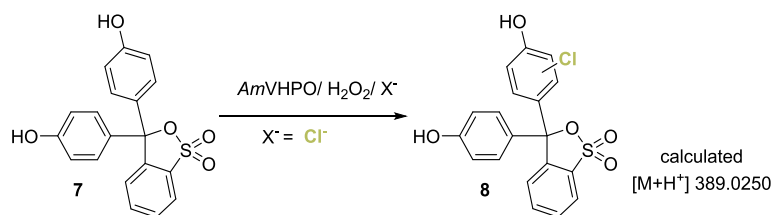


HRMS (APCI) calcd. for C₆H₇ClN [M+H⁺] 128.0267, found m/z: 128.0262; ms SIM [126.00 - 133.00]; NL 5.8·10⁵



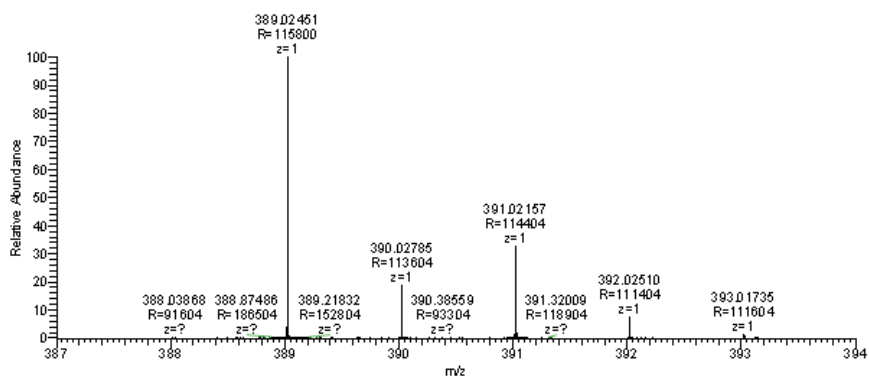
HRMS (APCI) calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{ClO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 203.0475, found m/z: 204.0470; ms SIM [202.00 208.00]; NL $7.34 \cdot 10^6$

Chlorination of Phenol Red (7)



To a solution of **7** (0.3 μmol) in MES buffer (pH 6.0, 42 mM) was added KCl (150 mM), hydrogen peroxide (3 mM) and AmVHPO (166 μL ; 1.1 mg mL^{-1} ; preincubated with 33 μL K_3VO_4 ; 3 mM). The reaction mixture was stirred for 72 h. Subsequently, the enzyme was removed by filtration and the mixture was subjected to LC-MS. In addition, the reaction was carried out without addition of enzyme in order to proof the absence of a non-enzymatic background reaction.

HRMS (APCI) calcd. for $C_{19}H_{14}ClO_5S$ $[M+H]^+$ 389.02505, found m/z : 389.02451. ms SIM [387.00 - 394.00]; NL $2.53 \cdot 10^6$



14. References

- [1] W. Kabsch, *Act. Crystal. D* **2010**, *66*, 125-132.
- [2] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Act. Crystal. D* **2011**, *67*, 235-242.
- [3] A. Vagin, A. Teplyakov, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022-1025.
- [4] E. Garcia-Rodriguez, T. Ohshiro, T. Aibara, Y. Izumi, J. Littlechild, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 275-282.
- [5] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Act. Cryst. D* **2010**, *66*, 486-501.
- [6] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Act. Cryst. D* **1997**, *53*, 240-255.
- [7] E. Verhaeghe, D. Buisson, E. Zekri, C. Leblanc, P. Potin, Y. Ambroise, *Anal. Biochem.* **2008**, *379*, 60-65.
- [8] Different vanadate(V) sources (NH_4VO_3 , K_3VO_4 , and Na_3VO_4) were tested. No significant difference in AmVHPO activity was observed.
- [9] H. S. Soedjak, A. Butler, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 5015-5017.
- [10] P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyanaga, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4268-4270.
- [11] F. Björkstén, *Eur. J. Biochem.* **1968**, *5*, 133-142.
- [12] H. McWilliam, W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley, R. Lopez, *Nucl. Acids Res.* **2013**, *41*, W597-W600.
- [13] M. Sandy, J. N. Carter-Franklin, J. D. Martin, A. Butler, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12086-12088.
- [14] M. N. Isupov, A. R. Dalby, A. A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G. N. Murshudov, J. A. Littlechild, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1035-1049.
- [15] M. Weyand, H. J. Hecht, M. Kieß, M. F. Liaud, H. Vilter, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 595-611.
- [16] a) A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 392-396; b) W. Hemrika, R. Renirie, S. Macedo-Ribeiro, A. Messerschmidt, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23820-23827.
- [17] J. B. Fournier, E. Rebuffet, L. Delage, R. Grijol, L. Meslet-Cladiere, J. Rzonca, P. Potin, G. Michel, M. Czjzek, C. Leblanc, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 7561-7573.
- [18] C. Leblanc, H. Vilter, J. B. Fournier, L. Delage, P. Potin, E. Rebuffet, G. Michel, P. L. Solari, M. C. Feiters, M. Czjzek, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301-302*, 134-146.
- [19] a) S. Song, X. Sun, X. Li, Y. Yuan, N. Jiao, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2886-2889; b) F. Sabuzi, E. Churakova, P. Galloni, R. Wever, F. Hollmann, B. Floris, V. Conte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 3519-3525.
- [20] a) E. Fernández-Fueyo, M. van Wingerden, R. Renirie, R. Wever, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4035-4038; b) K. Kikushima, T. Moriuchi, T. Hirao, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 340-342.
- [21] G. Bhave, C. F. Cummings, R. M. Vanacore, C. Kumagai-Cresse, I. A. Ero-Tolliver, M. Rafi, J.-S. Kang, V. Pedchenko, L. I. Fessler, J. H. Fessler, B. G. Hudson, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 784-790.
- [22] D. Wischang, J. Hartung, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9456-9463.

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2018

Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations

Catharina Julia Seel, Antonín Králík, Melanie Hacker, Annika Frank, Burkhard König,* and Tanja Gulder*

– SUPPORTING INFORMATION –

Atom-Economic Electron Donors for Photobiocatalytic Halogenations

Catharina J. Seel,^a Antonín Králík,^b Melanie Hacker,^b Annika Frank,^c Burkhard König^b and Tanja Gulder^{a*}

^a*Department of Chemistry and Catalysis Research Center (CRC), Technical University Munich, Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching, Germany*

^b*Institute of Organic Chemistry, University of Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg, Germany*

^c*Department of Chemistry, Center for Integrated Protein Science, Technical University Munich, Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching, Germany*

1. General Information	1
1.1 Analytical and Preparative Procedures	1
1.2 Light Sources	2
2. Cloning, Protein Production and Purification	3
2.1 Heterologous Production of <i>Ci</i> VHPO	3
2.2 Heterologous Production of <i>Am</i> VHPOII	4
2.3 Comparison of <i>Am</i> VHPO and <i>Am</i> VHPOII	6
2.4 Preparation of Lyophilized Lysate (<i>Am</i> VHPO)	6
2.5 Specific Activities	7
3. Quantitative Assays	8
3.1 MCD Assay	8
3.2 Horseradish Peroxidase Assay for H ₂ O ₂ Quantification (POD Assay)	8
3.3 Kinetics of H ₂ O ₂ Generation in MES Buffer Using FMN as photocatalyst	9
3.4 Kinetic Measurements of the O ₂ -Consumption	10
4. Photobiocatalytic Reactions	11
4.1 Photochemical Set-Up	11
4.2 General Procedure	11
4.3 GC and HPLC Measurements	13
4.4 Overview of the Halogenated Products and Retention Times	14

4.5 Bromination of <i>N,N</i> -Dimethylaniline Using Different Methods for H ₂ O ₂ Supply	16
4.6 Investigations on Different Enzymes, Halides and Applicability of Lyophilized Lysate	17
4.7 Optimization of Catalyst Loading and Investigations on the Inactivation of the Enzyme	19
4.8 Comparative Reactions with H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	23
4.9 Control Reactions Regarding FMN-Independent H ₂ O ₂ Evolution	24
4.10 Investigations on Decomposition of the Substrates due to Photooxidation	26
4.11 Investigations on the Buffer Concentration	28
5. Flavin Properties	29
5.1 Degradation of the Enzyme by Excited FMN in High Catalyst Loadings	29
5.2 Self-Oxidation of FMN	29
5.3 Absorption Spectra of FMN in Different Buffers	29
6. Water-Splitting Using Au-TiO₂	30
6.1 Evaluation of Different Light Sources for H ₂ O ₂ Generation via Water Oxidation	30
6.2 Kinetics of the H ₂ O ₂ Evolution	31
6.3 Comparison of the Activity of Different Forms of TiO ₂	32
6.4 Water-Splitting Coupled to <i>Am</i> VHPO Catalyzed Bromination	34
7. Synthesis of the Halogenated Reference Material	35
7.1 General Procedure for the Synthesis of the Halogenated Products	35
7.2 Synthesis of Ethyl 4-bromo-3,5-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxylate (2f)	35
7.3 Up-Scaled Enzymatic Reaction on (<i>E</i>)-1,3-Dimethoxy-5-(4-methoxystyryl)benzene (1k)	35
7.4 Preparation of (<i>E</i>)-2-Chloro-1,5-dimethoxy-3-(4-methoxystyryl)benzene (3d)	36
8. References	40
9. NMR Spectra	41

1. General Information

Solvents used in reactions were p.a. grade. Solvents for chromatography were technical grade and distilled prior to use. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on Merck silica gel aluminum plates with F-254 indicator using UV light as the visualizing agent. Silica gel Merck 60 (particle size 0.63 – 0.2 mm) was used for flash column chromatography. Solvent mixtures are reported as volume/volume (v/v). NMR spectra were recorded on Bruker AV300, Bruker AV400 or Bruker AV500 spectrometers. The spectra were calibrated using residual undeuterated solvents as internal references (CHCl_3 @ 7.26 ppm, DMSO @ 2.50 and 3.33 ^1H NMR and CHCl_3 @ 77.00 ppm, DMSO @ 39.52 ^{13}C NMR). The following abbreviations (or combinations thereof) are used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, dt = doublet of triplets, q = quartet, m = multiplet, br = broad. In addition, the following abbreviations are used: EtOAc = ethyl acetate, MeCN = acetonitrile, rt = room temperature, sat = saturated, MES = 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid, NaOAc = sodium acetate, Tris = tris(hydroxymethyl)amino-methane, MOPS = 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, HEPES = 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid, EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid, TFA = trifluoroacetic acid, MCD = monochlorodimedone, IPTG = isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, Ni-NTA = nickel-nitrilotriacetic acid, LB = lysogeny broth, TB = terrific broth, FMN = favin mononucleotide, RFTA = riboflavin tetraacetate, PMSF = phenylmethyl-sulfonyl fluoride, SDS = sodium dodecyl sulfate, n.d. = not determined. . RFTA^[1] and Au-TiO₂^[2] were prepared according to known literature procedures. The DA-64 dye was purchased from Ark Pharm Inc. All other chemicals were purchased (Sigma Aldrich, Acros, or TCI) at the highest commercial quality and used without further purification or synthesized as described below. Vanadium-dependent bromoperoxidase from *Corallina officinalis* (CoVHPO), glucose oxidase from *Aspergillus niger* and horseradish peroxidase were purchased from Sigma-Aldrich.

1.1 Analytical and Preparative Procedures

Mass spectra (**LC-ESI-MS**) were determined on a Thermo LCQ fleet coupled with a Dionex UltiMate 3000 HPLC. **GC-MS** measurements were conducted on a Finnigan MAT SSQ 7000 (MS-EI, 70 eV; CI, 100 eV). HR-ESI-MS mass spectra were recorded on a Thermo LTQ FT Ultra coupled with a Dionex UltiMate 3000 HPLC system. Gas chromatography (**GC**) was performed on two different instruments. **GC(1)** measurements were carried out on a HP 6890 Series GC instrument (Agilent, equipped with a FID detector and a HP-5 capillary column [length = 29.5 m]). Hydrogen was used as the carrier gas and the constant-flow mode (flow rate = 1.8 mL min⁻¹) with a split ratio of 1:20. The following temperature-program was used: 60°C for 3 min, 15°C min⁻¹ to 250°C in 12 min, and 250°C for 5 min. **GC(2)** measurements were carried out on a HP 6890 Series GC instrument (Agilent, equipped with a FID detector and a HP-5 capillary column [length = 30.0 m]). Helium was used as the carrier gas and the constant-flow mode (flow rate = 1.0 mL min⁻¹) with a split ratio of 1:40. The following temperature-program was used: 40°C for 3 min, 15°C min⁻¹ to 280°C in 16 min, and 280°C for 5 min. **Head-space GG** measurements were performed on INFICON 3000 Micro GC equipped with MS-5A column using argon as a carrier gas. High performance liquid chromatography (**HPLC**) analysis was performed on a HITACHI Chromaster system employing the following conditions: 150 x 4 mm Eurospher II (KNAUER®), 100 Å, 5 μm , C18, 25°C, flow rate: 1.0 mL min⁻¹, water (+0.01% TFA)/MeCN

(+0.01% TFA) gradient: 90/10 → 0/100 in 13 min. For medium pressure liquid chromatography (**MPLC**) a Reveleris® X2 MPLC system (Grace) was used together with Reveleris® Reverse Phase (RP) C18 columns (Grace) using UV-detection at 220 nm, 254 nm, and 280 nm. **Protein concentrations** were determined using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific), $\epsilon(\text{AmVHPO+His}) = 65780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, MW = 73.13 kDa; $\epsilon(\text{CVCPO+His}) = 91790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, MW= 72.59 kDa. **UV/Vis spectra** were recorded on BioTek® Eon and Agilent Technologies Cary 100 spectrophotometers. *In situ* concentration of oxygen was monitored by PreSens Fibox 3 **oxygen sensor**.

1.2 Light Sources

Sample irradiation was performed using 455 nm (OSRAM Oslon SSL 80 royal-blue LEDs, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ ($\pm 15 \text{ nm}$), 3.5 V, 700 mA) or 375 nm (Avonec 370 – 380 nm UV-A LEDs, $\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$, 3.5 – 4.5 V, 750 mA) LED light sources.

2. Cloning, Protein Production and Purification

The heterologous expression and purification of the *Acaryochloris marina* vanadium-dependent haloperoxidase (*Am*VHPO) has been reported previously.^[3] The protocol was slightly adjusted using Ni-NTA beads (Jena Bioscience) instead of a HisTrap column.

2.1 Heterologous Production of *Ci*VHPO

For recombinant production of the *Curvularia inaequalis* vanadium-dependent haloperoxidase (*Ci*VHPO, Genbank accession number CAA59686), the codon-optimized synthetic gene (Eurofins) was introduced into a pETDuet-1 (Novagen) vector by restriction digest (*Pst*I, *Not*I) and ligation. Successful insertion of the gene and the absence of undesired mutations were verified by Sanger sequencing (GATC). As a consequence of the cloning process, the VHPO open reading frame was modified by the addition of a *N*-terminal hexahistidine sequence.

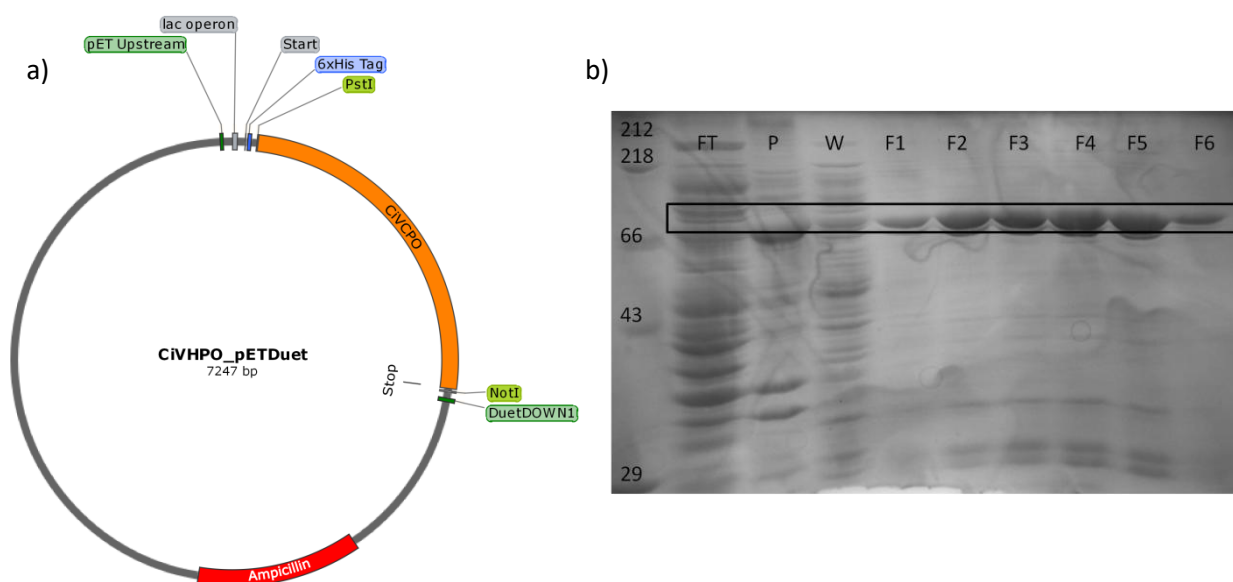


Figure S1. a) Vector map of the pETDuet::civhpo construct. b) SDS-Page of the purification of *Ci*VHPO; FT = flow-through; P = pellet; W = wash; F1 – F6 = elution fractions; the corresponding molecular weights of the protein marker are stated in kilodaltons (kDa); size of *Ci*VHPO+His approx. 73 kDa.

The obtained pETDuet::civhpo expression vector was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells for protein production. Recombinant cells were grown on LB agar plates and subsequently used for inoculation of TB liquid cultures. All media contained ampicillin as a selective antibiotic at a final concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cells were grown in 1.5 – 3 liter expression cultures at 37°C while shaking at 150 – 180 rpm. At an optical density of 0.6, protein production was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 0.1 mM and cultures were incubated overnight at 16°C. Cells were harvested by centrifugation and washed with 0.9% NaCl solution. The cells were then resuspended in lysis buffer (10 mM imidazole, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10% glycerol) and PMSF (protease inhibitor), lysozyme and DNase were added. The suspension was sonicated on ice and centrifuged at 14,000 g for 30 min. Subsequently, the soluble fraction was incubated with Ni-

NTA resin (Jena Bioscience, 1 mL per 1 L culture) and gently shaken on ice for 45 min. Thereafter, the resin-containing solution was transferred to a column and the flow-through was eluted (gravity flow). After washing the bead bed with 20 mL of binding buffer (30 mM imidazole, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% glycerol), the His-tagged protein was eluted in fractions of 0.5 mL (500 mM imidazole, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% glycerol). Fractions of the highest apparent purity were pooled and then subjected to a buffer-exchange by the use of PD-10 desalting columns (GE Healthcare). The exchanged buffer was used for storage of the enzyme (50 mM Tris pH 7.0, 100 μM Na₃VO₄). After concentration (if required), the enzyme was flash-frozen using liquid nitrogen and stored at -80°C until further use.

Alternatively, a buffer containing 50 mM MES pH 6.0, 300 mM NaCl and 100 μM Na₃VO₄ was used in order to keep the pH of the reactions at pH 6, more accurately. The stability of *AmVHPO* in the MES storage buffer, however, was notably lower.

2.2 Heterologous Production of *AmVHPOII*

The gene sequence of the isoenzyme *AmVHPOII* (Genbank accession number WP_012161787) was PCR-amplified using genomic DNA from *Acaryochloris marina* (strain MBIC 11017) as a template. The sequence was then introduced into a pETDuet-1 (Novagen) vector by restriction digest (BamHI, PstI) and ligation. Successful insertion of the gene and the absence of undesired mutations were verified by Sanger sequencing (GATC). Analogous to the above described cloning strategy for *CIVHPO*, the protein was tagged *N*-terminal with a His₆-tag. *E. coli* BL21 (DE3) was used as expression host. The heterologous production was carried out as described in 2.1, except for the utilization of LB media

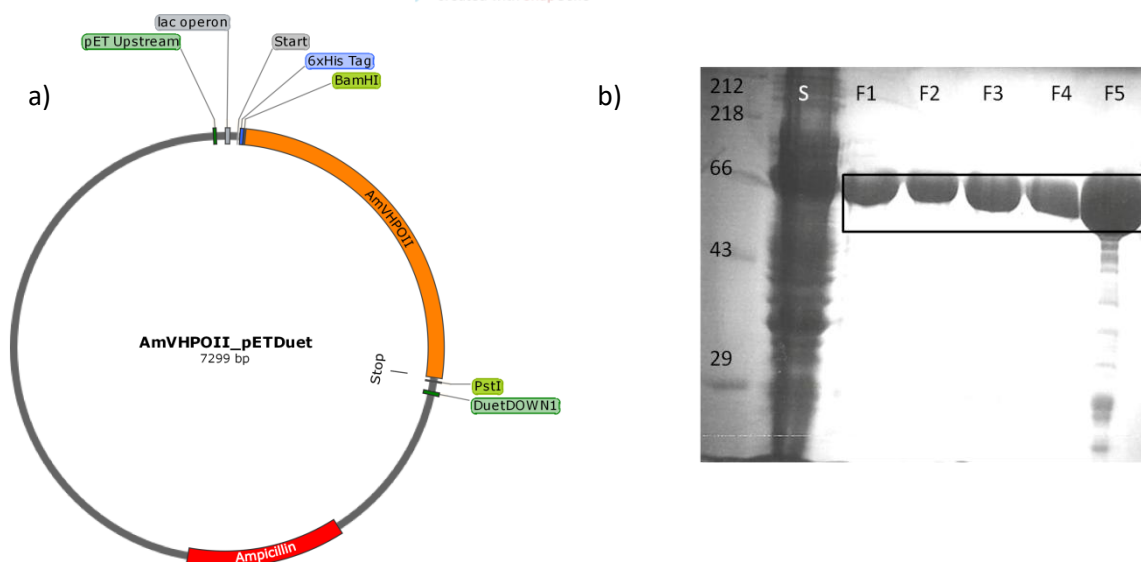


Figure S2. a) Vector map of the pETDuet::*amvhpoll* construct. b) SDS-Page of the purification of *AmVHPOII*; S = supernatant; F1–F5 = elution fractions; the corresponding molecular weights of the protein marker are stated in kilodaltons (kDa); size of *AmVHPOII*+His approx. 70 kDa.

instead of TB media and the induction with 1 mM IPTG final concentration. The Ni-affinity purification was followed by size-exclusion chromatography. The relatively late elution of the protein

pointed to a smaller oligomeric state compared to the isoenzyme *AmVHPO*. For gel filtration a flow-rate of 1.0 – 1.6 mL min⁻¹ in a single buffer (20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.001% NaN₃) was used. For activity assays, the buffer was exchanged (to 50 mM MES pH 6.0, 100 μM Na₃VO₄) by the use of a PD-10 column.

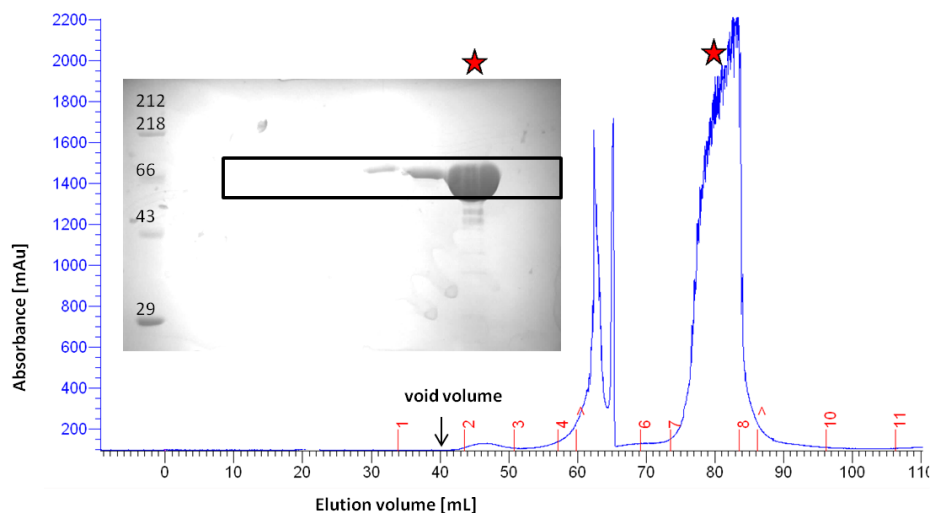


Figure S3. UV diagram of the size-exclusion chromatography of *AmVHPOII* using a Superdex S200 analytical gel filtration column (GE healthcare). The peak fraction of *AmVHPOII* (marked with a red star) eluted approx. 35 mL after the expected void volume of the column, suggesting the presence of either a dimer or a monomer. In comparison, the isoenzyme *AmVHPO* elutes shortly (approx. 10 mL) after the void volume and has been shown to form a homododecameric structure. The fractions were analyzed by SDS-Page; the corresponding molecular weights of the protein marker are stated in kilodaltons (kDa).

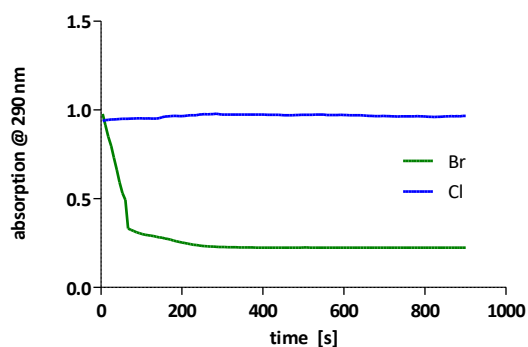


Figure S4. MCD Assay (see in 3.1.) as a proof of *ex vivo* functionality of *AmVHPOII*. Bromination activity, but no chlorination activity was observed in this standard assay for VHPOs. It is worth mentioning, however, that the MCD assay is not a fully reliable indicator for chlorination activity as selective chloroperoxidases from *Streptomyces*, for example, do not promote the chlorination of MCD.^[4]

2.3 Comparison of *Am*VHPO and *Am*VHPOII

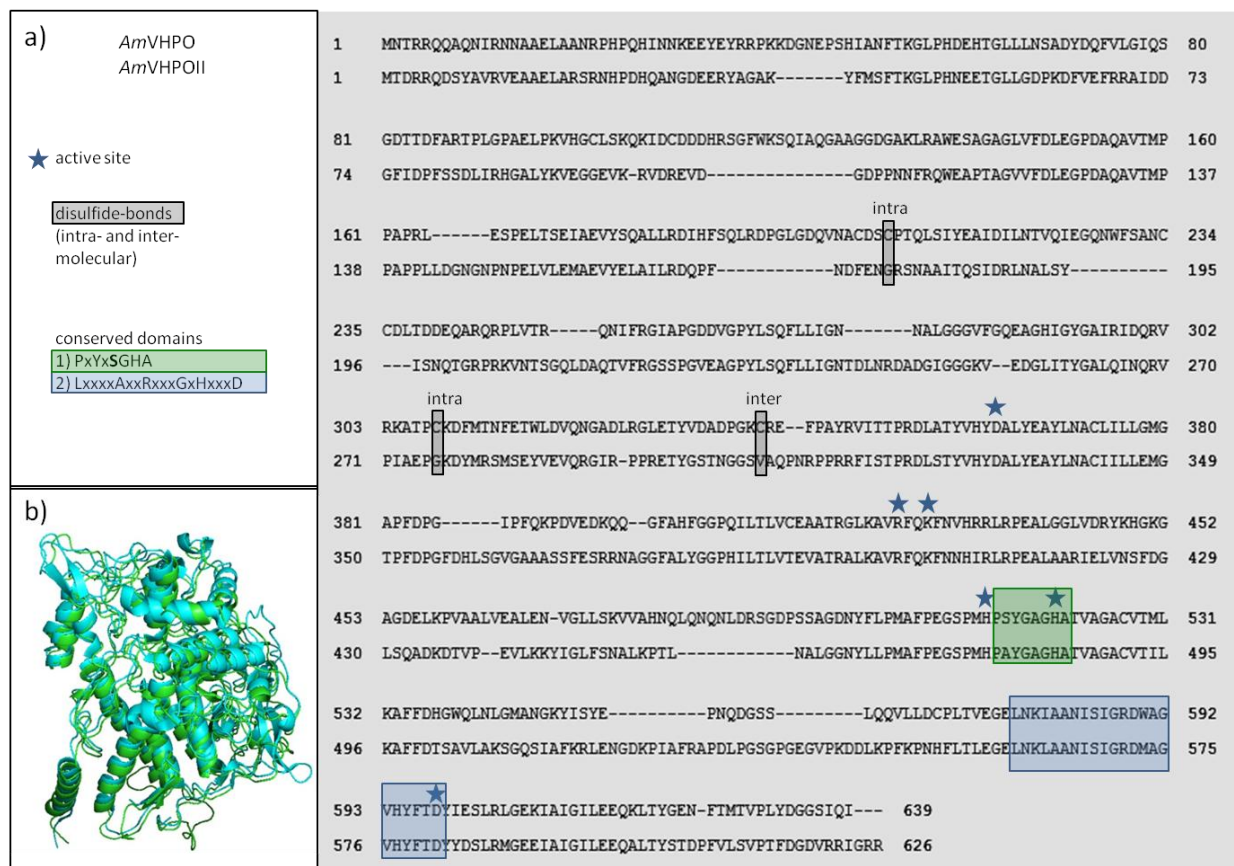


Figure S5. a) Sequence alignment of the two isoenzymes *Am*VHPO and *Am*VHPOII from *Acaryochloris marina*. Active site residues are labeled with an asterisk, intra- and intermolecular disulfide bonds present in *Am*VHPO are most likely not formed in *Am*VHPOII (no respective cysteine residues are present). Typical conserved domains in vanadium-dependent haloperoxidases^[5] are labeled with a green and blue box. Interestingly, the conserved serine (green box) is replaced by an alanine in both VHPOs from *Acaryochloris marina*. b) Superposition of the crystal structure of *Am*VHPO (PDB ID: 5LPC, cyan) and a homology model for *Am*VHPOII generated by MODELLER^[6] (green).

In addition to other striking similarities to algal VHPOs, a second isoenzyme is also present in the *A. marina* genome (a set of two VHPOs was also found in brown algae *Ascophyllum nodosum* and red seaweed *Corallina officinalis* and *Corallina pilulifera*, respectively). The two isoenzymes are not embedded in a biosynthetic gene cluster, the physiological function and natural substrate(s) thus remain unclear. Interestingly, the isoenzyme (*Am*VHPOII) seems to possess a different overall structure, lacking the characteristic disulfide bonds found in *Am*VHPO (43% sequence identity to *Am*VHPO; e-value $7e^{-146}$). We heterologously produced *Am*VHPOII and investigated its halide specificity. Just like *Am*VHPO, no chlorination activity, only bromination activity was detected in the MCD assay (Figure S4). Furthermore, we found — based on a comparably high retention time in size exclusion chromatography — that *Am*VHPOII most likely does not form a homododecamer like *Am*VHPO, but occurs rather in a dimeric or monomeric state.

2.4 Preparation of Lyophilized Lysate (*AmVHPO*)

Lyophilized lysate was obtained from 7.4 g cell pellet which was resuspended in 80 mL lysis buffer (10 mM imidazole, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl). After sonication and centrifugation, the supernatant was subjected to a preliminary purification step (the supernatant was heated to 65°C for 30 min, followed by centrifugation at 40,000 g for 30 min). From the resulting supernatant, 15 mL were gathered and freeze-dried. Aliquots of 10 mg of the residual powder were used for the enzymatic reactions.

2.5 Specific Activities

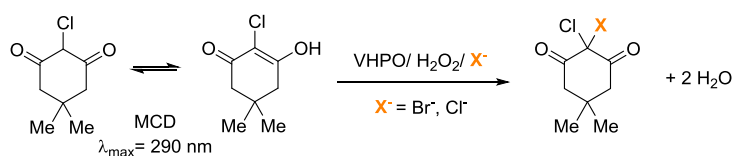
Table S1. Specific activities of the employed protein from different purification batches determined by the MCD Assay (see in 3.1).

c [mg mL⁻¹]	A_{spec} (Br) [U mg⁻¹]
<i>AmVHPO</i>	
3.50	6.13
1.46	3.55
1.47	n.d.
3.00	6.41
2.20	n.d.
1.50	32.54
1.30	7.69
4.50	39.51
2.90	31.14
1.62	2.71
1.71	3.07
<i>CiVHPO</i>	
0.62	6.43
<i>AmVHPOII</i>	
0.90	11.7

The specific activity of *AmVHPO* and *AmVHPOII* were determined at pH 6.0 (MES buffer), the specific activity of *CiVHPO* at pH 5.0 (MES buffer).

3. Quantitative Assays

3.1 MCD Assay^[7]

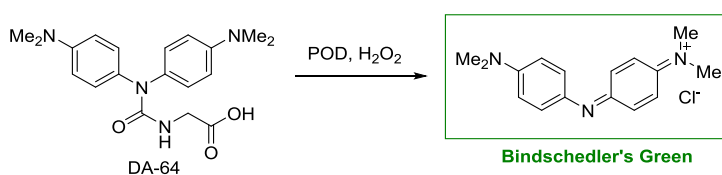


A 1 mM stock solution of MCD was prepared in 2 M aqueous NaOAc. Assays were performed in triplicate in 96-well polystyrene microplates (Brand® F-bottom, UV-transparent, pureGrade™). For initiation, H₂O₂ (30 μL, 10 mM final) was added to the assay mixture (270 μL), containing MES buffer (50 mM, pH 6.0), MCD (50 μM), KBr (200 mM) or KCl (200 mM), Na₃VO₄ (1 μM) and VHPO (1 μL of the purification batch or dilutions thereof) in an overall volume of 300 μL. The decrease in absorbance at 290 nm was monitored continually while keeping the temperature at 30°C and mixing at 410 rpm. The specific activity of each purification batch was calculated from the decrease in absorbance A₂₉₀ using the equation:

$$\text{specific activity } [\mu\text{mol MCD}/(\text{mg enzyme} \cdot \text{min})] = \frac{\Delta A_{290} [\text{s}^{-1}] \cdot 60 \cdot V_{\text{assay}} [\text{mL}]}{\epsilon_{\text{MCD}} \cdot d \cdot V_{\text{enzyme}} [\text{mL}] \cdot c_{\text{enzyme}} [\text{mg mL}^{-1}]}$$

$$\text{with } \epsilon_{\text{MCD}} = 19.9 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ and } d = 0.91 \text{ cm}$$

3.2 Horseradish Peroxidase Assay for H₂O₂ Quantification (POD Assay)



In order to quantify H₂O₂ concentrations, a photometric assay based on the dye DA-64 was applied. In the presence of hydrogen peroxide, the colorless dye is converted to Bindschedler's Green ($\lambda_{\text{max}} = 727 \text{ nm}$) in a reaction catalyzed by the enzyme horseradish peroxidase (POD).^[8]

A freshly pre-mixed working solution (250 μL; DA-64 1 mM (higher H₂O₂ concentrations) or 0.1 mM (lower H₂O₂ concentrations); POD 0.4 U mL⁻¹ (approx. 0.04 U mL⁻¹ for higher H₂O₂ concentrations); MES buffer pH 6.0, 50 mM) was added to the hydrogen-peroxide-containing probe or dilutions thereof (250 μL). The resulting assay solution was then incubated at 37°C for 30 min, and absorbance of the solution at 727 nm was recorded.

For quantification, a calibration curve was established by conducting the assay described above with a dilution series of defined concentrations of H₂O₂ (Figure S6).

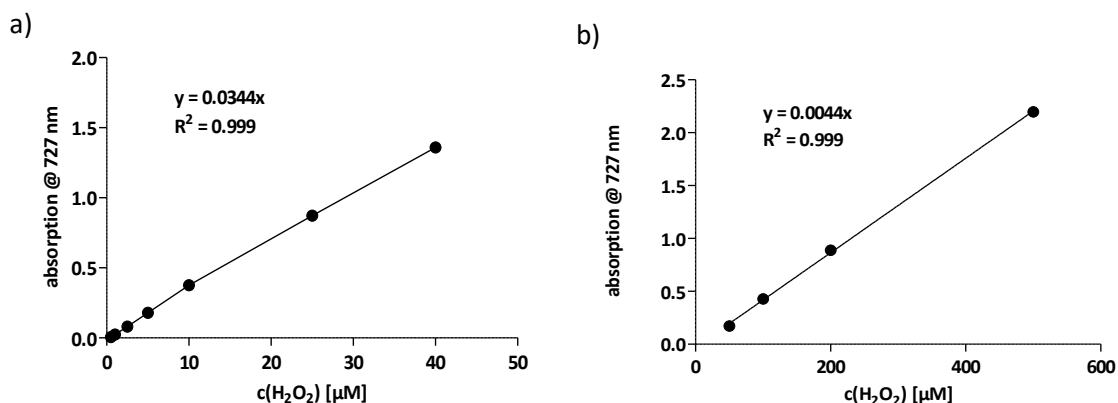


Figure S6. Calibration curve for a quantification of H₂O₂ concentrations using the POD enzymatic assay. a) Calibration for lower concentrations ranging from 0–40 μM (using 0.1 mM solution of DA-64). b) Calibration for higher concentrations ranging from 50–500 μM (using 1 mM solution of DA-64).

3.3 Kinetics of H₂O₂ Generation in MES Buffer Using FMN as Photocatalyst

The reaction setup analogous to previously described photobiocatalytic reactions was used (see Section 4.2). An aqueous solution (1.6 mL) containing FMN (37.15 μM, corresponds to 0.5 mol% with regard to the substrate as described in Section 4.2) and MES buffer (100 mM, pH 6.0) in an open 5 mL crimp-top vial was irradiated with 455 nm LED for a selected amount of time. Afterwards, the reaction mixture was diluted 50-times and analyzed by the POD assay as described in Section 3.2. In parallel, we investigated if the presence of KBr influences the FMN-mediated photocatalysis (the kinetic experiment was performed as described above without KBr). No difference in the hydrogen-peroxide-production rate was observed.

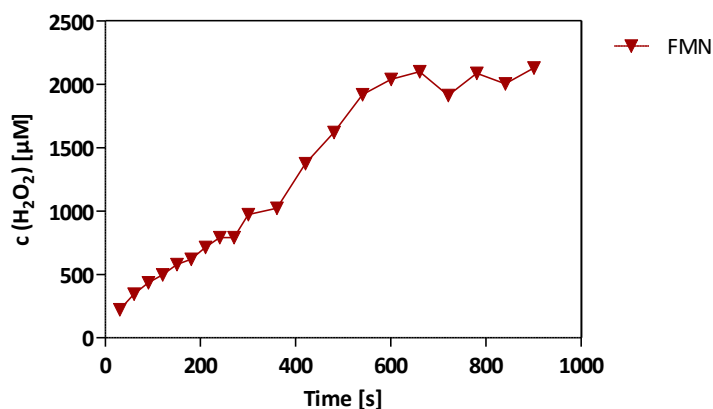


Figure S7. Kinetic of the H₂O₂ evolution by FMN in a MES-buffered solution. (cf. Figure 2, main text).

3.4 Kinetic Measurements of the O₂-Consumption

To confirm the crucial role of oxygen in flavin-catalyzed hydrogen-peroxide evolution, the change of the oxygen concentration in an aqueous FMN solution under irradiation with blue light in a sealed vial was monitored with an oxygen probe.

A screw-top vial (4.5-cm-high) equipped with a phosphorescent dot for oxygen sensing and a stirring bar filled to the top with an aqueous solution of FMN (37.15 $\mu\text{M} \cong 0.5 \text{ mol}\%$; 371.5 $\mu\text{M} \cong 5 \text{ mol}\%$; 743 $\mu\text{M} \cong 10 \text{ mol}\%$; 2.23 mM $\cong 30 \text{ mol}\%$) and MES buffer (100 mM, pH 6) was placed on a magnetic stirrer above a single 455 nm LED equipped with a glass rod. The solution was constantly stirred and after one minute of oxygen-concentration measurement, the light was switched on (black arrow in Figure S8) and the sample was irradiated for 4 min.

The results of these experiments can be found in Figure S8 confirming that oxygen is consumed during this reaction. The kinetic profiles were measured for all FMN concentrations and showed comparable behavior. The calculated light-penetration depth for a 37.15 μM (0.5 mol%) solution of FMN in 100 mM MES buffer at 455 nm is 2.66 cm. These findings suggest that all light has been absorbed, indicating that the rate-determining factor of this reaction under given conditions is the intensity of the used light source.

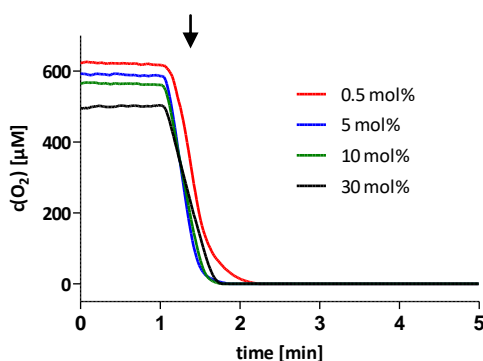


Figure S8. Change in oxygen concentration in an aqueous solution containing MES buffer and different concentrations of FMN under blue-light irradiation.

4. Photobiocatalytic Reactions

4.1 Photochemical Set-Up



Figure S9. a) Image of the photocatalytic set-up combined with a horizontal shaker. b) Schematic image of the set-up including cooling block and LED array.^[9]

FMN-catalyzed photobiocatalytic reactions were performed using 455 nm LEDs. Reaction vials (5 mL crimp-cap vials with loosely attached cap to allow oxygen supply) were illuminated from the bottom and cooled from the side using a custom-made aluminum cooling block connected to cooling-water supply. A horizontal shaker was placed below the LED array to allow for homogeneous mixing without mechanically disrupting the enzyme.

4.2 General Procedure

The enzymatic reactions were performed as described below and terminated by the addition of sat. NaCl solution. EtOAc (300 μ L) and 100 μ L of a stock solution of internal standard (0.06 M phenol for HPLC; 0.06 M dodecane or toluene for GC analysis) were added, the mixture was extracted with EtOAc and the organic phase was analyzed (dilution 1/10 for HPLC analysis). For NMR analysis, the mixture was extracted with EtOAc (3 \times 2 mL), the organic extract was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Subsequently, the internal standard (1,4-dibromobenzene) was added to the crude material and spectra were recorded in CDCl₃. The reaction scale was adjusted for the determination of the conversion by NMR: **1j** (25 μ mol); **1k** (12 μ mol for bromination, 7.5 μ mol for chlorination (0.5 mol% FMN), 3.7 μ mol for chlorination (H₂O₂)) and **1m** (23 μ mol).

Comparative Reactions with H₂O₂ (1.1 eq.)

The reaction mixture containing substrate (7.43 mM; 11.89 μ mol), KBr (1.1 eq; 8.13 mM or 2.2 eq; 16.26 mM), MES pH 6.0 (50 mM), Na₃VO₄ (187.5 μ M), H₂O₂ (1.1 eq; 8.13 mM or 2.2 eq; 16.26 mM) and VHPO (300 μ L, concentrations indicated) in MeCN/H₂O (1/1; total volume of 1.6 mL) was heated to 30°C and mixed at 300 rpm for 16 h.

Reactions with 0.5 mol% FMN in MES buffer

The reaction mixture in MeCN/H₂O (1/1; total volume of 1.6 mL) containing FMN (37.15 μM \cong 0.5 mol%), substrate (7.43 mM; 11.89 μmol), KBr (1.1 eq; 8.13 mM), MES pH 6.0 (100 mM), Na₃VO₄ (187.5 μM) and VHPO (300 μL, concentrations indicated) was irradiated for 16 h at rt.

Reactions with 10 – 30 mol% FMN, 1.1 eq. KBr in MES buffer

Aliquots of a stock solution of FMN in water (11.89 mM; 100 μL aliquot \cong 10 mol% etc.) were added to an aqueous mixture (total volume of 1.45 mL) containing MeCN (800 μL), substrate (11.89 μmol), KBr (1.1 eq; 8.98 mM), MES pH 6.0 (110.6 mM), Na₃VO₄ (207.3 μM) and VHPO (300 μL, concentrations indicated).

Reactions with 10 – 30 mol% FMN, 2.2 eq. KBr in MES buffer

Aliquots of a stock solution of FMN in water (11.89 mM; 100 μL aliquot \cong 10 mol% etc.) were added to an aqueous mixture (total volume of 1.46 mL) containing MeCN (800 μL), substrate (11.89 μmol), KBr (2.2 eq; 17.81 mM), MES pH 6.0 (109.5 mM), Na₃VO₄ (205.5 μM) and VHPO (300 μL, concentrations indicated).

Method A: Addition of 10 – 30 mol% FMN and irradiation for 1 – 2 h in the presence of enzyme (300 μL), total reaction time 16 – 72h.

Method B: Addition of 15 mol% FMN and irradiation for 30 min; after addition of enzyme (150 μL) 30 min without irradiation; addition of 15 mol% FMN and irradiation for 30 min; subsequently addition of enzyme (150 μL), total reaction time 16 h.

Method C: Addition of 5 mol% FMN every 30 min (3 h irradiation), total reaction time 16 h.

Method D: Addition of 30 mol% FMN (1 h irradiation), then addition of AmVHPO, total reaction time 16 h.

Method E: Addition of 15 mol% FMN and irradiation for 30 min; addition of 15 mol% FMN and irradiation for 30 min; subsequently addition of the substrate and enzyme (300 μL).

Method F: Addition of 15 mol% FMN and irradiation for 30 min; then addition of the substrate and enzyme (300 μL).

Method G (optimized procedure used for oxidation-sensitive substrates): Irradiation of 15 mol% FMN in MES-buffered solution for 15 min; addition of 15 mol% FMN and irradiation for further 15 min; subsequently addition of the substrate, enzyme (300 μL) and all other components of the mixture.

4.3 GC and HPLC Measurements

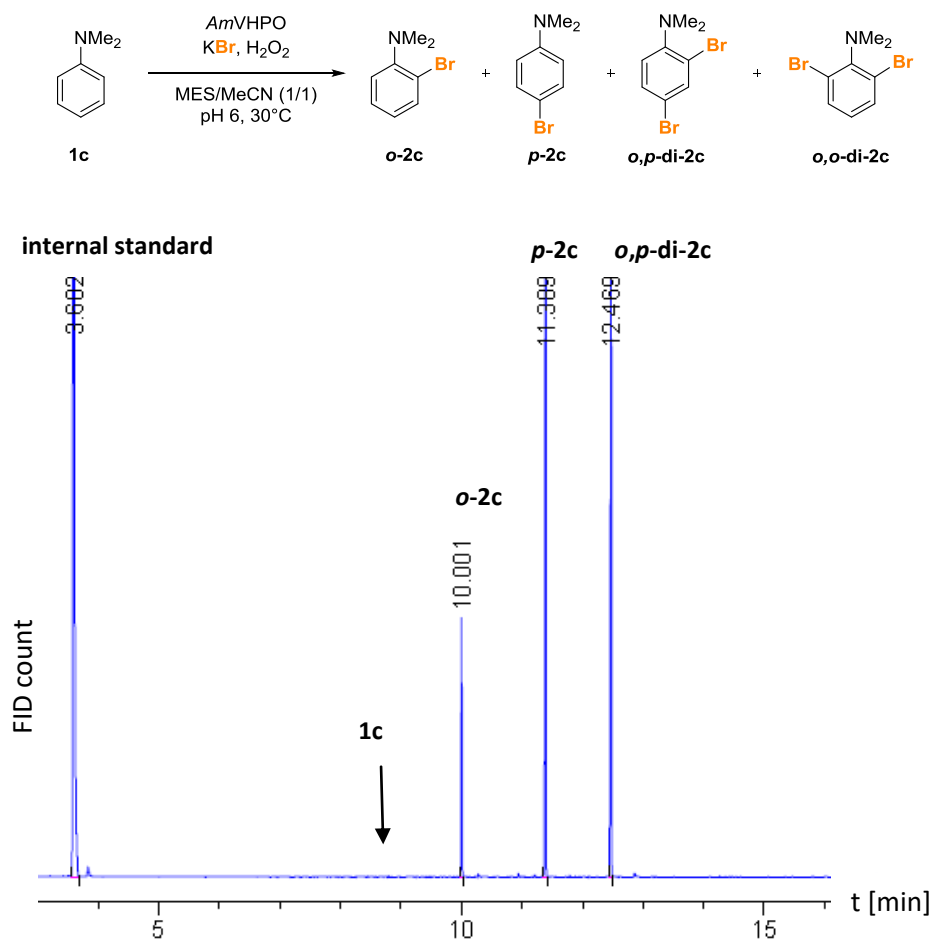


Figure S10. Example of a GC chromatogram of the enzymatic *N,N*-dimethylaniline (**1c**) bromination. The chemical structures of **o-2c**, **p-2c** and **o,p-di-2c** were confirmed by authentic references. Toluene was used as the internal standard. The formation of the dibrominated product **o,o-di-2c** was not observed.

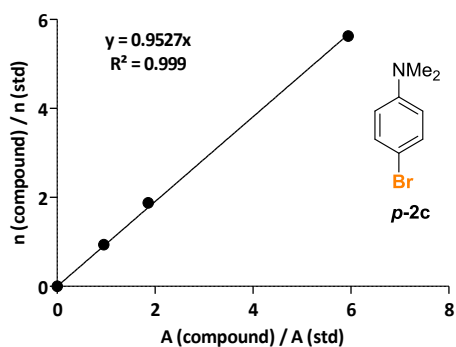
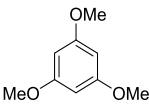
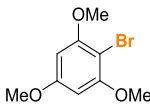
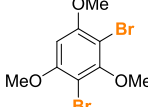
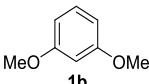
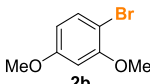
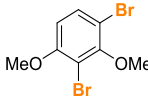
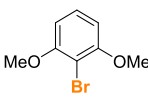
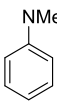
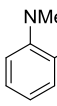
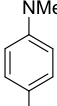
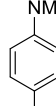
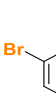
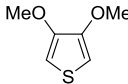
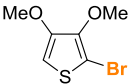
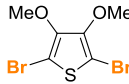
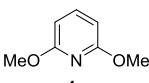
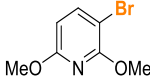
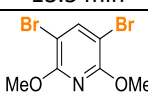


Figure S11. Example of a calibration curve using brominated reference material.

4.4 Overview of the Halogenated Products and Retention Times

GC(1) measurements were carried out on a HP 6890 Series GC instrument (Agilent, equipped with a FID detector and a HP-5 capillary column [length = 29.5 m]). Hydrogen was used as the carrier gas and the constant-flow mode (flow rate = 1.8 mL min⁻¹) with a split ratio of 1:20. The following temperature-program was used: 60°C for 3 min, 15°C min⁻¹ to 250°C in 12 min, and 250°C for 5 min. Dodecane was used as internal standard. **GC(2)** measurements were carried out on a HP 6890 Series GC instrument (Agilent, equipped with a FID detector and a HP-5 capillary column [length = 30.0 m]). Helium was used as the carrier gas and the constant-flow mode (flow rate = 1.0 mL min⁻¹) with a split ratio of 1:40. The following temperature-program was used: 40°C for 3 min, 15°C min⁻¹ to 280°C in 16 min, and 280°C for 5 min. Dodecane was used as internal standard. **GC(3)** measurements were carried out on a HP 6890 Series GC instrument (Agilent, equipped with a FID detector and a HP-5 capillary column [length = 30.0 m]). Helium was used as the carrier gas and the constant-flow mode (flow rate = 1.0 mL min⁻¹) with a split ratio of 1:40. The following temperature-program was used: 40°C for 3 min, 15°C min⁻¹ to 280°C in 16 min, and 280°C for 5 min. Toluene was used as internal standard. High performance liquid chromatography (**HPLC**) analysis was performed on a HITACHI Chromaster system employing the following conditions: 150 x 4 mm Eurospher II (KNAUER®), 100 Å, 5 µm, C18, 25°C, flow rate: 1.0 mL min⁻¹, water (+0.01% TFA)/MeCN (+0.01% TFA) gradient: 90/10 → 0/100 in 13 min and phenol as the internal standard.

				
1a	2a	di-2a		
HPLC: 10.3 min	10.8 min	12.1 min		
				
1b	2b	di-2b	regio-2b	
HPLC: 10.2 min	11.9 min	12.7 min	10.7 min (<5 %)	
				
1c	o-2c	p-2c	o,p-di-2c	o,o-di-2c
GC(3): 8.3 min	10.0 min	11.4 min	12.5 min	not observed
				
1d	2d	di-2d		
HPLC: 8.9 min	11.3 min	13.5 min		
				
1e	2e	di-2e		
HPLC: 10.2 min	12.2 min	13.7 min		

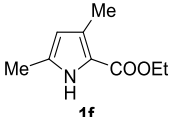
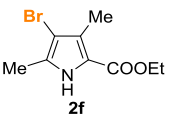
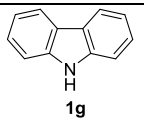
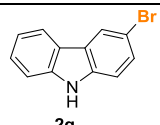
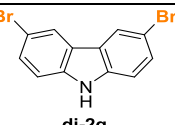
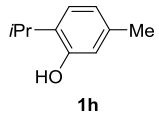
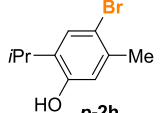
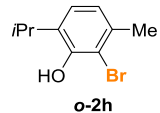
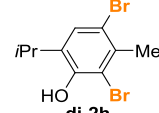
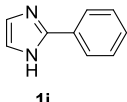
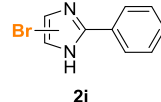
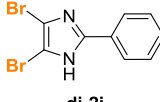
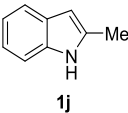
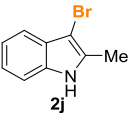
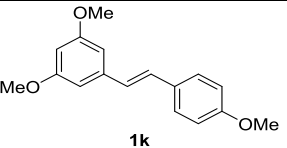
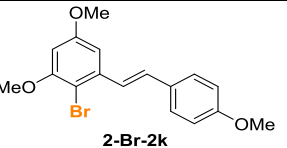
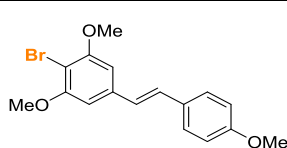
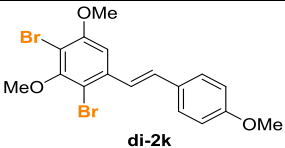
			
HPLC: 10.1 min	11.9 min		
			
GC(2): 14.8 min	17.2 min	19.3 min	
			
GC(1): 8.6 min	11.2 min	9.8 min	12.0 min
			
GC(1): 9.0 min	13.8 min	14.9 min	
			
NMR: 6.22 (s, 1H)	7.47 (m, 1H)		
			
NMR: 6.65 (d, 2H)	6.42 (d, 2H)	6.70 (s, 2H) <5% in all cases	not observed

Figure S12. Substrates and brominated products. The retention times (GC) and selected signals for determination of the conversion by NMR are shown below.

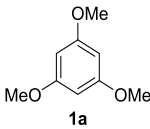
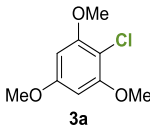
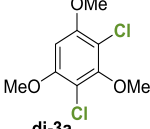
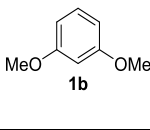
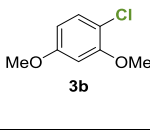
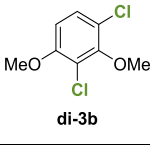
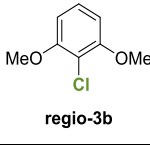
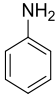
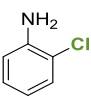
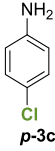
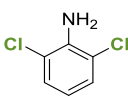
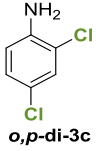
				
HPLC: 10.3 min	10.6 min	not observed		
				
HPLC: 10.2 min	11.0 min	not observed	not observed	
				
GC(1): 5.0 min	6.9 min	7.8 min	not observed	not observed

Figure S13. Substrates and chlorinated products. The retention times (HPLC or GC) are shown below.

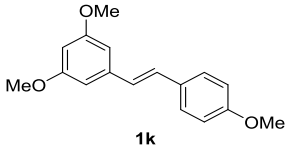
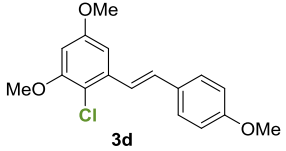
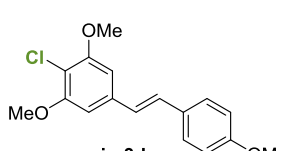
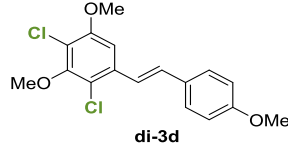
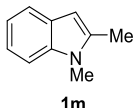
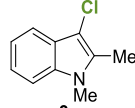
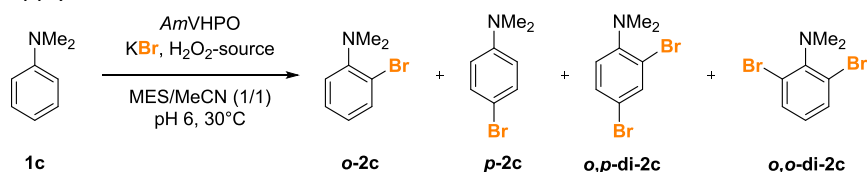
			
NMR: 7.47-7.43 (m, 2H)	7.41 (d, 1H)	not observed	not observed
			
NMR: 6.22 (s, 1H)	7.47 (m, 1H)		

Figure S14. Substrates and chlorinated products. The signals for determination of the conversion by NMR are shown below.

4.5 Bromination of *N,N*-Dimethylaniline Using Different Methods for H₂O₂ Supply

Table S2. Enzymatic bromination of *N,N*-dimethylaniline (**1c**) as a model reaction to investigate the impact of different H₂O₂-supply methods.



Entry	H ₂ O ₂ supply	Conversion	Ratio (<i>o</i> -2c : <i>p</i> -2c : <i>o,p</i> -di-2c)
1	Syringe pump	81%	24 : 70 : 6
2	GOx (12 U)	10%	13 : 87 : 0
3	GOx (24 U)	18%	13 : 87 : 0
4	Urea H ₂ O ₂	64%	16 : 84 : 0
5	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	84%	19 : 81 : 0
6 ^a	H ₂ O ₂ (2.2 eq.)	100%	14 : 50 : 36
7	<i>t</i> BuOH one batch H ₂ O ₂	69%	25 : 63 : 12

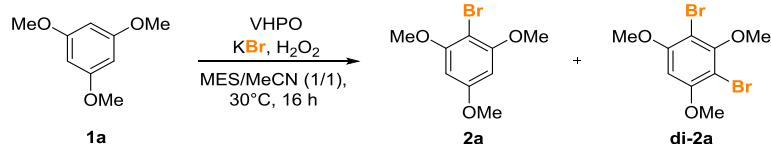
*Am*VHPO (3.0 mg mL⁻¹; 300 μL); reaction time 72 h; the formation of *o,o*-di-2c was not observed. ^aKBr (2.2 eq.)

Procedure

The reactions were performed as described in 4.2 using *Am*VHPO (300 μL \cong ca. 6 U) pre-incubated with Na₃VO₄ (30 mM; 300 μL). The total reaction volume was 1.6 mL (MeCN/H₂O : 1/1; for Entry 7 *t*BuOH/H₂O : 1/1). The different supply methods were carried out as follows: slow supply with syringe pump (1.1 eq. H₂O₂ at a flow-rate of 0.72 μL/min, total time 3h); slow release from urea H₂O₂ (1.1 eq.; 100 mM stock solution in water, 130 μL) or addition of D-glucose (212 μL; 10 mg mL⁻¹; 1.0 eq.) and glucose oxidase (GOx was pre-weighed and calculated according to the U mg⁻¹ declaration of the supplier).

4.6 Investigations on Different Enzymes, Halides and Applicability of Lyophilized Lysate

Table S3. Ratios and conversions of the enzymatic bromination of 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**).

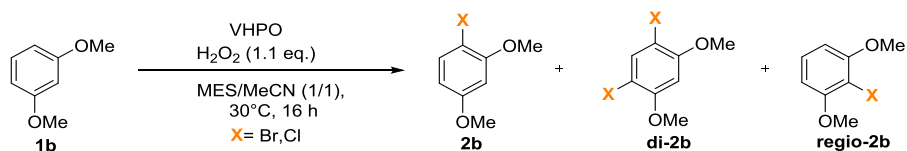


Entry	Enzyme	H ₂ O ₂ source	Conversion	Ratio (2a : di-2a)
1 ^a	<i>CiVCPO</i>	FMN/455 nm	87%	100 : 0
2	<i>CiVCPO</i>	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	40%	77 : 23
3 ^b	<i>AmVHPO</i>	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	94%	92 : 8
4	<i>AmVHPO</i>	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	75%	99 : 1
5 ^c	<i>AmVHPO</i> (lysate)	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	96%	94 : 6

AmVHPO (1.46 mg mL⁻¹; 300 μL); *CiVCPO* (0.62 mg mL⁻¹; 300 μL).^aFMN (30 mol%); method A; ^baddition of 30 mol% FMN to the reaction mixture, no irradiation and addition of H₂O₂ as oxidant; ^clyophilized lysate (10 mg).

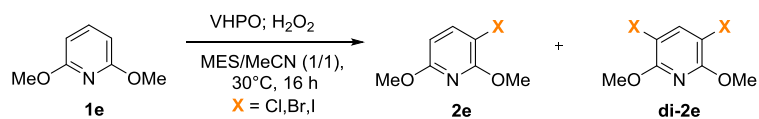
The control reaction (entry 3) indicated that the presence of FMN in the absence of light does not inactivate the enzyme.

Table S4. Ratios and conversions of the enzymatic halogenation of 1,3-dimethoxybenzene (**1b**).



Entry	Enzyme	Halogen Source	Conversion	Ratio (2b : di-2b : regio-2b)
1	<i>CiVCPO</i>	KBr	45%	100 : 0 : 0
2	<i>AmVHPO</i> (lysate)	KBr	73%	98 : 2 : 0

CiVCPO (0.62 mg mL⁻¹; 300 μL); lyophilized lysate (10 mg).

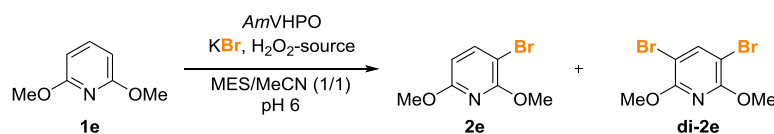
Table S5. Ratios and conversions of the enzymatic halogenation of 2,6-dimethoxypyridine (**1e**).

Entry	Enzyme	Halogen/H ₂ O ₂ Source	Conversion	Ratio (2e : di-2e)
1 ^a	<i>AmVHPOII</i>	KBr; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	8%	100 : 0
2 ^b	<i>CVCPO</i>	KBr; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	31%	100 : 0
3 ^a	<i>CVCPO</i>	KBr; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	38%	100 : 0
4 ^a	<i>CVCPO</i>	KBr; FMN (5 mol%)/455 nm	11%	100 : 0
5 ^a	<i>CVCPO</i>	KBr; FMN (10 mol%)/455 nm	–	–
6 ^b	<i>CVCPO</i>	KCl; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	trace	<5 : 0
7	<i>AmVHPO</i> (lysate)	KBr; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	14%	–
8	<i>AmVHPO</i> (lysate)	KI; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	–	–
9 ^a	<i>AmVHPO</i>	KI; H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	–	–

AmVHPOII (0.9 mg mL⁻¹); *CVCPO* (0.62 mg mL⁻¹); *AmVHPO* (4.5 mg mL⁻¹); lyophilized lysate (10 mg); ^a300 μL of enzyme; ^b100 μL of enzyme; entries 5 and 6: method A (1 h irradiation); total reaction time 16 h.

4.7 Optimization of Catalyst Loading and Investigations on the Inactivation of the Enzyme

Table S6. Optimization of the Reaction conditions.



Entry	H_2O_2 -source	Conditions	Conversion	Ratio (2e : di-2e)
1^a	RFTA (30 mol%)/455 nm	method C (3 h)	2%	100 : 0
2^a	FMN (30 mol%)/455 nm	method C (3 h)	4%	100 : 0
3^a	H_2O_2 (1.1 eq.)	16 h, 30°C	53%	100 : 0
4^a	RFTA (30 mol%)/455 nm	method A (1 h)	1%	100 : 0
5^a	FMN (30 mol%)/455 nm	method A (1 h)	1%	100 : 0
6^a	H_2O_2 (1.1 eq.)	16 h, 30°C	36%	100 : 0
7^a	FMN (30 mol%)/455 nm	method D (1 h)	28%	100 : 0
8^a	RFTA (30 mol%)/455 nm	method D (1 h),	23%	100 : 0
9^a	H_2O_2 (1.1 eq.)	16 h, 30°C	57%	100 : 0
10^b	H_2O_2 (1.1 eq.)	irradiation of <i>AmVHPO</i> for 1 h, then addition of H_2O_2	64%	100 : 0
11^b	H_2O_2 (1.1 eq.)	16 h, 30°C	45%	100 : 0
12^{b,c}	FMN (30 mol%)/455 nm	irradiation in the presence of <i>AmVHPO</i> (16 h); Brj35 [®]	1%	100 : 0
13^{b,c}	H_2O_2 (1.1 eq.)	16 h, 30°C, Brj35 [®]	49%	100 : 0

^a*AmVHPO* (1.50 mg mL⁻¹; 300 μ L); ^b*AmVHPO* (2.90 mg mL⁻¹; 300 μ L); ^cBrj35[®] (11.89 μ mol; 14.45 mg; 1.1 eq.) as stabilizing additive for the enzyme.

The control reaction (Entry 10) indicated that irradiation of the enzyme in the absence of FMN does not inactivate the enzyme.

H_2O_2 (1.1 eq) is listed several times, because a control experiment was run in parallel for each set of experiments (indicated by the lines within the table).

We started our investigations with a catalyst loading of 10 to 30 mol% FMN and reached complete conversion in the enzymatic bromination of 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) using *AmVHPO* (Table S7, entry 6). When turning to other (hetero-)aromatic substrates, however, the conversion dropped dramatically (Table S6, entry 4 and 5). We closely investigated the factors leading to this diminished conversion. A protocol, where H_2O_2 was pre-generated by irradiating FMN and subsequently adding the enzyme, lead to an improved turnover (Table S6, entry 7). Neither irradiation of the enzyme followed by addition of H_2O_2 (Table S6, entry 10) nor the presence of FMN without irradiation (Table

S3, entry 3) influenced the enzyme's activity indicating the high oxidative reactivity of excited FMN accounts for the inactivation of the enzyme.

Intrigued by the observed incomplete turnover of 2,6-dimethoxypyridine (**1e**), we further investigated the enzymatic bromination over time and observed a fast initial rate for both substrates, the electron-rich **1a** and the less electron-rich **1e** (Figure S15). The fast initial rate of the enzymatic bromination of **1e**, however, slows down after 30 min and a conversion of approximately 35% is not exceeded even after 16 h (neither for direct addition of the oxidant nor for *in situ* H₂O₂ generation). Both VHPOs, *Ci*VHPO and *Am*VHPOII showed the same incomplete turnover of **1e** as observed for *Am*VHPO (Table S5). Additional experiments with *Am*VHPO on **1e** were performed, during which a second aliquot of enzyme was added after 30 min (conversion 34%), or 10% of product **2e** were included in the reaction mixture right from the start (conversion 38%) to analyze whether product inhibition or equilibrium formation accounts for the stagnation of the conversion. These experiments, however, did not show significantly improved conversion compared to a reaction time of 30 min and addition of the enzyme in the beginning (33%). These results again address the so far unanswered question of the nature of the electrophilic halogenating species generated by VHPOs. Early work by Butler and co-workers^[10] suggested substrate binding rather than freely diffusible oxidized bromine species based on fluorescence quenching as well as based on competitive kinetic experiments. To date, no VHPO crystal structure in complex with a substrate has been reported and the selectivity of VHPOs is still under debate.

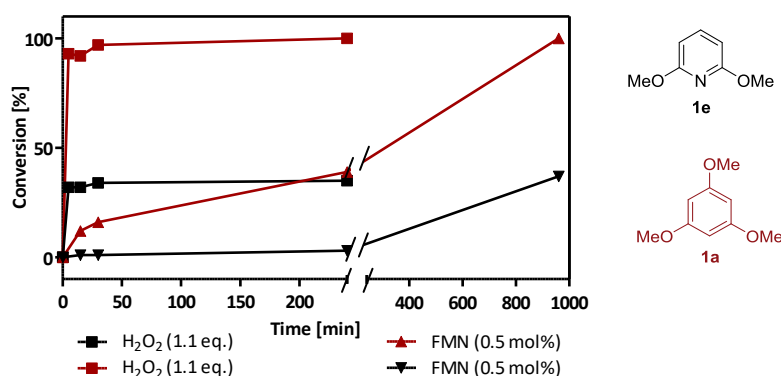


Figure S15. Kinetic monitoring of enzymatic brominations of 2,6-dimethoxypyridine (**1e**) and 1,3,5-trimethoxy-benzene (**1a**). Individual reactions were run in parallel and quenched for analysis after a certain time. The total reaction time for addition of H₂O₂ in one batch was 4 h and for *in situ* H₂O₂ generation (0.5 mol% FMN) 16 h. The enzymatic reactions were performed using *Am*VHPO (1.47 mg mL⁻¹; 300 μL).

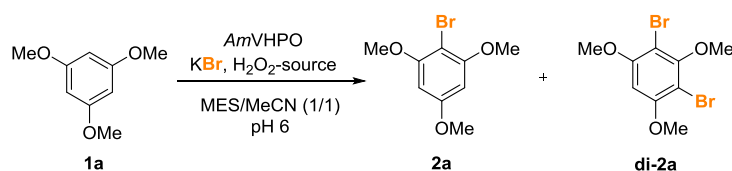
The productivity of an enzyme can be directly compared when calculating the turnover number and turnover frequency:

$$\text{turnover number (TN)} = \frac{\text{mol (product)}}{\text{mol (catalyst)}} \quad [\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}] \qquad \text{turnover frequency (TF)} = \frac{\text{TN}}{\text{time}} \quad [\text{h}^{-1}]$$

For substrate **1a** a conversion of 93% (H₂O₂ addition in one batch) after 5 min was observed, this corresponds to a TN of 1833 and TF of 21996 h⁻¹. The TN (631) and TF (7572 h⁻¹) for substrate **1e** is

significantly lower (32% conversion after 5 min), indicating that the electronic properties of the substrate predominantly influence the TN. The turnover for the photobiocatalytic protocol is reduced due to the slow release of H₂O₂, the maximal productivity of the enzyme can thus not be deduced from these experiments.

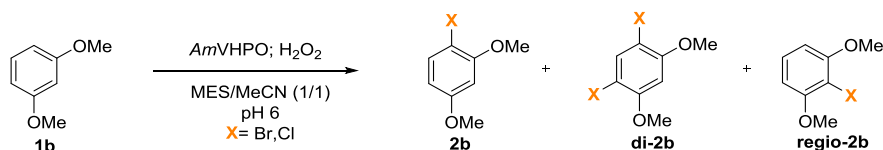
Table S7. Investigations on the applicability of FMN and RFTA using 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) as a substrate.



Entry	RFTA (mol%)	Time	Conversion	Ratio (2a : di-2a)
1^b	20	72 h, method A (2h)	–	–
2^c	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	72 h	34%	66 : 35
3^c	10	16 h, method A (1h)	29%	100 : 0
4^{c,e}	20	48 h	48%	100 : 0
Entry	FMN (mol%)	Time	Conversion	Ratio (2a : di-2a)
5^c	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	16 h	71%	75 : 25
6^c	10	16 h, method A (1h); shaking 300 rpm	93%	100 : 0
7^c	10	16 h, method A (1h); stirring	79%	100 : 0

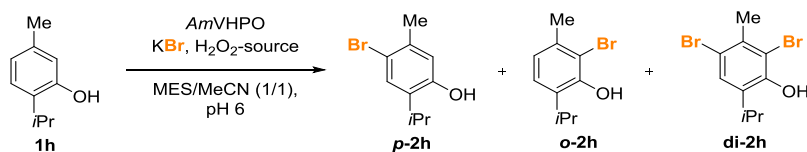
The irradiation time is given in brackets. ^aAmVHPO (2.2 mg mL⁻¹; 300 μL); ^bno addition of enzyme; ^cAmVHPO (3.5 mg mL⁻¹; 300 μL); ^d2.2 eq. KBr; ^eaddition of FMN (10 mol%), 1h irradiation then 16 h at rt without irradiation followed by addition of FMN (10 mol%), 1h irradiation and another 16 h at rt.

Entry 1 shows that the presence of enzyme is essential for a successful halogenation. As it can be seen from entries 6 and 7, the special set-up with horizontal shaker (shaking 300 rpm) is superior to mechanical stirring of the enzyme-containing mixture.

Table S8. Ratios and conversions of the enzymatic halogenation of 1,3-dimethoxybenzene (**1b**).

Entry	Time	RFTA (mol%)	Conversion	Ratio (2b : di-2b : regio-2b)
1	16 h	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	25%	92 : 8 : 0
2^a	16 h	10	9%	100 : 0 : 0
Entry	Time	FMN (mol%)	Conversion	Ratio (2b : di-2b : regio-2b)
3	16 h	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	75%	98 : 2 : 0
4^a	16 h	20	26%	98 : 2 : 0
5^{a,b}	16 h	20	26%	99 : 1 : 0

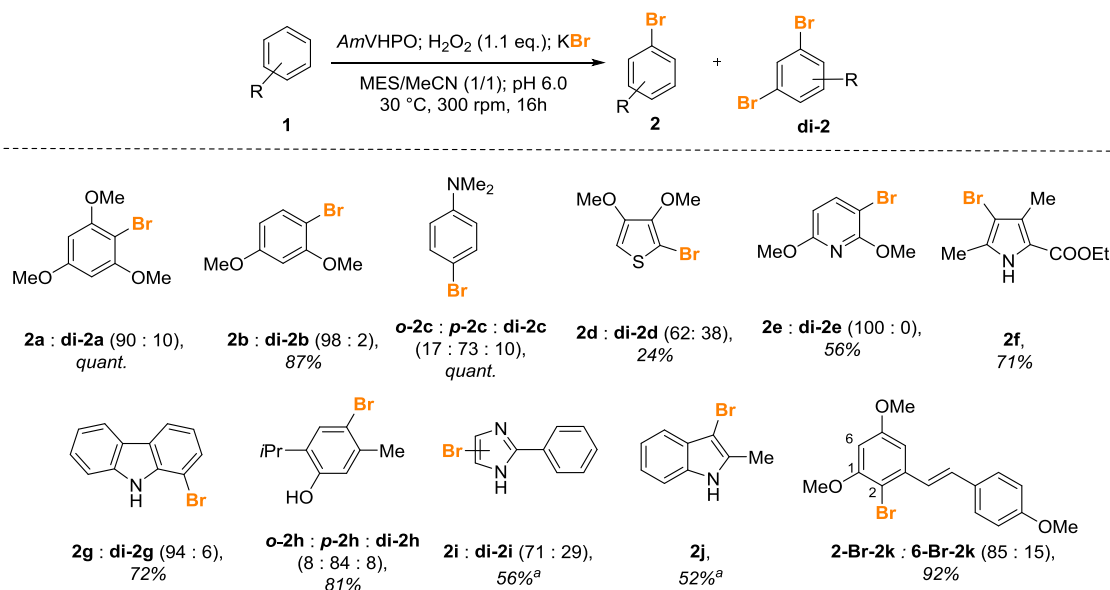
^amethod A, irradiation for 1 h; AmVHPO (300 μL, 3.5 mg mL⁻¹); ^b2.2 eq. KBr.

Table S9. Influence of the FMN concentration investigated for the photo-enzymatic bromination of thymol (**1h**).

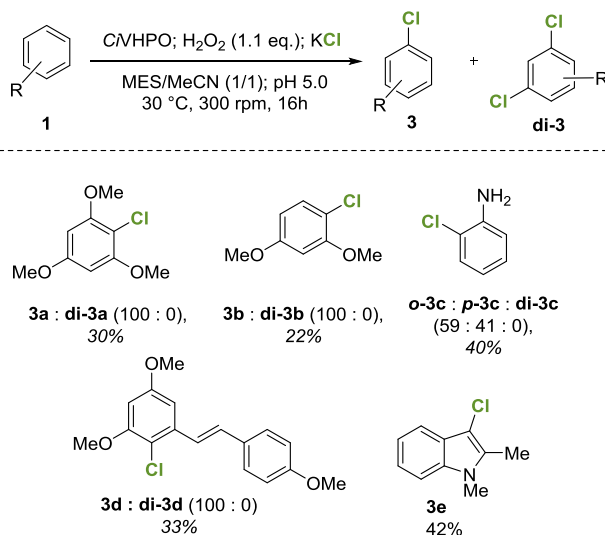
Entry	Time	FMN (mol%)	Conversion	Ratio (p-2h : o-2h : di-2h)
1^a	16 h	0.5	88%	88 : 10 : 2
2^b	16 h	1	29%	88 : 11 : 1
3^b	16 h	5	10%	88 : 12 : 0
4^c	16 h	10	17%	53 : 47 : 0
5^d	16 h	30	83%	88 : 10 : 2
6^e	16 h	30	73%	88 : 11 : 1
7	16 h	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	84%	87 : 11 : 2

^aIrradiation for 16 h; ^bmethod A, irradiation for 2 h; ^cMES/MeCN (9/1); ^dmethod B; ^emethod D; AmVHPO (300 μL; 1.46 mg mL⁻¹).

4.8 Comparative Reactions with H₂O₂ (1.1 eq.)



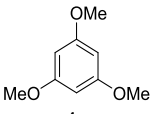
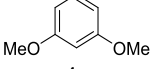
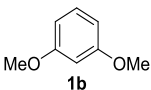
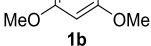
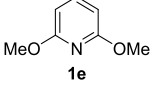
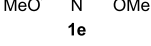
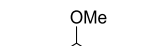
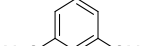
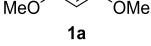
Scheme S1. Comparative enzymatic brominations with direct addition of the oxidant in one batch (1.1 eq. H₂O₂). Reactions contained MES buffer (100 mM, pH 6.0), [substrate] = 7.43 mM, [H₂O₂] = 8.13 mM, [AmVHPO] = 3.77 μM (1.47 mg mL⁻¹; 300 μL), [KBr] = 8.13 mM, [Na₃VO₄] = 187.5 μM and were run at rt. ^aAmVHPO (1.46 mg mL⁻¹; 300 μL). Conversions and ratios were determined by GC, HPLC or NMR. The respective major mono-brominated products are depicted.



Scheme S2. Comparative enzymatic chlorinations with direct addition of the oxidant in one batch (1.1 eq. H₂O₂). Reactions contained MES buffer (100 mM, pH 5.0), [substrate] = 7.43 mM, [H₂O₂] = 8.13 mM, [CVHPO] = 1.60 μM (0.62 mg mL⁻¹; 300 μL), [KCl] = 8.13 mM, [Na₃VO₄] = 187.5 μM and were run at rt. Conversions and ratios were determined by GC, HPLC or NMR. The respective major mono-chlorinated products are depicted.

4.9 Control Reactions Regarding FMN-Independent H₂O₂ Evolution

Table S10. Control reactions without photocatalyst, enzyme, or H₂O₂, and dark reaction in MES buffer.

Entry	Substrate	Conditions	Conversion	Ratio (mono : di)
1		no FMN	60%	100 : 0
2		no <i>Am</i> VHPO	<5%	–
3		no FMN	<5%	–
4		no <i>Am</i> VHPO	<5%	–
5		no FMN	12%	100 : 0
6		no <i>Am</i> VHPO	0%	–
7		dark reaction FMN, <i>Am</i> VHPO	0%	–
8		<i>Am</i> VHPO, no H ₂ O ₂	0%	–
9		H ₂ O ₂	100%	96 : 4

*Am*VHPO (300 μ L; 1.71 mg mL⁻¹); FMN 0.5 mol%; irradiation for 16 h.

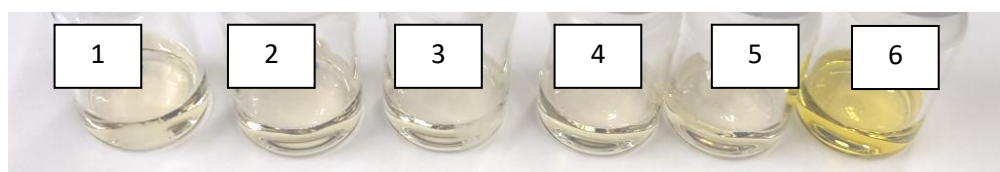


Figure S16. Color changes of the irradiated reaction mixtures after 16 h; the numbering corresponds to the entries of table S10. FMN-containing mixtures show photo-bleaching of the catalyst (entries 2,4 and 6). A slight yellow discoloration was observed for substrate-containing mixtures (entries 1,3 and 5).

Table S11. Control reactions using 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) as a substrate in the absence of photocatalyst in phosphate buffer.

Entry	Light	KBr (8.13 mM)	Vanadate (187.5 μ M)	Conversion
1	455 nm	+	+	decomp.
2	–	+	+	0 %
3	455 nm	–	+	decomp.
4	455 nm	+	–	decomp.
5	455 nm	–	–	decomp.

trimethoxybenzene (7.43 mM); *Am*VHPO (80 μ L; 1.62 mg mL⁻¹); overall volume 1.6 mL; O₂ atmosphere; irradiation for 22 h.

Entries 1, 3, 4, 5 showed an overall GC yield below 5%. This suggests an oxidative decomposition of 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) upon irradiation, **1a** likely serves as a source of electrons for the formation of hydrogen peroxide. The lack of hydrogen peroxide in entries 1, and 3 of table S13 suggests decomposition of H₂O₂ under the given conditions.

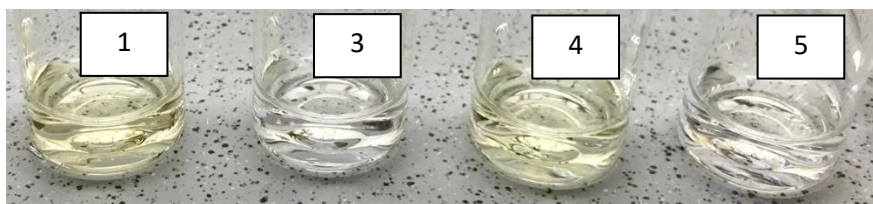


Figure S17. Color change of 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) solutions after 22 hours of irradiation with blue light (originally all colorless solutions). The numbering corresponds to the entries in table S11.

Table S12. Investigation of the H₂O₂ evolution in a MES-buffered solution of 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) in the absence of photo-catalyst.

Entry	Vanadate ^a	Substrate 1a	MeCN	c(H ₂ O ₂) [mM]
1	+	+	+	4.59
2	+	–	+	0
3	–	+	+	6.72
4	+	–	–	0

trimethoxybenzene (7.43 mM); no AmVHPO; overall volume 1.6 mL; irradiation for 16 h; ^avanadate (187.5 μM) and vanadate containing storage buffer (300 μL, 50 mM Tris pH 7.0, 100 μM Na₃VO₄)

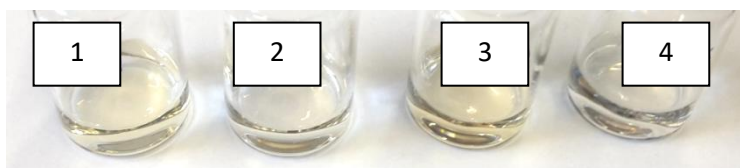


Figure S18. Color changes of the reaction mixtures; the numbering corresponds to the entries in table S12. A slight yellow discoloration is only observed for substrate-containing reaction mixtures (Entries 1 and 3).

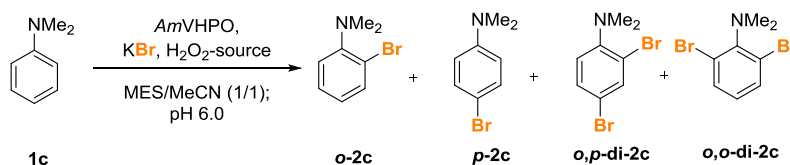
Table S13. Investigation of H₂O₂ evolution in 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**) solution in an absence of photocatalyst in phosphate buffer.

Entry	Light	KBr (8.13 mM)	Vanadate (187.5 μM)	c(H ₂ O ₂) [mM]
1	455 nm	+	+	0
2	–	+	+	0
3	455 nm	–	+	0
4	455 nm	+	–	5.19
5	455 nm	–	–	6.19

trimethoxybenzene (7.43 mM); no AmVHPO; overall volume 1.6 mL; O₂ atmosphere; irradiation for 22 h.

4.10 Investigations on Decomposition of the Substrate by Photooxidation

Table S14. Photobiocatalytic bromination of *N,N*-dimethylaniline (**1c**) as a model reaction to investigate the impact of photooxidation on oxidation-sensitive substrates/products.



Entry	H ₂ O ₂ -source	Conversion	Ratio (<i>o</i> -2c : <i>p</i> -2c : <i>o,p</i> -di-2c)
1	H ₂ O ₂ (1.1 eq.)	99%	23 (<i>o</i>) : 71 (<i>p</i>) : 6
2 ^a	FMN (30 mol%)/455 nm; (D)	99%	23 (<i>o</i>) : 43 (<i>p</i>) : 35
3 ^a	FMN (30 mol%)/455 nm; (B)	99%	13 (<i>o</i>) : 70 (<i>p</i>) : 17
4	FMN (30 mol%)/455 nm; (E)	1%	62 (<i>o</i>) : 38 (<i>p</i>) : 0
5	FMN (30 mol%)/455 nm; (F)	2%	54 (<i>o</i>) : 46 (<i>p</i>) : 0
6	FMN (30 mol%)/455 nm; (G)	98%	26 (<i>o</i>) : 63 (<i>p</i>) : 11

^adecomposition of the substrate/product(s) was observed; AmVHPO (300 μL; 1.46 mg mL⁻¹); Methods B – G are described in chapter 4.2; conversions were determined by GC.

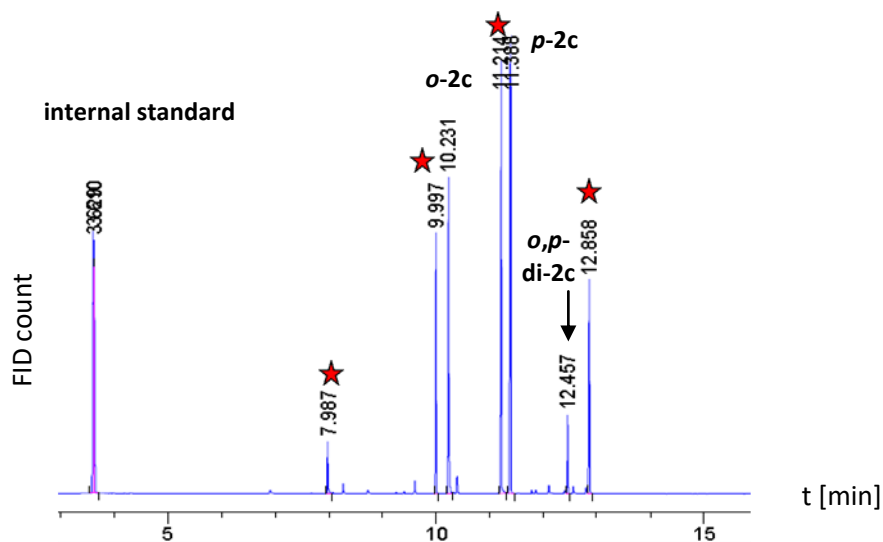
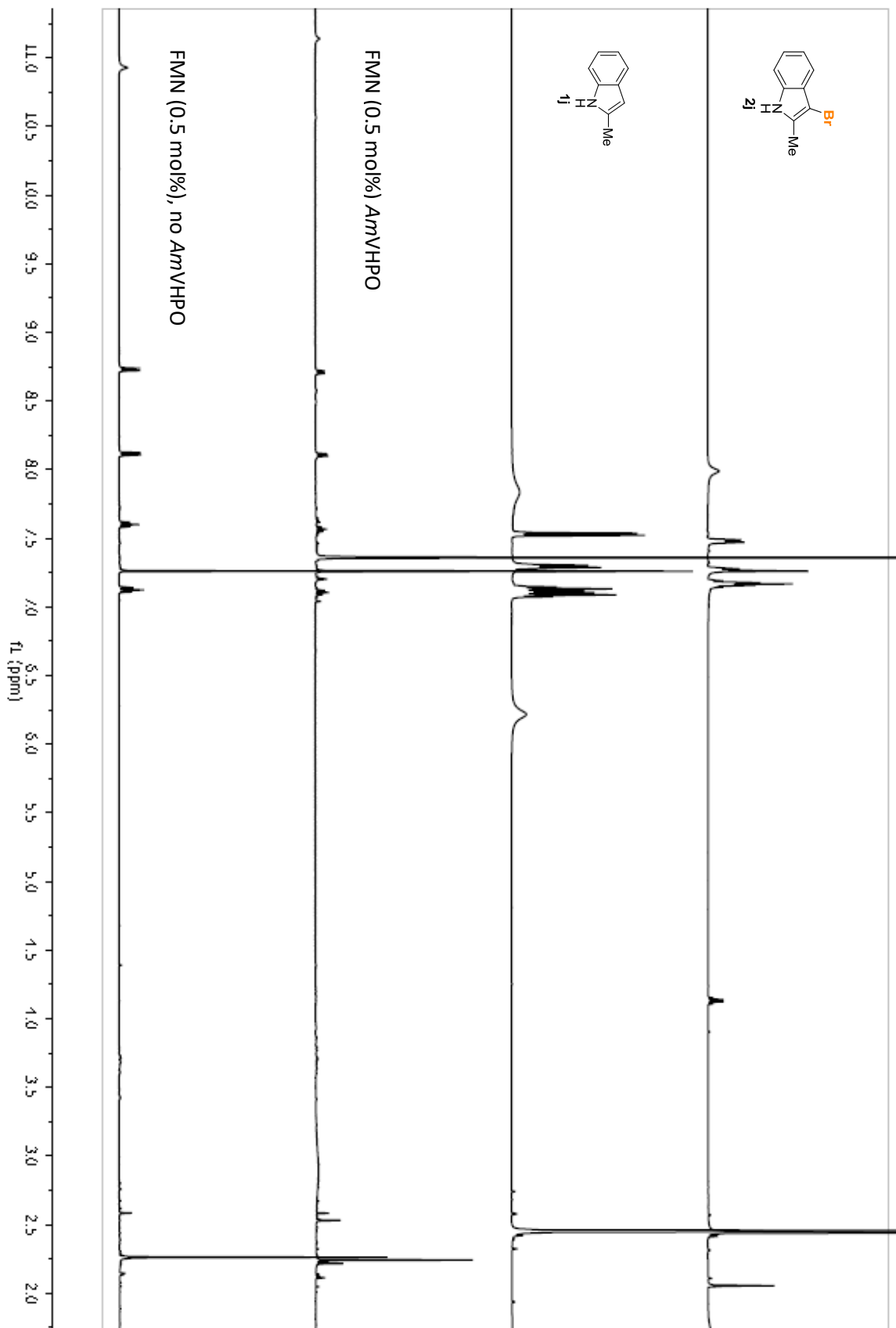


Figure S19. GC chromatogram of the enzymatic *N,N*-dimethylaniline (**1c**) bromination using photochemical *in situ* H₂O₂ generation (30 mol% FMN, entry 3). Toluene was used as the internal standard. The formation of product *o,o*-di-**2c** was not observed. The substrate is fully consumed, several peaks, which do not correspond to the products are observed indicating photochemical decomposition of the substrate/product(s) (labeled with an asterisk).

An additional example of photooxidation of the substrate is given below as comparative NMR spectra.



4.11 Investigations on the Buffer Concentration

In order to examine the influence of MES-buffer concentrations lower than 100 mM on the pH change of the reaction mixture and the conversions of the enzymatic bromination reaction, we performed a series of experiments using the electron-source in lower concentrations. The reactions were performed as described in chapter 4.2 (0.5 mol% FMN, 16 h irradiation, **1a** as a substrate).

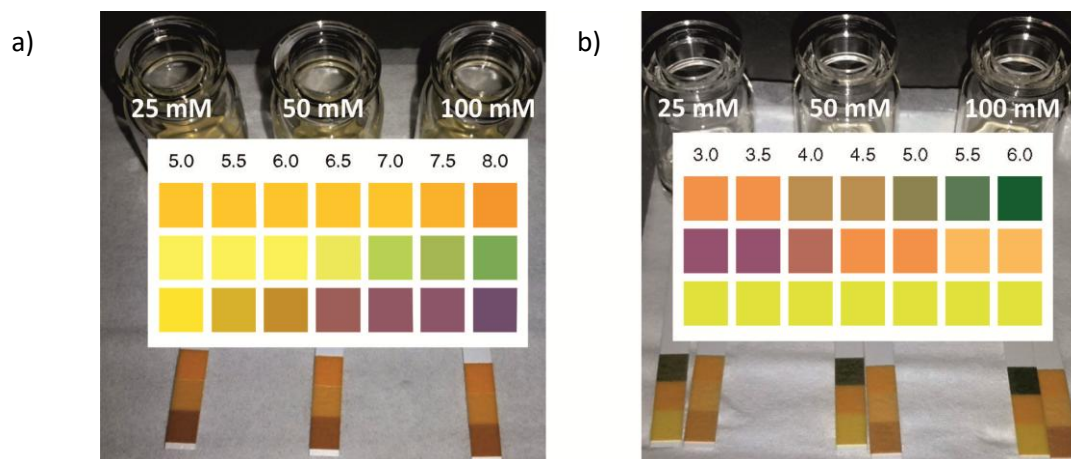
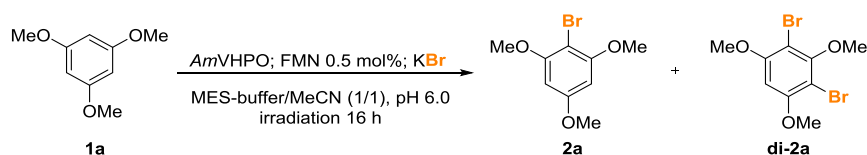


Figure S20. Monitoring of the pH of the reaction mixtures (0.5 mol% FMN, summarized in Table S15). a) The pH was determined before irradiating the reaction mixture by the use of pH-indicator strips (MColorpHast™, pH 5.0 – 10.0, MerckMilipore). b) The pH was determined again after 16 h of irradiation (MColorpHast™, pH 5.0 – 10.0 and pH 0 – 6.0, MerckMilipore).

The pH was monitored prior to irradiation and after completion of the reaction and neither a significant pH change (Figure S20) nor an influence on the conversion (Table S15) of the substrate was observed for the reaction of **1a** using of 25 – 100 mM MES as electron donor.

Table S15. Influence of the buffer concentration on the photobiocatalytic bromination of 1,3,5-trimethoxybenzene (**1a**).



Entry	MES	pH (start)	pH (end)	Conversion	Ratio (2a : di-2a)
1	25 mM	6.0	5.5 - 6.0	99%	92 : 8
2	50 mM	6.0	6.0	99%	93 : 7
3	100 mM	6.0	6.0	98%	95 : 5

AmVHPO (2.28 mg mL⁻¹; 300 μL)

5. Flavin Properties

5.1 Degradation of the Enzyme by Excited FMN in High Catalyst Loadings

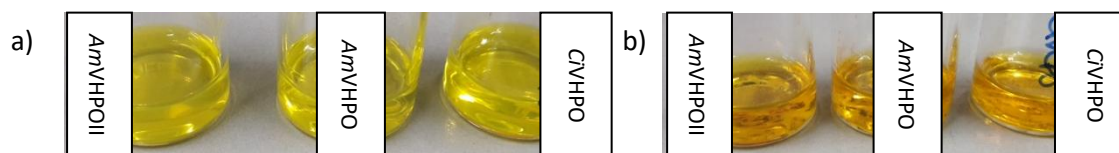


Figure S21. Impact of photooxidation on the enzymes, the mixtures contained FMN (30 mol%). a) Reaction mixtures before irradiation, the VHPOs are soluble. b) Reaction mixtures after irradiation for 15 min; FMN (30 mol%) showing obvious precipitation of the enzymes.

5.2 Self-Oxidation of FMN

When irradiated under inert nitrogen atmosphere in a non-oxidizable buffer without any other source of electrons, FMN is capable of self-oxidation forming a small portion of the reduced form of flavin, which can release hydrogen peroxide upon subsequent reoxidation with oxygen. This can be achieved by irradiation with green LEDs, because low absorbance of FMN in this region prevents quick photobleaching.

A solution of FMN (2.25 mM) in phosphate buffer (10 mM, pH 6) was irradiated with 535 nm LEDs for 5.5 hours in a sealed crimp-top vial under nitrogen atmosphere. Afterwards, oxygen was bubbled through the solution for 30 minutes and the concentration of hydrogen peroxide was measured using the POD assay. The resulting H_2O_2 concentration was 353 μM , which shows a decomposition of a majority of the photocatalyst. When this process was repeated with the same reaction mixture, no increase in H_2O_2 concentration was observed.

5.3 Absorption Spectra of FMN in Different Buffers

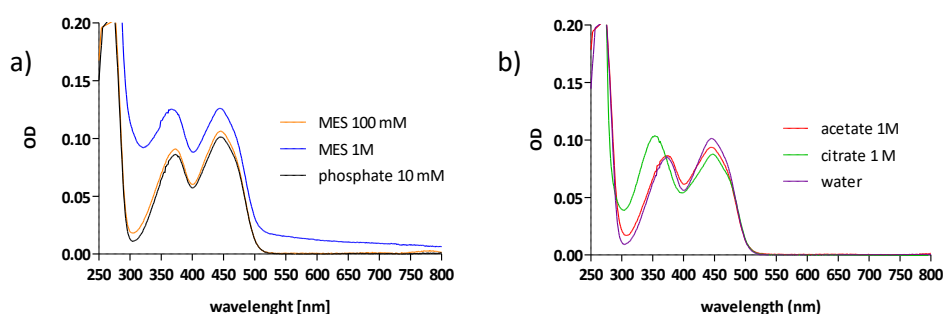


Figure S22. UV-Vis spectra of 10 μM FMN in different buffers at pH 6. a) Influence of different MES-concentrations on the absorbance. b) Shifted absorption maximum in citrate buffer.

Figure S22 illustrates that the absorption characteristics of FMN in citrate and MES buffer differ from other buffers at pH 6 or in water. Spectral differences can be explained by an interaction of ions with FMN in aqueous solutions.^[11] The second absorption maximum at 370 nm could account for the protonated species of FMN.^[12] This maximum is slightly blue-shifted in citrate buffer.

6. H₂O₂-Generation by Oxidative Water Splitting Using Au-TiO₂

6.1 Evaluation of Different Light Sources for H₂O₂ Generation via Water Oxidation

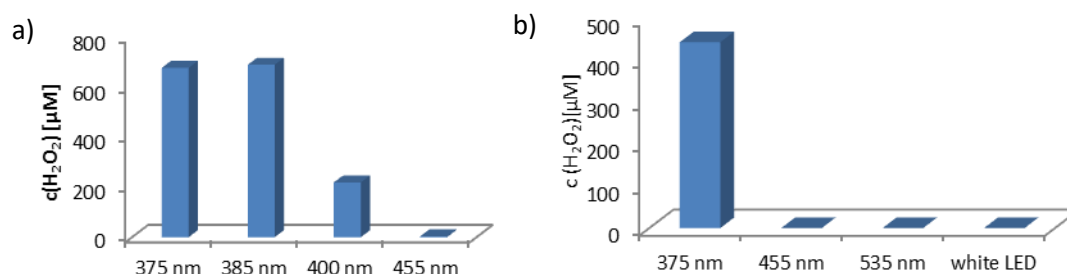


Figure S23. Activity of Au-TiO₂ in terms of H₂O₂ production as a function of the wavelength. a) Short-term irradiation. The concentration of hydrogen peroxide was determined after 4 min of irradiation of an Au-TiO₂ (Degussa P25) suspension in pure water under oxygen atmosphere using different light sources. b) Long-term irradiation. The concentration of hydrogen peroxide was determined after 1 h of irradiation of an Au-TiO₂ (pure rutile) suspension in pure water under oxygen atmosphere using different light sources.

General Procedure

A crimp-top vial (5 mL) equipped with a magnetic stirring bar containing a suspension of Au-TiO₂ (pure rutile, 5 mg) in distilled water (1 mL) was sealed with a septum and the head-space atmosphere was exchanged with oxygen using a balloon. The vial was placed in a tempered (25 °C) aluminum block (see Section 4.2) and irradiated from the bottom with an LED of a specific wavelength (see Figure S23) for 1 h under slow stirring. Subsequently, the heterogeneous catalyst was removed via centrifugation, the supernatant was diluted 5-times with distilled water and the concentration of hydrogen peroxide was determined using the POD assay.

6.2 Kinetics of the H₂O₂ Evolution

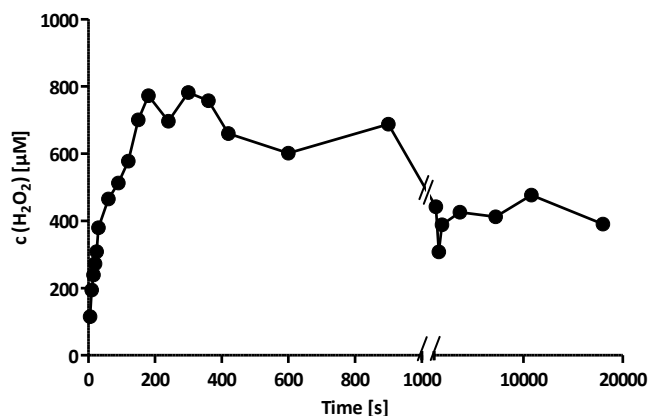


Figure S24. Extended profile of H₂O₂ generation via irradiation (375 nm LEDs) of an Au-TiO₂ suspension in water under oxygen atmosphere.

Figure S24 shows an extended kinetic measurement of hydrogen-peroxide generation via water splitting with Au-TiO₂. After reaching a maximal concentration of 800 μM within ca. 4 min, a first, short-term plateau around 600 μM is formed. After 30 min the concentration stabilizes at 400 μM forming a final, long-term plateau, which lasts for at least 5 h. In this case, a stable concentration represents an equilibrium between a photocatalytic formation of H₂O₂ and its quick decomposition in the presence of heterogeneous material.^[13] Therefore, the drop in equilibrium concentration suggests a decrease in activity of Au-TiO₂ during continuous irradiation. In addition, a color change can be observed, where the originally grey or slightly purple suspension turns pink after 1 hour of UV irradiation and completely white after 24 hours. This indicates that gold nanoparticles are released from the semiconductor surface and eventually decompose, which can explain the decrease in activity. The color change seems to be dependent on the amount of oxygen in the reaction mixture (see Figure S25). To prove the crucial role of gold nanoparticles in H₂O₂ generation, pure TiO₂ (P25) was used instead of Au-TiO₂ in the negative-control samples – no hydrogen peroxide was detected in those samples.

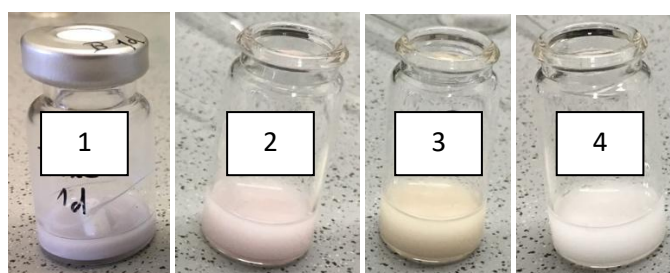


Figure S25. Suspension of Au-TiO₂ after 24 hours of 375 nm irradiation under different atmosphere: 1) before irradiation; 2) nitrogen; 3) air; 4) oxygen.

General Procedure

A crimp-top vial (5 mL) equipped with a magnetic stirring bar containing a suspension of Au-TiO₂ (pure rutile, 5 mg) in distilled water (1 mL) was sealed with a septum and the head-space atmosphere was exchanged with oxygen using a balloon. The vial was placed in a tempered (25 °C) aluminum block (see Section 4.2) and irradiated from the bottom with a 375 nm LED for a selected time under slow stirring. Subsequently, the heterogeneous catalyst was removed via centrifugation, the supernatant was diluted 5-times with distilled water and the concentration of hydrogen peroxide was determined using the POD assay.

Reaction under Inert Atmosphere

A crimp-top vial (5 mL) equipped with a magnetic stirring bar containing a suspension of Au-TiO₂ (pure rutile, 5 mg) in distilled water (1 mL) was sealed with a septum. The suspension was degassed by bubbling with nitrogen for 20 min and the head-space was evacuated and flushed with nitrogen five times. To confirm that no oxygen is present, the gas phase was analyzed with head-space GC prior to the irradiation. The vial was then placed in a tempered (25 °C) aluminum block (see Section 4.2) and irradiated from the bottom with a 375 nm LED for 1 h under slow stirring. Afterwards, the gas phase was analyzed again with head-space GC, the vial was unsealed, the heterogeneous catalyst was removed via centrifugation and the concentration of hydrogen peroxide in the supernatant was determined using the POD assay.

No detectable oxygen was present in the gas phase after irradiation and H₂O₂ concentration in the reaction mixture was 0.89 μM.

6.3 Comparison of the Activity of Different Forms of TiO₂

The rutile form of TiO₂ has been chosen for photobiocatalytic experiments due to its recently described improved biocompatibility compared to the anatase form. The hydrophobic surface of rutile TiO₂ prevents hydrophilic enzymes from adsorption and this spatial separation protects the enzyme from highly reactive — but short-lived — hydroxyl radicals formed by titanium dioxide in aerated aqueous solution upon irradiation.^[13]

A possible influence of the form of TiO₂ — used as a precursor of the water-oxidation catalyst Au-TiO₂ — on its activity in terms of H₂O₂ generation was investigated. For this purpose, results obtained with rutile-based Au-TiO₂ were compared to an Au-TiO₂ catalyst prepared from Degussa P25 TiO₂, which consists of 75–85 % anatase.^[14] Data presented in Figures S23, S26, and S27 show that the activity of both rutile- and P25-based catalysts rely on the same wavelength dependency, produce a comparable amount of hydrogen peroxide in one-point activity measurements, and have a similar kinetic profiles of H₂O₂ generation. These results suggest that there is no difference in activity between anatase and rutile TiO₂ in terms of photocatalytic generation of hydrogen peroxide via water oxidation in oxygenated aqueous solutions.

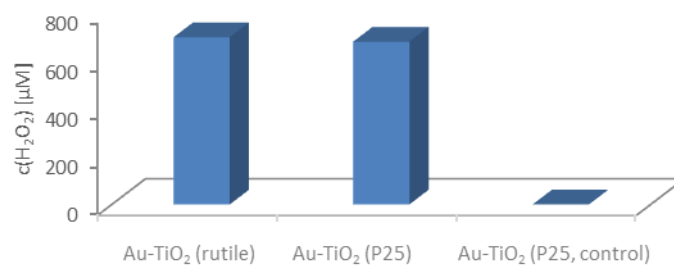


Figure S26. One-point-activity comparison between Au-TiO₂ based on rutile, Degussa P25 TiO₂ and a negative-control experiment using pure Degussa P25 TiO₂. The concentration of hydrogen peroxide was determined after 4 min of irradiation (375 nm LEDs) of a catalyst suspension in pure water.

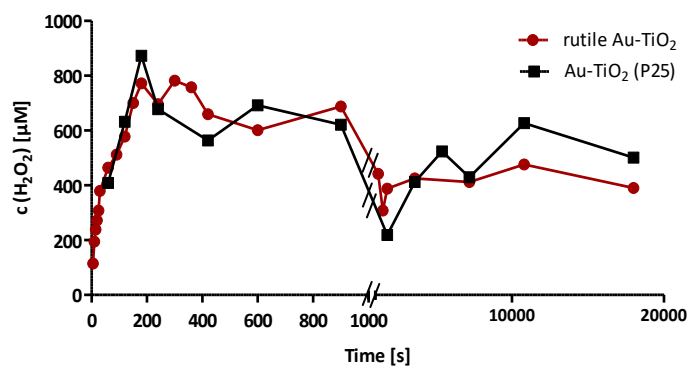
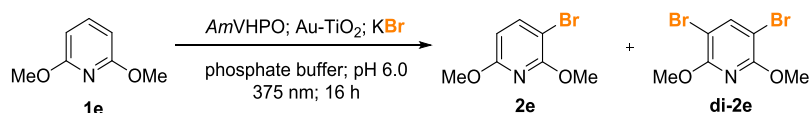


Figure S27. Comparison of extended kinetic profiles of H₂O₂ generation between rutile- (red) and P25-based (black) Au-TiO₂ catalysts via irradiation (375 nm LEDs) of a catalyst suspension in pure water under oxygen atmosphere.

6.4 Water-Splitting Coupled to *AmVHPO* Catalyzed Bromination

Control Reactions

Table S16. Set of control reactions for bromination of 2,6-dimethoxypyridine (**1e**) using H₂O₂ generated via photo-catalytic water splitting with Au-TiO₂.



Entry	Light	Au-TiO ₂	Atmosphere	Enzyme	Conversion	Ratio (2e : di-2e)
1	375 nm	+	O ₂	+	74 %	(100 : 0)
2	–	+	O ₂	+	0 %	–
3	375 nm	–	O ₂	+	0 %	–
4	375 nm	+	Air	+	9 %	(100 : 0)
5	375 nm	+	N ₂	+	4 %	(100 : 0)
6	375 nm	+	O ₂	–	7 %	(100 : 0)

dimethoxypyridine (7.43 mM); *AmVHPO* (1.16 mg mL⁻¹; 80 μL); KBr (8.13 mM); Na₃VO₄ (187.5 μM); overall volume 1.6 mL

General Procedure

Prior to the reaction, *AmVHPO* was transferred from the storage buffer (containing Good's buffers) to phosphate buffer (10 mM, pH 6) using a PD-10 Desalting column (GE Healthcare). Solutions of **1e** (100 μL, 118.9 mM in MeCN), Na₃VO₄ (10 μL, 30 mM in water), KBr (13 μL, 1 M in water), and *AmVHPO* (80 μL, 1.62 mg mL⁻¹ in 10 mM aqueous phosphate buffer pH 6) were added in a 5 mL crimp-top vial together with aqueous phosphate buffer (1.397 mL, 10 mM, pH 6). The vial was sealed with a rubber septum, its head-space atmosphere was exchanged with oxygen using a balloon and it was placed into the irradiation setup (see Section 4.2) where it was irradiated with 375 nm LEDs at 25 °C for 24 h. Subsequently, the heterogeneous catalyst was removed via centrifugation and the supernatant was mixed with MeCN (800 μL), brine (2 mL), and ethyl acetate (2 mL) and extracted. The organic phase was analyzed by HPLC.

7. Synthesis of the Halogenated Reference Material

The synthesis of the brominated references **2a**, **di-2a**, **3a**, **di-3a** and **o-2h**, **p-2h** and **di-2h** has been reported previously.^[3]

7.1 General Procedure for the Synthesis of the Halogenated Products

N-Bromosuccinimide or *N*-chlorosuccinimide (1.1 eq. or 2.2 eq.) was added slowly to a cooled solution of the starting material (200 – 500 mg scale) in MeOH/dichloromethane (1/9; 10 mL). The resulting reaction mixture was stirred at 0°C for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. Subsequently, water (25 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude mixture was purified by reversed phase chromatography on C18 silica (MPLC, H₂O/MeCN gradient: 70/30 → 0/100 in 18 min).

7.2 Synthesis of Ethyl 4-bromo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate (**2f**)

N-Bromosuccinimide (1.05 eq.) was added slowly to a mixture of 3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ethyl ester (1 eq.) and potassium carbonate (1.05 eq.) in acetonitrile (0.85 M) cooled in an ice bath. The mixture was warmed to room temperature, diluted with water and then stirred for 30 min. The precipitate was collected by vacuum filtration, washed with ethanol/ water (1/2) and dried in vacuo.

7.3 Up-Scaled Enzymatic Reaction on (*E*)-1,3-Dimethoxy-5-(4-methoxystyryl)benzene (**1k**)

The reaction mixture containing substrate (7.43 mM; 36.99 μmol), KBr (1.1 eq; 8.13 mM), MES pH 6.0 (50 mM), Na₃VO₄ (187.5 μM), H₂O₂ (1.1 eq; 8.13 mM) and VHPO (1 mL; 4.5 mg mL⁻¹; specific activity 39.51) in MeCN/H₂O (1/1; total volume of 5.0 mL) was heated to 30°C and mixed at 300 rpm for 72 h. The reaction was stopped by addition of sat. NaCl solution and extraction with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude mixture was purified by semi-preparative HPLC controlled by a Jasco HPLC system consisting of an UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, two PU-2068 Intelligent prep. pumps, a M IKA 1000 Dynamic Mixing Chamber (1000 μL Portmann Instruments AG Biel-Benken), a LC-NetII/ ADC), and a Rheodyne injection valve. The system was controlled by the Galaxie-Software. A Eurosphere II 100-5 C18 A (KNAUER® 250 x 16 mm) column with pre-column (KNAUER® 30 x 16 mm) was used as the stationary phase (H₂O (0.05% TFA)/MeCN (0.05% TFA) gradient: 95/5 → 0/100 in 43 min). The collected fractions were combined and the MeCN was removed under reduced pressure. The remaining aqueous phases were freeze-dried in liquid nitrogen and the water was removed by lyophilization (Alpha 2-4 Christ with Chemistry-Hybrid-Pump-RC6 pump).

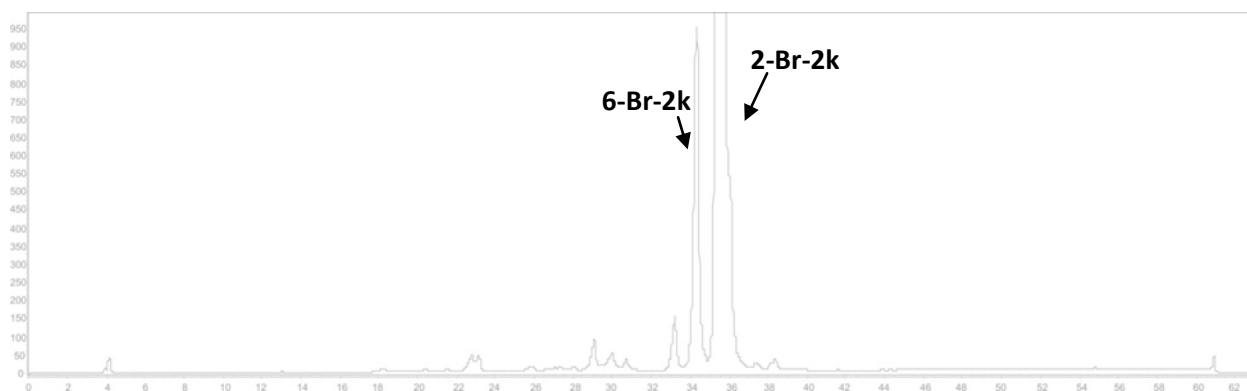


Figure S28. Chromatogram of the preparative HPLC purification of the up-scaled enzymatic reaction.

7.4 Preparation of (*E*)-2-Chloro-1,5-dimethoxy-3-(4-methoxystyryl)benzene (**3d**):

The reaction mixture containing (*E*)-1,3-Dimethoxy-5-(4-methoxystyryl)benzene (**1k**) (3.8 mg, 1.0 eq.) and *N*-chlorosuccinimide (1.9 mg, 1.0 eq.) in MeOH/dichloromethane (1/9; 1 mL) was stirred at 0°C for 2 h. Subsequently the solvent was removed under reduced pressure, water (10 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude mixture was purified by semi-preparative HPLC as described in chapter 7.3.

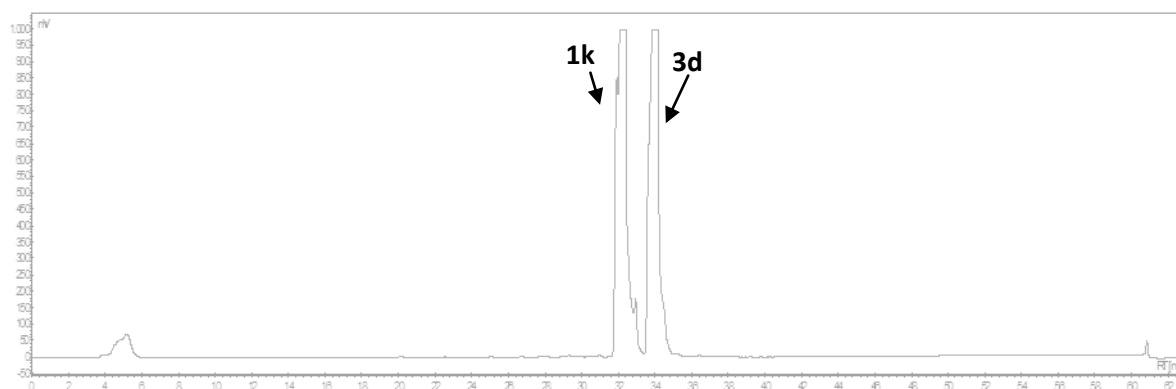
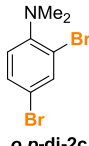

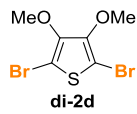
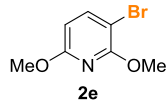


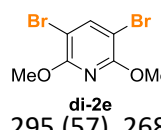
Figure S29. Chromatogram of the preparative HPLC purification of the chemical chlorination of **1k**.

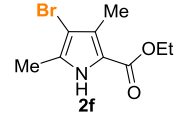

2,4-Dibromo-*N,N*-dimethylaniline (o,p-di-2c):^[15] yellowish oil; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.68 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.78 (s, 6H) ppm; MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 278 [M]⁺ (100), 276 [M]⁺ (54), 280 [M]⁺ (53), 263 (8), 198 (10), 118 (10).

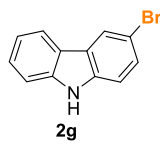
 **2-Bromo-3,4-dimethoxythiophene (2d):**^[16] greenish oil; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 6.17 (d, *J* = 21.8 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H), 3.84 (d, *J* = 21.1 Hz) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 224 [M]⁺ (100), 222 [M]⁺ (94), 209 [M-Me]⁺ (68), 207 [M-Me]⁺ (66).

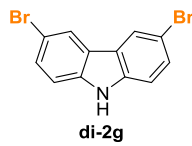
 **2,5-Dibromo-3,4-dimethoxythiophene (di-2d):**^[16] red oil; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 3.91 (s, 6H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 304 [M]⁺ (52), 302 [M]⁺ (100), 300 [M]⁺ (52), 289 [M-Me]⁺ (30), 287 [M-Me]⁺ (61), 285 [M-Me]⁺ (30).

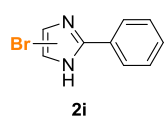
 **3-Bromo-2,6-dimethoxypyridine (2e):**^[17] yellowish oil; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.90 (s, 3H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 219 (70) [M]⁺, 218 (96) [M]⁺, 217 (100) [M]⁺, 216 (65), 202 (17) [M-Me]⁺, 188 (57), 108 (22).

 **3,5-Dibromo-2,6-dimethoxypyridine (di-2e):**^[18] white solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.86 (s, 1H), 3.99 (s, 6H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 299 (46), 297 (100) [M]⁺, 295 (57), 268 (45), 158 (23).

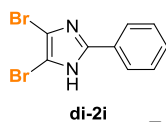
 **Ethyl 4-bromo-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (2f):**^[19] rose solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 9.02 (s br, 1H), 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 247 [M]⁺ (70), 245 [M]⁺ (74), 218 [M-Et]⁺ (9), 216 [M-Et]⁺ (10), 201 [M-Et-CO₂]⁺ (100), 200 [M-Et-CO₂]⁺ (95), 173 (18), 92 (44), 65 (38).

 **3-Bromo-9H-carbazole (2g):**^[20] beige solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8.19 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.08 (s br, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 3H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 245 [M]⁺ (100), 246 [M]⁺ (17), 247 [M]⁺ (92), 248 [M]⁺ (13), 166 (50).

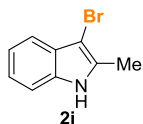
 **3,6-Dibromo-9H-carbazole (di-2g):**^[20] beige solid; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 8.11 (br s, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 327 [M]⁺ (54), 325 [M]⁺ (100), 323 [M]⁺ (55), 246 (22), 164 (27).



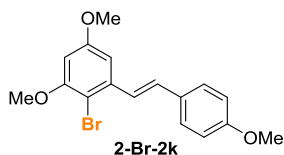
4(5)-Bromo-2-phenyl-1H-imidazole (2i):^[21] white solid; **m. p.** = 212°C; **R_f** = 0.69 (silica gel, pentane/EtOAc 50:50); **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.86 (s, 1H), 7.88 – 7.83 (m, 2H), 7.42 (t, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.34 (tt, *J* = 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 145.8, 129.6, 128.8, 128.5, 124.7, 117.3, 114.7 ppm; **IR** (film) $\tilde{\nu}_{max}$ = 1500, 1456, 1398, 1122, 777, 709, 670 cm⁻¹; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 225 (13), 224 (96), 223 (7), 222(100) [M]⁺, 143 (79), 116 (83); **HRMS** (ESI) calcd. for C₉H₈BrN₂ [M+H]⁺ 222.9871, found 222.9864.



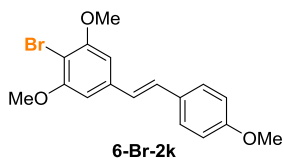
4,5-dibromo-2-phenyl-1H-imidazole (di-2i):^[22] beige solid; **m. p.** = 175°C (decomp.); **R_f** = 0.71 (silica gel, pentane/EtOAc 50:50); **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.50 – 7.43 (m, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 1H) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 146.9, 129.0, 129.0, 128.9, 124.7 ppm; **IR** (film) $\tilde{\nu}_{max}$ = 1502, 1457, 1398, 1004, 968, 768, 702, 685 cm⁻¹; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 304 (50), 302 (100), 300 (50) [M]⁺, 223 (38), 221 (42), 196 (38), 194 (42); **HRMS** (ESI) calcd. for C₉H₇Br₂N₂ [M+H]⁺ 300.8976, found 300.8969.



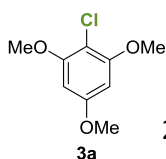
3-Bromo-2-methyl-1H-indole (2j):^[23] red solid; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.99 (s br, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 1H), 7.31 – 7.22 (m, 1H), 7.22 – 7.09 (m, 2H), 2.44 (s, 3H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 211 [M]⁺ (100), 209 [M]⁺ (100), 130 [M-HBr]⁺ (100).



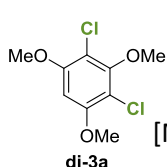
(E)-2-Bromo-1,5-dimethoxy-3-(4-methoxystyryl)benzene (2-Br-2k):^[24] white solid; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) ppm; **MS** (ESI, positive): *m/z* = 349.0; 351.4 [M+H]⁺.



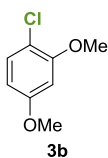
(E)-2-Bromo-1,3-dimethoxy-5-(4-methoxystyryl)benzene (6-Br-2k):^[25] white solid; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 16.2 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H), 3.95 (s, 6H), 3.84 (s, 3H) ppm; **MS** (ESI, positive): *m/z* = 349.0; 351.4 [M+H]⁺.



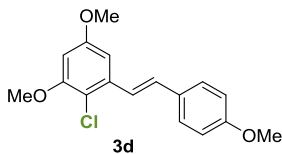
2-Chloro-1,3,5-trimethoxybenzene (3a):^[26] white solid; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ = 6.17 (s, 2H), 3.87 (s, 6H), 3.80 (s, 3H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 202 [M]⁺ (100), 203 [M]⁺ (13), 204 [M]⁺ (35), 205 [M]⁺ (4), 159 (35).



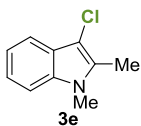
2,4-Dichloro-1,3,5-trimethoxybenzene (di-3a):^[27] white solid; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 6.38 (s, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.89 (s, 3H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 236 $[\text{M}]^+$ (100), 237 $[\text{M}]^+$ (10), 238 $[\text{M}]^+$ (69), 239 $[\text{M}]^+$ (8), 240 $[\text{M}]^+$ (13), 193 (50), 195 (33).



1-Chloro-2,4-dimethoxybenzene (3b):^[26] yellow oil; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.29 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (s, 3H) ppm; **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 172 $[\text{M}]^+$ (100), 173 $[\text{M}]^+$ (8), 174 $[\text{M}]^+$ (31), 175 $[\text{M}]^+$ (3), 129 (50).



(E)-2-Chloro-1,5-dimethoxy-3-(4-methoxystyryl)benzene (3d): white solid; **m. p.** = 85°C; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.50 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.26 (s, 3H), 7.01 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 159.8, 158.8, 156.2, 137.3, 131.2, 129.9, 128.3, 123.1, 114.4, 114.3, 101.9, 99.0, 56.4, 55.7, 55.5 ppm; **IR** (film) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ = 1583, 1511, 1453, 1245, 1202, 1174, 1162, 1088, 1035, 827 cm^{-1} ; **MS** (ESI, positive): m/z = 305.1; 307.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; **HRMS** (ESI) calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 305.0944, found 305.0938.



3-Chloro-1,2-dimethyl-1H-indole (3e): yellow solid; **m. p.** = 60°C; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.56 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.30 – 7.20 (m, 2H), 7.16 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.44 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 135.5, 132.4, 125.4, 121.8, 119.9, 117.6, 109.0, 102.5, 30.1, 10.1 ppm; **IR** (film) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ = 1705, 1470, 1323, 1238, 1172, 857, 728 cm^{-1} ; **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 179 $[\text{M}]^+$ (100), 181 $[\text{M}]^+$ (33), 144 $[\text{M}-\text{HCl}]^+$ (54); **HRMS** (ESI) calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 180.0580, found 180.0574.

The spectroscopic data are in agreement with those reported in the literature.

8. References

- [1] S. Alagaratnam, N. J. Meeuwenoord, J. A. Navarro, M. Hervás, M. A. De la Rosa, M. Hoffmann, O. Einsle, M. Ubbink, G. W. Canters, *FEBS J.* **2011**, *278*, 1506-1521.
- [2] J. B. Priebe, J. Radnik, A. J. J. Lennox, M.-M. Pohl, M. Karnahl, D. Hollmann, K. Grabow, U. Bentrup, H. Junge, M. Beller, A. Brückner, *ACS Catalysis* **2015**, *5*, 2137-2148.
- [3] A. Frank, C. J. Seel, M. Groll, T. Gulder, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2028-2032.
- [4] S. Diethelm, R. Teufel, L. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11023-11026.
- [5] C. Leblanc, H. Vilter, J. B. Fournier, L. Delage, P. Potin, E. Rebuffet, G. Michel, P. L. Solari, M. C. Feiters, M. Czjzek, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301-302*, 134-146.
- [6] B. Webb, A. Sali, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2014**, *1137*, 1-15.
- [7] P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyanaga, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4268-4270.
- [8] K.-i. Miyata, M. Miyashita, R. Nose, Y. Otake, H. Miyagawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 2138-2144.
- [9] T. Hering, B. Mühldorf, R. Wolf, B. König, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5342-5345.
- [10] R. A. Tschirret-Guth, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 411-412.
- [11] J. R. Merkel, W. J. Nickerson, *Biochim. Biophys. Acta* **1954**, *14*, 303-311.
- [12] S. Fukuzumi, K. Tani, T. Tanaka, *Chem. Commun.* **1989**, 816-818.
- [13] W. Zhang, E. Fernández-Fueyo, Y. Ni, M. van Schie, J. Gacs, R. Renirie, R. Wever, F. G. Mutti, D. Rother, M. Alcalde, F. Hollmann, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 55-62.
- [14] B. Ohtani, O. O. Prieto-Mahaney, D. Li, R. Abe, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2010**, *216*, 179-182.
- [15] G. Verardo, A. G. Giumanini, P. Strazzolini, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4303-4332.
- [16] J. M. B. P. R. Huddleston, B. Stickland, M. L. Wood, L. H. M. Guindi, *J. Chem. Res. Synop.* **1988**, *8*, 1871 - 1890.
- [17] Ł. Struk, J. G. Sośnicki, *Synthesis* **2012**, *44*, 735-746.
- [18] K. H. Lam, R. Gambari, M. C. W. Yuen, C. W. Kan, P. Chan, L. Xu, W. Tang, C. H. Chui, G. Y. M. Cheng, R. S. M. Wong, F. Y. Lau, C. S. W. Tong, A. K. W. Chan, P. B. S. Lai, S. H. L. Kok, C. H. Cheng, A. S. C. Chan, J. C. O. Tang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2266-2269.
- [19] C. L. Sun, P. C. Tang, D. Ockey (Sugen Inc), US2004138269 (A1), **2004**.
- [20] S. M. Bonesi, M. A. Ponce, R. Erra-Balsells, *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, *42*, 867-875.
- [21] R. Breslow, J. T. Hunt, R. Smiley, T. Tarnowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5337-5342.
- [22] J. Tan, Y. Chen, H. Li, N. Yasuda, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8871-8876.
- [23] R. Pathak, J. M. Nhlapo, S. Govender, J. P. Michael, W. A. L. van Otterlo, C. B. de Koning, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2820-2830.
- [24] S. A. Snyder, S. P. Breazzano, A. G. Ross, Y. Lin, A. L. Zografos, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1753-1765.
- [25] K. C. Nicolaou, Q. Kang, T. R. Wu, C. S. Lim, D. Y. K. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7540-7548.
- [26] X. Peng, X.-F. Shao, Z.-Q. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3079-3081.
- [27] Z. Lu, Q. Li, M. Tang, P. Jiang, H. Zheng, X. Yang, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 14852-14855.