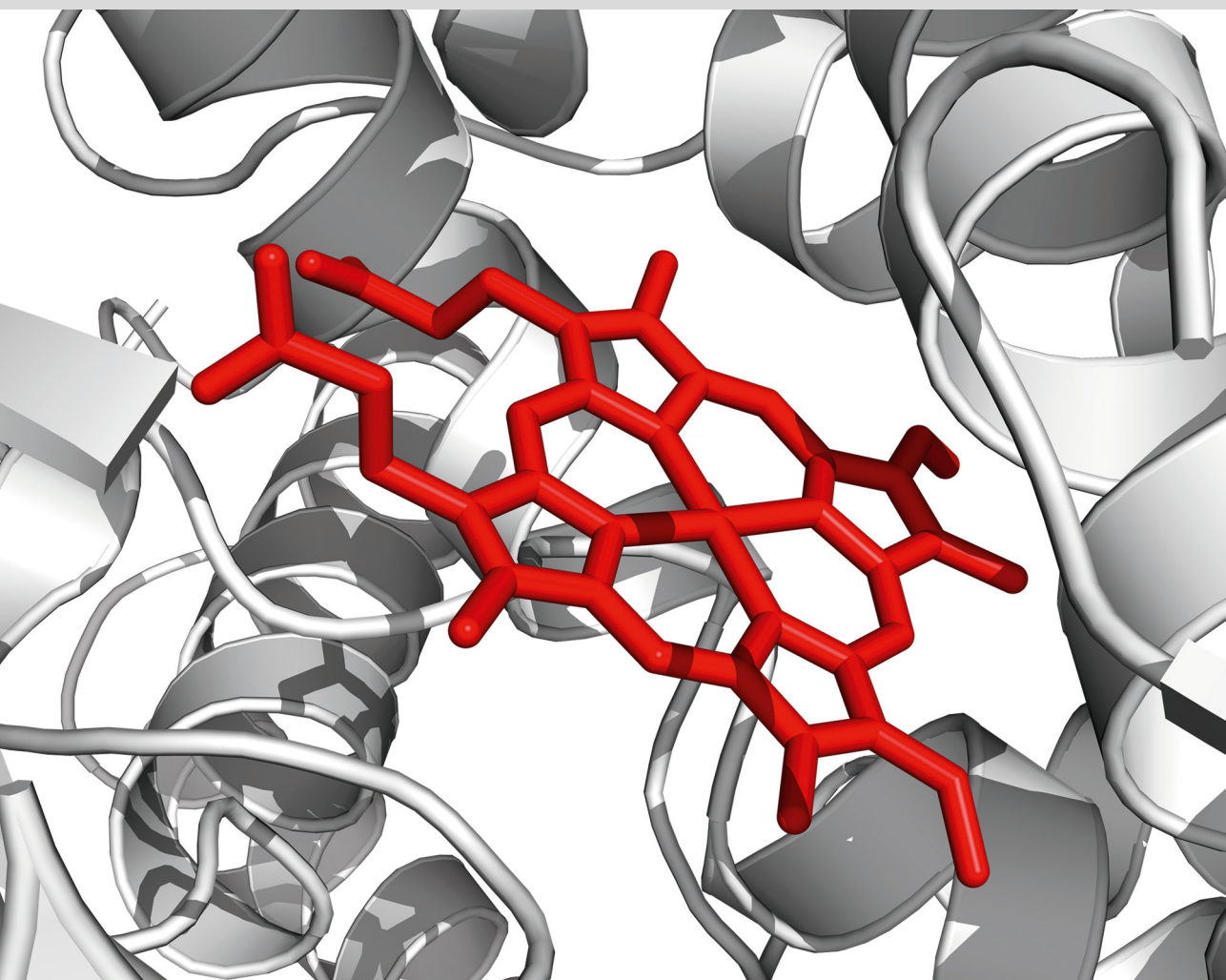


Etablierung von P450 BM3 Monooxygenasen als chemo- und stereoselektive Biokatalysatoren für die organische Synthese

Katharina Neufeld



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Etablierung von P450 BM3 Monooxygenasen als chemo- und stereoselektive Biokatalysatoren für die organische Synthese

Katharina Neufeld

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 19

ISBN 978-3-95806-043-2

INHALTSVERZEICHNIS

PUBLIKATIONEN	7
INHALTSVERZEICHNIS	11
1 VORBEMERKUNGEN UND ABKÜRZUNGEN.....	17
2 KURZZUSAMMENFASSUNG	23
3 ABSTRACT	25
4 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	29
5 KENNTNISSTAND	35
5.1 Biokatalyse als Bestandteil der modernen Synthese.....	35
5.2 Konzepte des Proteinengineerings.....	37
5.3 Naturstoffe sind der Schlüssel zu neuen Pharmaka	39
5.4 C-H-Aktivierung – ein heiliger Gral der Synthese	41
5.4.1 Benzylalkohole: Verwendung & Herstellung	42
5.4.2 Allylalkohole: Verwendung & Herstellung.....	44
Schlüsselbausteine für die Naturstoffsynthese.....	44
Literaturbekannte Synthesemöglichkeiten.....	46
5.5 Monooxygenasen	53
5.5.1 Die Arten der Monooxygenasen	53
5.5.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen	54
5.5.3 Katalysemechanismus.....	57
5.5.4 Potential für die organische Synthese.....	59
5.6 Die bakterielle P450 BM3 Monooxygenase	61
5.6.1 Historie: von der Entdeckung zur ersten Kristallstruktur.....	62
5.6.2 Erfolge aus zwei Jahrzehnten P450 BM3-Forschung.....	64
5.6.3 Präparative Anwendungen der P450 BM3 Monooxygenase.....	65
5.6.4 Ein bakterielles Enzym mit eukaryotischen Zügen.....	68
5.6.5 Aktivitätsassays für die P450 BM3 Monooxygenase.....	69
5.7 Oxidative kinetische Racematspaltung	72

6	EIGENE ERGEBNISSE	75
6.1	Herstellung von P450 BM3-Enzymbibliotheken	75
6.1.1	Bibliothekdesign	75
	F87A-basierte Bibliothek für sterisch anspruchsvolle Substrate.....	76
	WT-basierte Bibliothek für lineare aliphatische Substrate.....	78
	GVQ-Mutanten	79
6.1.2	F87A-basierte P450 BM3-Sättigungsbibliotheken	80
	pET28a(+)-F87A _{SSM} -Bibliothek	81
	pCYTEXP1-F87A _{SSM} -Bibliothek	84
	Qualitätskontrolle & Vergleich der Sättigungsbibliotheken.....	84
6.1.3	F87A- & WT-basierte P450 BM3-Mutantensammlungen.....	88
	Erzeugung der WT-L188 _{MS} -Subbibliothek	89
	Erzeugung der WT/F87A-R47 _{MS} /Y51 _{MS} -Subbibliotheken	92
	Erzeugung der GVQ-Subbibliothek.....	95
	Produktion der Proteinbibliotheken & Qualitätskontrolle	96
6.2	Oxidation aromatischer Substrate	99
6.2.1	Substratdesign	99
6.2.2	Untersuchung eines aromatischen Esters.....	102
	<i>Durchmusterung der Sättigungsbibliothek.....</i>	102
	Produktidentifizierung	110
	Charakterisierung der besten P450 BM3-Mutanten.....	112
	Durchmusterung der Mutantensammlung	115
6.2.3	Untersuchung des Triflatderivats.....	119
	Durchmusterung der Sättigungsbibliothek.....	119
	Durchmusterung der Mutantensammlung	123
	Produktidentifizierung	124
6.2.4	Untersuchung weiterer aromatischer Substrate	127
	Substratsynthese	128
	Durchmusterung der Mutantensammlung	128
	Produktidentifizierung	129
6.2.5	Substratspektrum der F87A L188C-Mutante	130
	Nachweis der Enzymaktivität mittels NADPH-Assay	131
	Nachweis der benzylichen Hydroxylierung mittels NMR-Analyse.....	132
	Nachweis der Produktivität durch Umsatzbetrachtung	135
6.2.6	Versuche zur Erklärung der Aktivität & Chemoselektivität	138
6.2.7	Optimierungsstudien und präparative Anwendung	141
	Allgemeine Überlegungen.....	141
	Überprüfung genereller Reaktionsparameter	142
	Vergleich unterschiedlicher P450 BM3-Mutanten & Systeme	144
	Einfluss von Additiven: analytischer vs. präparativer Maßstab	146
	Anwendung der F87A L188C-Mutante im präparativen Maßstab.....	149

6.3 Oxidation aliphatischer Substrate.....	151
6.3.1 Exkurs: alte Ergebnisse neu interpretiert	151
6.3.2 Substratwahl und Herstellung einer Substratbibliothek	155
6.3.3 Initialer Nachweis der Eignung der Substratbibliothek	156
6.3.4 Synthese der Allylalkoholreferenzen	157
Synthese der racemischen Referenzen	157
Synthese der enantiomerenreinen/-angereicherten Referenzen	160
6.3.5 Durchmusterungen der Mutantensammlung	161
6-Heptensäureethylester als Substrat.....	161
8-Nonensäureethylester als Substrat.....	164
6.3.6 Charakterisierung der besten P450 BM3-Mutanten	167
6.3.7 Substratspektrums der A74G L188Q-Mutante	169
Untersuchung der Substratbibliothek	169
Substratengineering am Beispiel von 6-Heptensäurederivaten	173
6.3.8 Optimierungsstudien und präparative Anwendungen	177
Optimierungsstudien: Temperatur, Substratkonzentration & Katalase	177
Etablierung einer Aufreinigung für die GDH	179
Biotransformationen von (ω -1)-Alkensäureestern.....	181
Biotransformation einer (ω -1)-Alkensäure	186
6.4 Etablierung eines Fluoreszenzassays für P450 BM3.....	189
6.4.1 Auswahl und Synthese eines geeigneten Fluorophors.....	189
6.4.2 Design und Synthese des fluorogenen Substrats.....	193
6.4.3 Charakterisierung der synthetisierten Umbelliferonether	194
6.4.4 Initialer Nachweis der <i>O</i> -Dealkylierung durch P450 BM3.....	195
6.4.5 Etablierung vereinfachter Assayprotokolle	197
Referenzmessung mit NADPH als Elektronenquelle.....	197
Anwendung unterschiedlicher NADPH-Regenerierungssysteme.....	198
Anwendung unterschiedlicher P450 BM3-Proben.....	200
6.4.6 Bestimmung der kinetischen Parameter	201
6.4.7 Nutzung des Fluoreszenzassays für Inhibitionsstudien	204
Etablierung eines kompetitiven Inhibitionsassays	204
Bestimmung von IC ₅₀ -Werten.....	207
6.4.8 Vergleichende Untersuchungen mit Resorufinanaloga.....	208
6.5 Versuche zur Oxygenierung von Cumarinen	212
6.5.1 Benzylische Hydroxylierung zum Alkohol	212
6.5.2 Benzylische Hydroxylierung zur <i>O</i> -Dealkylierung.....	213
6.6 Versuche zur Naturstoffsynthese.....	218
6.6.1 Pinellinsäure	218
6.6.2 Retrosynthetische Analyse der Pinellinsäure.....	219
6.6.3 Herstellung eines Homoallylalkohols mittels ADH	221
6.6.4 Herstellung eines Homoallylalkohols mittels Lipase.....	222
6.6.5 Herstellung eines Homoallylalkohols mittels ADH/P450	227

7	ZUSAMMENFASSUNG	237
7.1	Herstellung von P450 BM3-Enzymbibliotheken	237
7.2	Einstufige Herstellung von Benzylalkoholen	241
7.3	Enantioselektive Herstellung von Allylalkoholen	244
7.4	Etablierung fluorogener P450 BM3-Substrate	247
7.5	Cumarine als P450 BM3-Substrate.....	250
7.6	Pinellinsäuresynthese & P450-NADPH-Oxidaseaktivität.....	251
8	AUSBLICK.....	255
8.1	Erweiterung der Mutantensammlungen.....	255
8.2	Enantioselektive benzyliche Hydroxylierungen	257
8.3	Enantioselektive allylische Hydroxylierungen	258
8.4	Anwendung des Fluoreszenzassays für ein „Fingerprint“	259
8.5	Effizientere P450 BM3-NAD(P)H-Oxidasen	261
8.6	Aspekte der synthetischen Anwendung von P450 BM3.....	262
9	EXPERIMENTELLER TEIL	265
9.1	Allgemeines.....	265
9.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	265
9.1.2	Bakterienstämme.....	266
9.1.3	Plasmide.....	266
9.1.4	Oligonukleotide	268
9.1.5	Software	269
9.1.6	Puffer und Stammlösungen	269
9.1.7	Geräte	270
9.1.8	Verbrauchsmaterialien	271
9.2	Analytische Methoden	272
9.2.1	Dünnschichtchromatographie.....	272
9.2.2	Kernresonanzspektroskopie	272
9.2.3	Schmelzpunkte.....	272
9.2.4	Infrarotspektroskopie.....	273
9.2.5	Massenspektrometrie	273
9.2.6	Elementaranalysen	274
9.2.7	Drehwerte.....	274
9.2.8	Chromatographische Methoden.....	274

9.3	Molekularbiologische Methoden	278
9.3.1	Isolierung und Aufreinigung von DNS.....	278
9.3.2	Sequenzierung	278
9.3.3	Agarosegelelektrophorese.....	279
9.3.4	Polymerasekettenreaktion.....	279
9.3.5	Kassettenmutagenese.....	285
9.3.6	Restriktionsverdau von DNS.....	286
9.3.7	Ligation.....	287
9.3.8	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	288
9.3.9	Kultivierung von <i>E. coli</i> und Expression von P450 BM3.....	289
9.4	Biochemische Methoden	293
9.4.1	Herstellung zellfreier Rohlysate	293
9.4.2	Proteinaufreinigung.....	294
9.4.3	Bestimmung der Cytochrom P450-Konzentration.....	298
9.4.4	Lyophilisation von Proteinproben	299
9.4.5	SDS-PAGE	299
9.4.6	Photometrische Aktivitätsassays	301
9.4.7	Produktbasierte Aktivitäts-/Selektivitätsassays	311
9.4.8	Biotransformationen mit P450 BM3	318
9.4.9	Bestimmung kinetischer Parameter von P450 BM3	323
9.4.10	Bestimmung der Kopplungseffizienz von P450 BM3	326
9.5	Synthesen	328
9.5.1	Allgemeines	328
9.5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	328
9.5.3	Synthese der aromatischen Enzymsubstrate	335
9.5.4	Synthese der aliphatischen Enzymsubstrate.....	341
9.5.5	Synthese der aromatischen Produktreferenzen	352
9.5.6	Synthese der aliphatischen Produktreferenzen	355
9.5.7	Synthese der Assaysubstrate.....	378
9.5.8	Synthese der Pinellinsäure	387
9.5.9	P450 BM3-katalysierte Biotransformationen	397
10	ANHANG.....	403
10.1	Übersicht der Erzeugung von Mutantensammlungen	403
10.2	Durchmusterung von Enzymbibliotheken	404
10.3	Struktur-Funktions-Studien	407
10.4	Vektorkarten und Sequenzen.....	408

11	FORMELREGISTER.....	411
12	LITERATURVERZEICHNIS.....	415
13	DANKSAGUNG	459
14	ERKLÄRUNG	461

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Die selektive Aktivierung von C-H-Bindungen zur *de novo* Funktionalisierung einfacher Ausgangssubstanzen gilt als eleganteste Methode zur Erhöhung der strukturellen Komplexität von Verbindungen in der organischen Synthese. Chemische Methoden für entsprechende Umsetzungen stehen jedoch nur begrenzt zur Verfügung, sodass Monoxygenasen im Hinblick auf Oxyfunktionalisierungen ein enormes Potential bergen. Die Erforschung dieser Biokatalysatoren für solche Anwendungen stellt daher eine wichtige Herausforderung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen eine vielseitig anwendbare Enzymbibliothek der bakteriellen P450 BM3 Monoxygenase aus *B. megaterium* herzustellen. Die Bibliothek wurde zur Identifizierung von Enzymvarianten für die chemoselektive benzyllische Hydroxylierung von hochsubstituierten Aromaten sowie für die chemo- und enantioselektive allyllische Hydroxylierung von linearen terminalen Olefinen herangezogen; letztere lieferte einen effizienten Zugang zu wichtigen Schlüsselbausteinen für die Naturstoffsynthese. Die präparative Herstellung der entsprechenden Alkohole zeigte zudem das synthetische Anwendungspotential der Biokatalysatoren auf und stellt eine signifikante Verbesserung zu konventionellen chemischen Methoden dar. Des Weiteren wurde die erzeugte Enzymbibliothek zur Etablierung eines Fluoreszenzassays auf Cumarinbasis genutzt, der sowohl als Grundlage für ein Proteinengineering als auch zur Identifizierung potentieller Substrate dieses Enzyms eingesetzt werden kann und zahlreiche Vorteile gegenüber bekannten Alternativen bietet. Die Anwendung von P450 BM3 für die Kofaktorregenerierung im Rahmen einer oxidativen kinetischen Racematspaltung zeigte ferner eine bislang unbekannte Einsatzmöglichkeit für P450 Monoxygenasen auf.

Band 19
ISBN 978-3-95806-043-2