

**Kolorimetrische und fluorimetrische Assays  
– Auf der Jagd nach neuen Biokatalysatoren für die  
Synthesechemie –**

Benjamin Lauinger

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

# **Kolorimetrische und fluorimetrische Assays – Auf der Jagd nach neuen Biokatalysatoren für die Synthesechemie –**

Benjamin Lauinger

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

Band 22

---

ISBN 978-3-95806-133-0

## INHALTVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>VORBEMERKUNGEN UND ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.</b>	<b>Vorbemerkungen .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.</b>	<b>Lipases and Esterases .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.</b>	<b>P450 monooxygenases .....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>25</b>
<b>5.</b>	<b>KENNTNISSTAND.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.</b>	<b>Enzyme.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2.</b>	<b>Monooxygenasen.....</b>	<b>30</b>
5.2.1.	Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	31
5.2.2.	Mechanismus der Cytochrom P450 Monooxygenase Katalyse.....	32
5.2.3.	Die Cytochrom P450 Monooxygenase BM3 .....	33
<b>5.3.</b>	<b>Esterasen und Lipasen .....</b>	<b>35</b>
5.3.1.	Mechanismus der Lipase/Esterase Katalyse .....	35
5.3.2.	Anwendung von Lipasen und Esterasen .....	36
<b>5.4.</b>	<b>Lipase/Esterase Enantioselektivitätsassays .....</b>	<b>37</b>
5.4.1.	Definition des Begriffs Enantioselektivität.....	37
5.4.2.	Chromatographische Assays .....	38
5.4.3.	Screenings mit Freisetzung eines Chromo- bzw. Fluorophors aus dem entsprechend markierten Substrat im Mikrotiterplattenformat.....	38
5.4.4.	Enzym gekoppelte Assays .....	41
5.4.5.	pH-Indikator Assays.....	41
5.4.6.	Pseudoenantiomere zur Bestimmung von Enantioselektivitäten .....	42
5.4.7.	Enantioselektivitätsbestimmung durch Bildung von Diastereomeren .....	43
5.4.8.	Zirkulardichroismus basierte Assays .....	43
5.4.9.	IR Thermographie basierte Assays .....	44
5.4.10.	Assays beruhend auf FRET .....	44

5.4.11.	Bestimmung der Lipase/Esterase Enantioselektivität durch (Rück)Titration	45
5.4.12.	Screening mittels Fluoreszenz assistierter Zellsortierung.....	45
<b>5.5.</b>	<b>Selektion aufgrund von Lipase/Esterase-Enantioselektivität .....</b>	<b>48</b>
<b>5.6.</b>	<b>Lipase/Esterase-Fingerprintings .....</b>	<b>48</b>
<b>5.7.</b>	<b>Monooxygenase-Fingerprinting.....</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>EIGENE ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>6.1.</b>	<b>Synthese fluorogener P450-Substrate .....</b>	<b>55</b>
<b>6.2.</b>	<b>Synthese hydroxylierter fluorogener P450-Substrate .....</b>	<b>57</b>
<b>6.3.</b>	<b>P450-Assayentwicklung.....</b>	<b>59</b>
6.3.1.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole .....	59
6.3.1.1.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/NaOCl in einem Einphasensystem .....	59
6.3.1.2.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/NaOCl in einem Zweiphasensystem.....	61
6.3.1.3.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/Diacetoxyiodbenzol in einem Zweiphasensystem.....	62
6.3.1.4.	Wirken MVK und Acrolein als Quencher? .....	67
6.3.1.5.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/O <sub>2</sub> /Laccase .....	68
6.3.1.6.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/O <sub>2</sub> /Laccase in Anwesenheit reduktiver Komponenten.....	71
6.3.1.7.	Chemische Generierung des Oxoammoniumions aus TEMPO.....	72
6.3.1.8.	Stabilität der fluorogenen 3'-Alkohole bei verschiedenen pH-Werten .....	75
6.3.1.9.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole bei pH 8.0 .....	76
6.3.1.10.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch hypervalente Iodreagenzien .....	78
6.3.1.11.	Extraktion der fluorogenen 3'-Alkohole und Oxidation durch hypervalente Iodreagenzien.....	80
6.3.1.12.	Effizienz der fluorogenen 3'-Alkohol-Extraktion .....	82
<b>6.4.</b>	<b>P450-Fingerprinting.....</b>	<b>84</b>
6.4.1.	Detektion der 1'-Hydroxylierung.....	84
6.4.2.	Detektion der 3'-Hydroxylierung.....	90
6.4.3.	Zusammenfassung der 1' und 3'-Hydroxylierungsfingerabdrücke zur Darstellung der Selektivitäten.....	93
6.4.4.	Vergleich der Selektivitäten der P450 BM3-Varianten gegenüber dem Substrat Pentenoxy-TFMC.....	97
<b>6.5.</b>	<b>Synthese chromo- und fluorogener Lipase/Esterasesubstrate .....</b>	<b>98</b>

<b>6.6.</b>	<b>Lipase-Assay Entwicklung .....</b>	<b>101</b>
<b>6.7.</b>	<b>Kolor- und fluorimetrisches Fingerprinting verschiedener Lipasen/Esterasen .....</b>	<b>104</b>
<b>6.8.</b>	<b>Fluorimetrische Untersuchung ganzer Zellen.....</b>	<b>108</b>
6.8.1.	Fluoreszenzmikroskopie .....	108
6.8.2.	Durchflusszytometer .....	109
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>117</b>
<b>7.1.</b>	<b>P450 Fingerprinting .....</b>	<b>117</b>
<b>7.2.</b>	<b>Lipase/Esterase-Fingerprinting .....</b>	<b>120</b>
<b>8.</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>123</b>
<b>8.1.</b>	<b>P450-Fingerprinting.....</b>	<b>123</b>
<b>8.2.</b>	<b>Lipase/Esterase-Screening und –Fingerprinting .....</b>	<b>125</b>
<b>9.</b>	<b>EXPERIMENTALTEIL .....</b>	<b>127</b>
<b>9.1.</b>	<b>Allgemeines.....</b>	<b>127</b>
9.1.1.	Geräte.....	127
9.1.2.	Glasgeräte und Chemikalien .....	128
9.1.3.	Verbrauchsmaterialien.....	128
9.1.4.	Software .....	129
9.1.5.	Enzyme .....	129
9.1.6.	Puffer .....	130
<b>9.2.</b>	<b>Analytik und Substanzisolation .....</b>	<b>130</b>
9.2.1.	NMR.....	130
9.2.2.	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie.....	131
9.2.3.	Hochauflösende Massenspektrometrie.....	131
9.2.4.	Präparative Säulen- und analytische Dünnschichtchromatographie.....	131
9.2.5.	Infrarotspektroskopie.....	131
9.2.6.	Bestimmung des spezifischen Drehwinkels .....	132
9.2.7.	Schmelzpunktbestimmung.....	132
9.2.8.	HPLC an chiraler stationärer Phase .....	132
<b>9.3.</b>	<b>Synthese fluorogener P450-Substrate .....</b>	<b>132</b>

9.3.1.	7-Hydroxy-4-trifluormethylcoumarin (5) .....	132
9.3.2.	7-(Buttersäuremethylester-4-oxy)-trifluormethylcoumarin (39) .....	133
9.3.3.	7-(Valeriansäuremethylester-4-oxy)-trifluormethylcoumarin (40) .....	134
9.3.4.	7-(Pent-4-en-oxy)-trifluormethylcoumarin (41) .....	135
9.3.5.	7-(Benzyloxy)-trifluormethylcoumarin (42) .....	136
9.3.6.	7-(Buttersäure-4-oxy)-trifluormethylcoumarin (43) .....	137
9.3.7.	7-(Valeriansäure-4-oxy)-trifluormethylcoumarin (44) .....	138
<b>9.4.</b>	<b>Synthese hydroxylierter fluorogener P450-Substrate .....</b>	<b>139</b>
9.4.1.	2-(3-Brompropoxy)tetrahydro-2H-pyran (48).....	139
9.4.2.	THP-geschütztes 7-(3-Hydroxypropoxy)-trifluormethylcoumarin 50 .....	140
9.4.3.	7-(3-Hydroxypropoxy)-trifluormethylcoumarin (46) .....	141
9.4.4.	THP-geschütztes 7-(3-Hydroxypropoxy)-coumarin (49) .....	142
9.4.5.	7-(3-Hydroxypropoxy)-coumarin (45) .....	143
9.4.6.	7-(3-Hydroxybutoxy)-trifluormethylcoumarin (51).....	144
<b>9.5.</b>	<b>NMR-Daten des Pentenoxy-3,4-Dihydro-TFMCs (56) .....</b>	<b>145</b>
<b>9.6.</b>	<b>Synthese chromo- und fluorogener Lipase/Esterasesubstrate .....</b>	<b>145</b>
9.6.1.	2-( <i>R</i> )-Methyldecansäure- <i>para</i> -nitrophenylester (13) .....	145
9.6.2.	2-Methyldecansäuremethylumbelliferylester-Enantiomere (63).....	146
9.6.3.	<i>rac</i> -2-Methyldecansäuremethylumbelliferylesters ( <i>rac</i> -63).....	148
9.6.4.	Ibuprofenmethylumbelliferylester (64) .....	148
9.6.5.	Octansäuremethylumbelliferylesters (68) .....	149
9.6.6.	2-Methyldecansäuretrifluormethylumbelliferylester (69) .....	150
<b>9.7.</b>	<b>P450-Assayentwicklung .....</b>	<b>151</b>
9.7.1.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole.....	151
9.7.1.1.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/NaOCl in einem Einphasensystem .....	152
9.7.1.2.	Oxidation der fluorogener 3'-Alkohole durch TEMPO/NaOCl in einem Zweiphasensystem .....	153
9.7.1.3.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/Diacetoxyiodbenzol in einem Zweiphasensystem.....	153
9.7.1.4.	Wirken MVK und Acrolein als Quencher? .....	155
9.7.1.5.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch TEMPO/O <sub>2</sub> /Laccase .....	155
9.7.1.6.	Chemische Generierung des Oxoammoniumions aus TEMPO.....	158
9.7.1.7.	Stabilität der fluorogenen 3'-Alkohole bei verschiedenen pH-Werten .....	160
9.7.1.8.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole bei pH 8.0 .....	161

9.7.1.9.	Oxidation der fluorogenen 3'-Alkohole durch hypervalente Iodreagenzien .....	162
9.7.1.10.	Extraktion der fluorogenen 3'-Alkohole und Oxidation durch hypervalente Iodreagenzien.....	162
9.7.1.11.	Effizienz der fluorogenen 3'-Alkohol-Extraktion .....	164
<b>9.8.</b>	<b>P450-Fingerprinting.....</b>	<b>164</b>
9.8.1.	Detektion der 1'- und 3'-Hydroxylierung .....	165
9.8.2.	Darstellung der 1'- und 3'-Hydroxylierung als Pixelgrafiken.....	166
<b>9.9.</b>	<b>Lipase-Assay Entwicklung .....</b>	<b>167</b>
<b>9.10.</b>	<b>Kolor- und fluorimetrisches Fingerprinting verschiedener Lipasen/Esterasen .....</b>	<b>170</b>
<b>9.11.</b>	<b>Fluorimetrische Untersuchung ganzer Zellen.....</b>	<b>170</b>
9.11.1.	Herstellung der Färbelösungen .....	170
9.11.2.	Anzucht und Behandlung der Zellen .....	170
9.11.3.	Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	171
9.11.4.	Untersuchung der Zellen im Durchflusszytometer .....	171
<b>9.12.</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>172</b>
9.12.1.	Bestimmung der GDH-Aktivität.....	172
<b>9.13.</b>	<b>Molekular- und mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>172</b>
9.13.1.	Sequenzierungen.....	172
9.13.2.	Bakterienstämme .....	173
9.13.3.	Nährmedien und Medienzusätze.....	173
9.13.4.	Herstellung kompetenter Zellen .....	174
9.13.5.	Transformation kompetenter Zellen.....	175
9.13.6.	Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Plasmidisolation.....	175
9.13.7.	Anzucht von <i>E. coli</i> Vor- und Glycerinkulturen in 96-Loch-Mikrotiterplatten .....	175
9.13.8.	Produktion von P450 BM3-Varianten in 96-Loch-Deep-Well-Platten .....	175
9.13.9.	Zellaufschluss mittels Lysozym.....	176
9.13.10.	Plasmide .....	176
9.13.11.	Primer .....	177
9.13.12.	Agarosegelelektrophorese .....	178
9.13.13.	Kolonie-PCR .....	178
9.13.14.	SDS-PAGE.....	179

9.13.14.1.	Herstellung der Gele.....	179
9.13.14.2.	Probenvorbereitung .....	180
9.13.14.3.	Durchführung der Elektrophorese .....	180
9.13.14.4.	Gelfärbung.....	181
<b>9.13.15.</b>	<b>DNA-Aufreinigung und –Isolation .....</b>	<b>181</b>
9.13.15.1.	Präparation von Plasmid DNA .....	181
9.13.15.2.	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	181
9.13.15.3.	DNA-Fällung mittels Isopropanol .....	181
9.13.15.4.	Isolation genomischer DNA aus E. coli .....	182
<b>9.13.16.</b>	<b>Herstellung eines bicistronischen Konstruktes zur Produktion von Flavodoxin/Flavodoxinreduktase .....</b>	<b>182</b>
9.13.16.1.	Amplifizierung der Gene <i>fldA</i> und <i>fpr</i> .....	183
9.13.16.2.	Zusammenfügen der Produkte aus PCR 1a und PCR 1b (PCR 2) .....	185
9.13.16.3.	Vervielfältigung des zusammengefügteten Konstruktes (PCR 3) .....	185
9.13.16.4.	Klonierung des <i>fldA-rbs-fpr</i> -Konstruktes in den Vektor pACYCDuet-1 .....	186
9.13.16.5.	Generierung des Plasmids pET28a(+): <i>fldA-rbs-fpr</i> .....	187
<b>9.13.17.</b>	<b>Klonierung verschiedener P450- Elektronentransport-Gen Kombinationen .....</b>	<b>187</b>
9.13.17.1.	Generierung des Plasmids pACYCDuet-1:: <i>fldA-rbs-fpr-p450<sub>BsB</sub></i> .....	187
9.13.17.2.	Entfernen der <i>NdeI</i> und <i>EcoRI</i> -Erkennungssequenzen aus <i>p450<sub>CLA</sub></i> .....	188
9.13.17.3.	Amplifizierung des P450 BM3-Reduktases.....	189
9.13.17.4.	Die Generierung von weiteren P450-Elektronentransportsystem-Gen-Kombinationen.....	190
<b>9.13.18.</b>	<b>Produktion der P450-Elektronentransportsystem-Kombinationen.....</b>	<b>191</b>
9.13.18.1.	Expression des bicistronischen <i>fldA-fpr</i> -Konstruktes ohne P450.....	191
9.13.18.2.	Expression der Elektronentransportgene mit P450-Genen .....	192
<b>10.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>195</b>
<b>11.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>205</b>
<b>11.1.</b>	<b>SDS-Gel der <i>lipS</i>-positiven und –negativen Zellen.....</b>	<b>205</b>
<b>11.2.</b>	<b>Plasmidkarten .....</b>	<b>206</b>
11.2.1.	<i>pACYCDuet1::fldA-rbs-fpr</i> .....	206
11.2.2.	<i>pet28a(+):fldA-rbs-fpr</i> .....	207
11.2.3.	<i>pACYCDuet-1::fldA-rbs-fpr-p450<sub>BsB</sub></i> .....	208
11.2.4.	<i>pACYCDuet-1::bm3red-p450<sub>BsB</sub></i> .....	210
11.2.5.	<i>pACYCDuet-1::fldA-fpr-p450<sub>CLA</sub>QC</i> .....	212
11.2.6.	<i>pACYCDuet-1::bm3red-p450<sub>CLA</sub>QC</i> .....	214



11.2.7.	pET21a(+): <i>lipS</i> .....	215
<b>12.</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>217</b>
<b>13.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>219</b>

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

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Enzyme stellen mit ihren beeindruckenden katalytischen Eigenschaften die Grundlage des Lebens dar. Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus L-Aminosäuren handelt es sich um chirale Katalysatoren, welche oft hohe Enantioselektivitäten aufweisen. Ein Nadelöhr der Biokatalyse ist jedoch die Verknüpfung von Chemie und Biologie: das Auffinden eines Enzyms, dessen Selektivität und andere Eigenschaften (wie z. B. Stabilität) die Katalyse der gewünschten chemischen Reaktion zulassen. Hierfür sind effiziente Screenings (Durchmusterungen) von großen Enzymbibliotheken notwendig, um schnell eine Auswahl an möglicherweise geeigneten Biokatalysatoren zu treffen. Kostengünstige und zeitsparende Screeningmethoden sind sogenannte kolorimetrische oder fluorimetrische Assays, die z. B. unter Freisetzung eines Chromophors bzw. Fluorophors das Verfolgen der gewünschten Reaktion ermöglichen. Basierend auf diesem Prinzip wurden im Zuge dieser Arbeit Assays für Lipasen/Esterasen und P450 Monooxygenasen entwickelt und durchgeführt. Im Falle der Lipasen/Esterasen wurden in Zusammenarbeit mit anderen Instituten die Substrat- und Enantioselektivitäten neuentdeckter Enzyme untersucht. Zusätzlich erfolgten fluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Analysen, welche für eine mögliche Eignung bestimmter fluorogener Substrate in einem FACS-basierten Ultrahochdurchsatz-Screening sprechen. Im Falle der P450-Monooxygenasen wurden literaturbekannte P450 BM3-Varianten auf ihre Substrat- und Regioselektivität hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Mutationen A74G und L188Q möglicherweise die Selektivität zur allylischen Hydroxylierung begünstigen. Dies steht im Einklang mit bereits literaturbekannten Ergebnissen zur präparativen allylischen Hydroxylierung mit P450 BM3-Mutanten.

**Band 22**

**ISBN 978-3-95806-133-0**