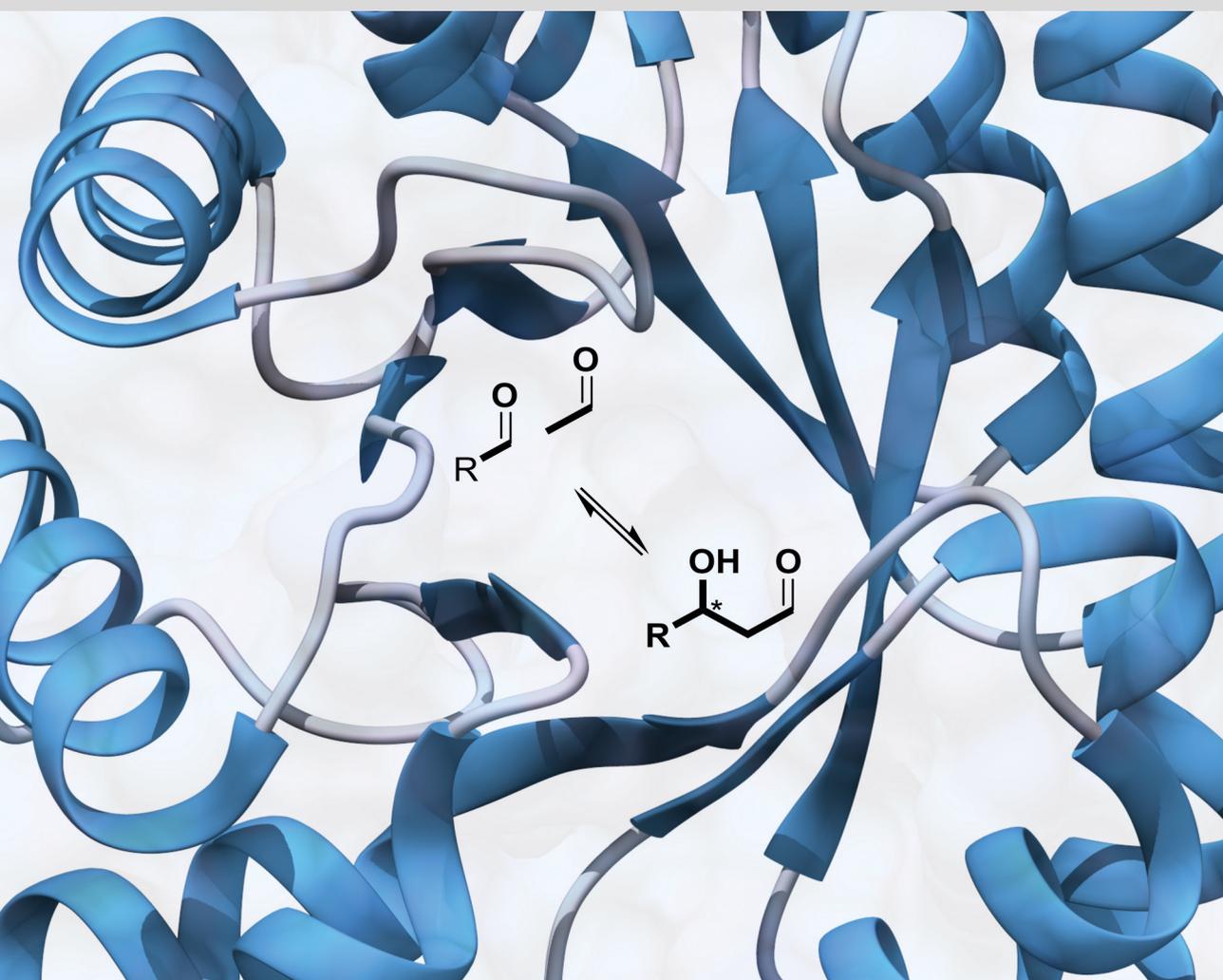


## Rationales Design der Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen und deren Anwendung in der organischen Synthese

Carolin Bisterfeld



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

# **Rationales Design der Acetaldehyd- abhängigen Aldolasen und deren Anwendung in der organischen Synthese**

Carolin Bisterfeld

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

Band 25

---

ISBN 978-3-95806-197-2

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b><u>KURZZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>8</b>
<b>4.1</b>	<b>RATIONAL DESIGN OF ACETALDEHYDE-DEPENDENT ALDOLASES</b>	<b>8</b>
<b>4.2</b>	<b>DERA AS BIOCATALYST IN ORGANIC SYNTHESIS</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b><u>KENNTNISSTAND</u></b>	<b>19</b>
<b>5.1</b>	<b>ACETALDEHYD-ABHÄNGIGE ALDOLASEN</b>	<b>19</b>
<b>5.2</b>	<b>ACETALDEHYD-ABHÄNGIGE ALDOLASEN IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE</b>	<b>27</b>
<b>5.3</b>	<b>SELEKTIVITÄTSUMKEHR VON ENZYMEN</b>	<b>44</b>
5.3.1	DIRECTED EVOLUTION ALS STRATEGIE ZUR SELEKTIVITÄTSUMKEHR VON ENZYMEN	45
5.3.2	<i>DESIGNED EVOLUTION</i> ANSÄTZE ZUR SELEKTIVITÄTSUMKEHR VON ENZYMEN	47
5.3.3	<i>RATIONAL PROTEIN DESIGN</i> ANSÄTZE ZUR SELEKTIVITÄTSUMKEHR VON ENZYMEN	49
5.3.4	ZUSAMMENFASSUNG	52
<b>6</b>	<b><u>EIGENE ERGEBNISSE – RATIONALES DESIGN ACETALDEHYD-ABHÄNGIGER ALDOLASEN</u></b>	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>ETABLIERUNG EINES FLUORESCENZ-BASIERTEN SELEKTIVITÄTSSCREENINGS</b>	<b>56</b>
6.1.1	SYNTHESE DER FLUOROPHOR-GEKOPPELTEN SCREENINGSUBSTRATE	58
6.1.2	ENANTIO- UND DIASTEREOSELEKTIVITÄT DERA VERSCHIEDENER ORGANISMEN	61
<b>6.2</b>	<b>ENTWICKLUNG EINES SELEKTIVITÄTSASSAYS IN ALDOL RICHTUNG</b>	<b>65</b>
6.2.1	REVERSE-PHASE HPLC MIT ACHIRALER STATIONÄRE PHASE	65
6.2.2	HPLC MIT CHIRALER STATIONÄRE PHASE	67
6.2.3	SYNTHESE DER RACEMISCHEN REFERENZSUBSTANZEN FÜR DIE HPLC	70
6.2.4	SYNTHESE DER ENANTIOMERENREINEN REFERENZSUBSTANZEN FÜR DIE HPLC	72

<b>6.3</b>	<b>ERSTELLUNG VON MUTANTEN ZUR SELEKTIVITÄTSUMKEHR</b>	<b>79</b>
6.3.1	VERGLEICH DER ALDOLASEN KDPG, KDPGAL UND DERA	79
6.3.2	IDENTIFIKATION VON STEREOSELEKTIVITÄTS-DETERMINIERENDEN AMINOSÄUREN IN KDPG UND KDPGAL	81
6.3.3	TRANSFER DER SCHLÜSSELPOSITIONEN AUF DERA	83
<b>6.4</b>	<b>ERGEBNISSE DER STEREOSELEKTIVITÄTS-MUTANTEN</b>	<b>95</b>
6.4.1	VERGLEICH MIT DEN DATEN DES RETROALDOLSCREENINGS	101
<b>7</b>	<b><u>EIGENE ERGEBNISSE – DERA ALS BIOKATALYSATOR IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE</u></b>	<b><u>102</u></b>
7.1	EXPRESSION DES <i>DEOC<sub>RE</sub></i> GENS IN <i>C. GLUTAMICUM</i>	102
7.2	UNTERSUCHUNG EINER DERA-VARIANTE MIT VERBESSERTER AKTIVITÄT FÜR CHLORACETALDEHYD	106
7.3	UNTERSUCHUNG EINER STABILEREN DERA-VARIANTE GEGENÜBER ACETALDEHYD	108
7.3.1	NMR KINETIKEN	109
7.3.2	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBREITE	112
7.4	SYNTHESE VON VALEROLACTON	116
7.5	SYNTHESE EINER $\beta$ -HYDROXYCARBONSÄURE	125
7.6	SUBSTRATBREITE VERSCHIEDENER DERA	127
<b>8</b>	<b><u>AUSBLICK</u></b>	<b><u>129</u></b>
8.1	SELEKTIVITÄTSUMKEHR	129
8.2	DERA ALS BIOKATALYSATOR	135
<b>9</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>141</u></b>
9.1	RATIONALES DESIGN ACETALDEHYD-ABHÄNGIGER ALDOLASEN	141
9.2	DERA ALS BIOKATALYSATOR IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE	146
<b>10</b>	<b><u>EXPERIMENTELLER TEIL</u></b>	<b><u>150</u></b>
10.1	GERÄTE, SOFTWARE	150
10.2	MIKROORGANISMEN, PLASMIDE & OLIGONUKLEOTIDE	151
10.3	MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN	157

## Inhaltsverzeichnis

10.3.1	MEDIEN UND LÖSUNGEN ZUR KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	157
<b>10.4</b>	<b>ENZYME</b>	<b>158</b>
<b>10.5</b>	<b>LAGERUNG UND KULTIVIERUNG DER MIKROORGANISMEN</b>	<b>158</b>
10.5.1	LAGERUNG VON <i>E. COLI</i> ZELLEN	158
10.5.2	KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i> ZELLEN	158
<b>10.6</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>159</b>
10.6.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	159
10.6.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	160
10.6.3	PLASMIDPRÄPARATION	160
10.6.4	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	160
10.6.5	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	160
10.6.6	GELELUTION	161
10.6.7	DNA AMPLIFIKATION MIT PCR	162
10.6.8	PHOSPHORYLIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN	165
10.6.9	LIGATION UND RESTRIKTIONSVERDAU	165
10.6.10	SEQUENCE AND LIGATION INDEPENDENT CLONING (SLIC)	165
10.6.11	SEQUENZIERUNG	166
10.6.12	SEQUENZ-ALIGNMENTS	166
10.6.13	ERSTELLUNG DER MUTANTEN ZUR SELEKTIVITÄTSUMKEHR	166
10.6.14	ERSTELLUNG DER MUTANTE MIT ERHÖHTER CHLORACETALDEHYDSTABILITÄT	170
10.6.15	ERSTELLUNG DER DERA <sub>RE</sub> PLASMIDE	170
<b>10.7</b>	<b>PROTEINTECHNIKEN</b>	<b>171</b>
10.7.1	ZELLAUFSCHLUSS	171
10.7.2	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	171
10.7.3	IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE	171
10.7.4	ENTSALZEN UND UMPUFFERN VON PROTEINLÖSUNGEN	172
10.7.5	SDS-PAGE	172
10.7.6	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	173
10.7.7	DERA-AKTIVITÄTSASSAY	174
10.7.8	SELEKTIVITÄTSSCREENING IN RETROALDOLRICHTUNG	175
10.7.9	SELEKTIVITÄTSSCREENING IN ALDOLRICHTUNG	176
10.7.10	ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER SUBSTRATBREITE	176
<b>10.8</b>	<b>ANALYTISCHE METHODEN</b>	<b>177</b>

## Inhaltsverzeichnis

10.8.1	CHROMATOGRAPHIE	177
10.8.2	SPEZIFISCHE DREHWERTE	178
10.8.3	SPEKTROSKOPIE	178
10.8.4	ELEMENTARANALYSE	179
10.8.5	SCHMELZPUNKTE	179
10.8.6	MASSENSPEKTROMETRIE	179
<b>10.9</b>	<b>SYNTHESEVORSCHRIFTEN</b>	<b>181</b>
10.9.1	ALLGEMEINE SYNTHESSEN	181
10.9.2	SYNTHESE DER FLUOROPHOR-GEKOPPELTEN SCREENING SUBSTRATE	182
10.9.3	SYNTHESE DER RACEMISCHEN REFERENZVERBINDUNGEN FÜR DEN SELEKTIVITÄTSASSAY IN ALDOLRICHTUNG	193
10.9.4	SYNTHESE DER ENANTIOMERENREINEN REFERENZVERBINDUNGEN FÜR DEN SELEKTIVITÄTSASSAY IN ALDOLRICHTUNG	197
10.9.5	SYNTHESE DER REFERENZSUBSTANZEN FÜR DIE GC MIT CHIRALER STATIONÄRE PHASE	216
10.9.6	DERA ANWENDUNGEN IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE	219
<b>10.10</b>	<b>ETABLIERUNG DES HPLC SCREENINGS</b>	<b>224</b>
10.10.1	DERIVATISIERUNG VERSCHIEDENER ALDEHYDE	224
10.10.2	ENZYMANSATZ UND ANSCHLIEßENDE DERIVATISIERUNG	224
10.10.3	DERIVATISIERUNG MIT PHENYLHYDRAZIN	224
<b>10.11</b>	<b>NMR UNTERSUCHUNG DER DERA-REAKTIONSPRODUKTE</b>	<b>225</b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>228</u></b>
11.1	SEQUENZEN	228
11.2	SDS-GELE	231
<b><u>12</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>235</u></b>
<b><u>13</u></b>	<b><u>FORMELREGISTER</u></b>	<b><u>253</u></b>
<b><u>14</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>257</u></b>
<b><u>15</u></b>	<b><u>ERKLÄRUNG</u></b>	<b><u>259</u></b>

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

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Aldolasen stellen eine beachtenswerte Alternative zu bekannten chemischen Aldolreaktionen dar. Die DERA ist dabei besonders interessant, da sie als einzige natürliche Aldolase einen Aldehyd als Nukleophil einsetzt und somit in der Lage ist, in einer doppelten Aldolreaktion bis zu zwei stereogene Zentren in einer Reaktion aufzubauen. Der Einsatz in der organischen Synthese ist jedoch limitiert durch das Fehlen eines stereokomplementären Enzyms sowie durch mangelnde Stabilität gegenüber Acetaldehyd.

Anhand eines *Rationalen Protein Designs* basierend auf homologen Pyruvat-abhängigen Aldolasen, wo stereokomplementäre Aldolasen bekannt sind, konnten einige Aminosäurepositionen identifiziert werden, die einen großen Einfluss auf die Stereokontrolle der DERA haben. Dazu wurde eine Bibliothek aus 53 DERA-Varianten erstellt und in einem neuen Screening in Aldolrichtung auf ihre Stereoselektivität getestet. Einige Varianten zeigten eine deutliche Änderung der Selektivität zum unnatürlichen Substrat. Dieses Konzept des homologen Graftings bietet einen Ansatzpunkt zur Aufklärung des Mechanismus der Stereoselektivität, wenn kein enantiokomplementäres Enzym vorhanden ist.

Die Erkenntnisse der Studien über die DERA sollen in der Naturstoffsynthese angewendet werden. So konnten in einer kurzen chemoenzymatischen Synthese  $\alpha,\beta$ -ungesättigte chirale Lactone bereitgestellt werden. Die Kombination der DERA mit einer Laccase macht diese kurze Sequenz besonders attraktiv. Des Weiteren wurde mit der Synthese von  $\beta$ -Hydroxycarbonsäuren ein neuer Ansatz zur Nutzung des synthetischen Potenzials der DERA entwickelt. Dieser, in nur zwei Stufen gewonnene, chirale Baustein ist in den Aglykonen der Rhamnolipide sowie vieler weiterer Naturstoffe zu finden.

**Band 25**

**ISBN 978-3-95806-197-2**