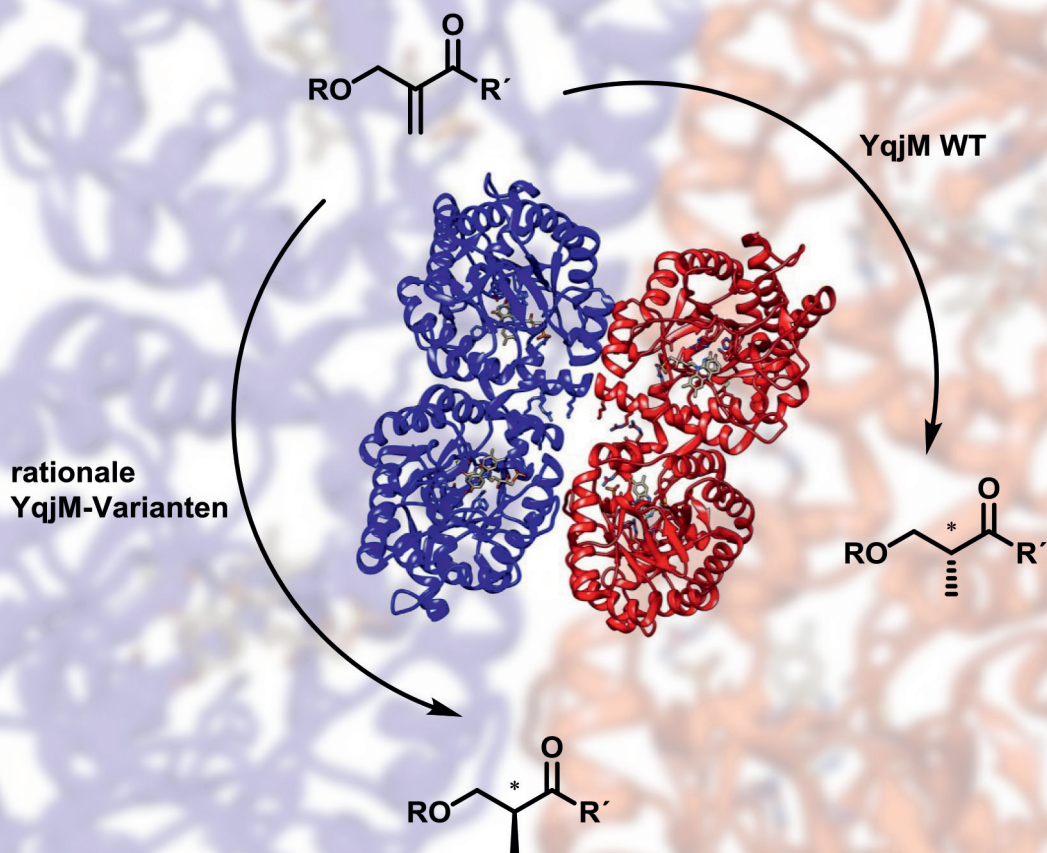


Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese

Elisabeth Rühllein



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

Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese

Elisabeth Rütthlein

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

Band 26

ISBN 978-3-95806-218-4

Inhaltsverzeichnis

1.	Vorbemerkungen und Abkürzungen.....	8
2.	Kurzzusammenfassung.....	12
3.	Abstract.....	13
4.	Einleitung.....	14
5.	Aufgabenstellung.....	15
6.	Kenntnisstand.....	17
6.1	Enreduktasen aus der Old Yellow Enzyme-Familie.....	17
6.1.1	Systematische und historische Einordnung.....	17
6.1.2	Struktur von OYEs.....	21
6.1.3	Reaktionsmechanismus von OYEs und Cofaktorrecycling.....	22
6.1.4	Die Enreduktase YqjM.....	25
6.2	Stereoselektivität in OYEs.....	28
6.2.1	Stereokomplementäre OYE-katalysierte Biorreduktionen.....	28
6.2.2	Vorarbeiten zur Beeinflussung der Stereoselektivität von YqjM.....	32
6.3	Chirale Synthesebausteine.....	35
6.3.1	Roche-Ester.....	35
6.3.2	2-Methylbutan-1,3-diol.....	37
7.	Eigene Ergebnisse.....	41
7.1	Methoden und Optimierungen zur Arbeit mit dem Enzym YqjM.....	41
7.1.1	Etablierung eines modifizierten Aktivitätstests für Enreduktasen.....	41
7.1.2	Lagerung.....	47
7.1.3	Optimierung zur Sättigung von YqjM mit dem Cofaktor FMN.....	48
7.1.4	Tests zur Nutzung des Rohextrakts und Ammoniumsulfatfällung.....	57

7.2	Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM.....	60
7.2.1	Substratdesign.....	60
7.2.2	Enzymdesign.....	68
7.2.3	Bioreduktionen im analytischen Maßstab.....	70
7.2.4	Präparative Bioreduktionen mit YqjM-Wildtyp und Varianten.....	77
7.2.5	Erweiterung des Substratspektrums.....	79
7.2.6	Vergleich mit anderen Mutagenesestudien zur Stereoselektivität von OYEs.....	82
7.2.7	Zusammenfassung und Fazit.....	83
7.3	Enzymkaskaden.....	85
7.3.1	Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (67).....	85
7.3.2	Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskade aus YqjM und Laccase.....	95
8.	Zusammenfassung und Ausblick.....	107
9.	Experimenteller Teil.....	115
9.1	Material und Methoden – molekularbiologischer Teil.....	116
9.1.1	Die Enreduktase YqjM.....	116
9.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	117
9.1.3	Erstellung der Plasmide durch Mutagenese.....	117
9.2	Material und Methoden – Proteinchemischer Teil.....	122
9.2.1	Verwendete Enzyme.....	122
9.2.2	Fermentation.....	122
9.2.3	Zellaufschluss.....	125
9.2.4	SDS-PAGE.....	126
9.2.5	Proteinreinigung.....	128
9.2.6	Aktivitätstests.....	129
9.2.7	Michaelis-Menten-Kinetik.....	133
9.2.8	Bestimmung des FMN-Gehalts von YqjM.....	133
9.2.9	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	134

9.3	Material und Methoden – chemischer Teil.....	135
9.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	138
9.3.2	Synthesevorschriften und Analytik zum Kapitel 6.2 Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM.....	140
9.3.3	Synthesevorschriften und Analytik zu Kapitel 6.3.1 ‘Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol’	183
9.3.4	Synthesevorschriften und Analytik zu Kapitel 6.3.2 ‘Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskade aus YqjM und Laccase’	193
9.4	In silico-Docking.....	206
10.	Formelregister.....	208
11.	Danksagung.....	211
12.	Literaturverzeichnis.....	212
13.	Erklärung.....	224

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

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Enreduktasen aus der Old Yellow Enzyme (OYE) Familie [EC 1.6.99.1] reduzieren C=C-Doppelbindungen und generieren dabei bis zu zwei Stereozentren in einem Reaktionsschritt. Eine breite Palette von aktivierten Alkenen kann als Substrat dienen und somit besitzt die Reaktion das Potenzial als stereoselektive, umweltverträglichere Alternative zur Metallkatalyse, vielfältigen Einsatz in der organischen Synthese zu finden.

Eine der großen Herausforderungen in der Biokatalyse ist das Vorliegen 182 mm des Katalysators und somit auch der Katalyseprodukte in nur einer enantiomeren Form. Um für die Enreduktase YqjM Varianten mit Wildtyp entgegengesetzter Stereoselektivität zu finden wurde in dieser Arbeit ein neuartiges, rationales und somit extrem effizientes Vorgehen getestet. Hierbei wurde durch Mutation einzelner Aminosäurereste die Substratbindung in der nativen Position gelockert und eine neue Bindung in geflippter Orientierung möglich gemacht. Insgesamt mussten nur 17 Enzymvarianten erstellt werden um zum Wildtyp stereokomplementäre Varianten zu finden. Die auf diese Weise in beiden enantiomeren Formen zugänglichen Produkte sind vielseitige chirale Bausteine, die in der Natur- und Wirkstoffsynthese Verwendung finden.

Daneben konnten zwei Wege zur chemoenzymatischen Synthese des breit genutzten chiralen Intermediats 2-Methylbutan-1,3-diol identifiziert werden. Diese führen zu unterschiedlicher Stereoinformation an C2-Position obwohl ein und dasselbe OYE Verwendung findet. Die Veränderung der Stereoselektivität beruht hier auf geschickter Wahl des Substrats und ist somit ein Beispiel für ein weiteres mögliches Vorgehen zur rational gesteuerten biokatalytischen Synthese von entgegengesetzten Stereozentren.

In einem weiteren Projekt konnte eine Enzymkaskade aus YqjM WT und der Laccase aus *Agaricus bisporus* zur Synthese von bestimmten arylierten Chromanonen etabliert werden.

Band 26

ISBN 978-3-95806-218-4