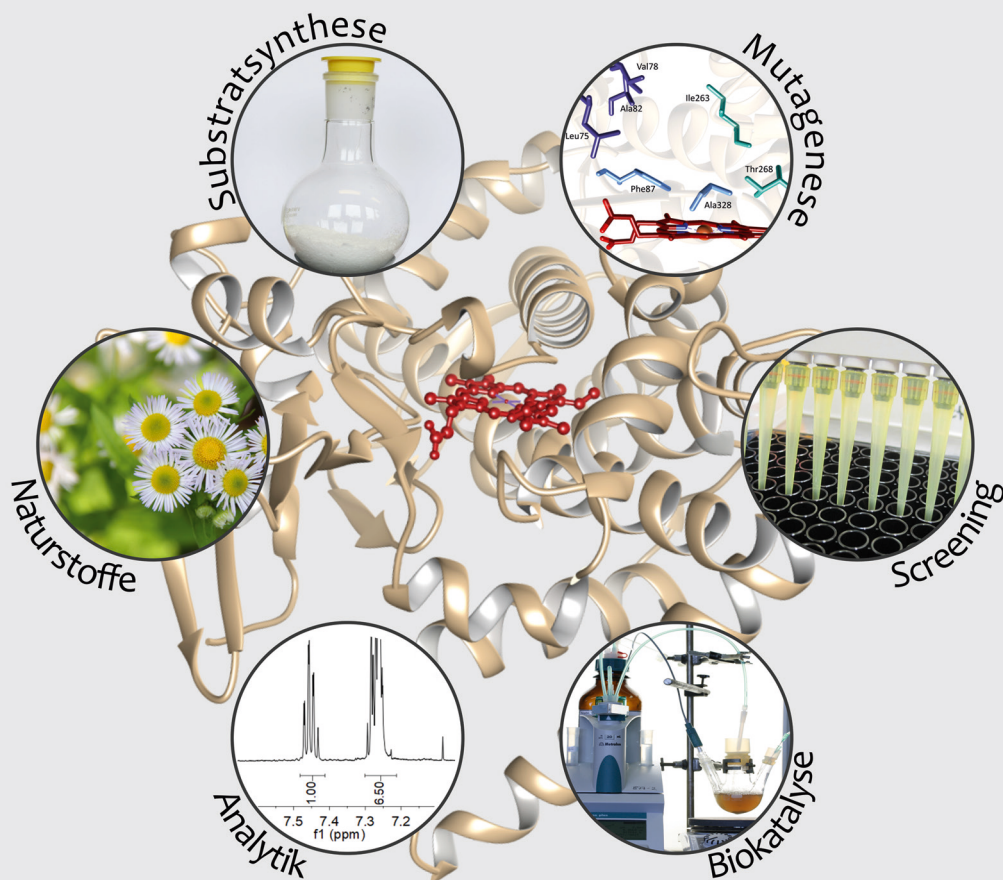


## Oxidoreduktasen als vielseitige Katalysatoren in der organischen Synthese

Claudia Holec



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

# **Oxidoreduktasen als vielseitige Katalysatoren in der organischen Synthese**

Claudia Holec

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

Band 29

---

ISBN 978-3-95806-292-4

# INHALTSVERZEICHNIS

PUBLIKATIONEN .....	5
INHALTSVERZEICHNIS .....	7
<b>1 VORBEMERKUNGEN UND ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>11</b>
<b>2 KURZZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>3 ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>4 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>5 KENNTNISSTAND.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 DIE NATUR ALS INSPIRATIONSQUELLE FÜR INNOVATION.....</b>	<b>23</b>
5.1.1 Die Enzymklasse der Oxidoreduktasen .....	24
<b>5.2 VERWENDUNG VON OXIDOREDUKTASEN ZUR SYNTHESE CHIRALER BAUSTEINE .....</b>	<b>25</b>
5.2.1 ADH-katalysierte Reduktion von Carbonylverbindungen .....	26
5.2.2 ADH-katalysierte Oxidation von sekundären Alkoholen .....	28
5.2.3 Regenerierung von oxidierten Nikotinamid-Cofaktoren .....	29
<b>5.3 CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN .....</b>	<b>33</b>
5.3.1 Generelle Aspekte .....	33
5.3.2 Klassifizierung und strukturelle Organisation von P450s.....	33
5.3.3 Der katalytische Mechanismus von Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	34
5.3.4 Die P450 BM3 Monooxygenase .....	36
<b>6 EIGENE ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>6.1 CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESE VON TRAVOPROST.....</b>	<b>51</b>
6.1.1 Einleitung und Zielsetzung .....	51
6.1.2 ADH-katalysierte oxidative Desymmetrisierung .....	52
6.1.3 Synthese des TBS-geschützten Hydroxyketons .....	55
6.1.4 Kurzzusammenfassung.....	56
<b>6.2 P450 BM3 ALS NAD(P)H-OXIDASE ZUR REGENERIERUNG OXIDIERTER   NIKOTINAMIDCOFAKTOREN.....</b>	<b>60</b>
6.2.1 Einleitung und Zielsetzung .....	60
6.2.2 OKR zur Synthese eines Homoallylalkohols mittels TbADH/P450-System.....	62
6.2.3 OKR von weiteren sekundären Alkoholen mittels ADH/P450-System .....	71
6.2.4 Oxidative Desymmetrisierung von <i>cis</i> -4-Cyclopenten-1,3-diol .....	73
6.2.5 P450 BM3 zur NAD <sup>+</sup> -Regenerierung.....	76
6.2.6 Kurzzusammenfassung.....	82

---

<b>6.3</b>	<b>CHEMOENZYMATISCHE TOTALSYNTHESE DER VORGESCHLAGENEN STRUKTUREN VON PUTAMINOXIN B UND D.....</b>	<b>83</b>
6.3.1	Einleitung und Zielsetzung .....	83
6.3.2	Synthese des Homoallylkohols .....	85
6.3.3	Synthese des Allylkohols .....	87
6.3.4	Kupplung der Fragmente A und B .....	89
6.3.5	Finale Synthesestufen auf dem Weg zu Putaminoxin B und D .....	91
6.3.6	Strukturanalyse .....	92
6.3.7	Kurzzusammenfassung.....	97
<b>6.4</b>	<b>P450 BM3-KATALYSIERTE REGIO- UND STEREOSELEKTIVE HYDROXYLIERUNG ZUR SYNTHESE VON PHTHALIDEN UND ISOCUMARINEN .....</b>	<b>98</b>
6.4.1	Einleitung und Zielsetzung .....	98
6.4.2	Benzyliche Hydroxylierungen der P450 BM3-Variante F87A L188C.....	100
6.4.3	P450 BM3-Enzymsammlungen .....	112
6.4.4	Benzyliche Hydroxylierung des 2-Ethylbenzoesäuremethylesters .....	114
6.4.5	Erweiterung der P450 BM3-Enzymsammlung.....	118
6.4.6	P450 BM3-katalysierte Synthese von Isocumarinen .....	127
6.4.7	Versuche zur P450 BM3-katalysierten Synthese substituierter Isocumarine .....	136
6.4.8	Exkurs: Untersuchung der Aminosäureaustausche I263F/T268A/T438S.....	143
6.4.9	Kurzzusammenfassung.....	147
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>149</b>
7.1	CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESE VON TRAVOPROST.....	149
7.2	NADPH-OXIDASE-AKTIVITÄT DER P450 BM3-MONOOXYGENASE .....	150
7.3	CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESE VON NONENOLIDEN .....	152
7.4	ENANTIOSELEKTIVE HYDROXYLIERUNGEN MIT P450 BM3.....	153
7.5	SCHLUSSWORT.....	157
<b>8</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>159</b>
8.1	ANWENDUNG DER NADPH-OXIDASE IN DERACEMISIERUNGEN .....	159
8.2	SYNTHETISCHE ANWENDUNG DES PEROXID-SHUNTS DER P450 BM3-MONOOXYGENASE .....	160
8.3	ERWEITERUNG DER P450 BM3-ENZYMSAMMLUNG .....	162
8.4	REGIO- UND STEREOSELEKTIVE P450 BM3-KATALYSIERTE BIOTRANSFORMATIONEN .....	163
8.5	P450 BM3 IN DER PRÄPARATIVEN SYNTHESE.....	169
<b>9</b>	<b>EXPERIMENTELLE METHODEN .....</b>	<b>173</b>
9.1	ALLGEMEINES .....	173
9.1.1	Geräte.....	173
9.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	174
9.1.3	Software .....	174
9.1.4	Chemikalien und Enzyme .....	174

---

9.1.5	Bakterienstämme .....	175
9.1.6	Plasmide .....	176
9.1.7	Oligonukleotide .....	177
<b>9.2</b>	<b>ANALYTISCHE METHODEN.....</b>	<b>179</b>
9.2.1	Chromatographische Verfahren.....	179
9.2.2	Massenspektrometrie .....	181
9.2.3	Drehwerte .....	182
9.2.4	Elementaranalysen.....	182
9.2.5	Infrarotspektroskopie.....	182
9.2.6	Schmelzpunkte .....	182
9.2.7	NMR-Spektroskopie .....	182
<b>9.3</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>183</b>
9.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	183
9.3.2	<i>DpnI</i> -Verdau .....	186
9.3.3	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	186
9.3.4	Agarosegelelektrophorese .....	187
9.3.5	Restriktion von Plasmid-DNA .....	187
9.3.6	Ligation.....	188
9.3.7	Sequenzierung.....	188
<b>9.4</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>189</b>
9.4.1	Medien und Zusätze.....	189
9.4.2	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen .....	190
9.4.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA .....	190
9.4.4	Kultivierung von <i>E. Coli</i> in Kolben.....	190
9.4.5	Heterologe Produktion in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) in Kolben .....	191
9.4.6	Kultivierung von <i>E. coli</i> in MTPs .....	191
9.4.7	Herstellung von Glycerinkulturen in MTPs.....	191
9.4.8	Produktion der P450 BM3-Bibliothek in MTPs.....	192
<b>9.5</b>	<b>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....</b>	<b>192</b>
9.5.1	Puffer.....	192
9.5.2	Herstellung zellfreier Rohextrakte .....	193
9.5.3	Proteinaufreinigung .....	194
9.5.4	Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen .....	195
9.5.5	Bestimmung der P450-Konzentration.....	196
9.5.6	SDS-PAGE.....	196
9.5.7	P450 BM3-katalysierte Biotransformationen.....	197
9.5.8	Bestimmung der Kopplungseffizienz.....	200
9.5.9	Photometrische Aktivitätsassays.....	201
9.5.10	Analytische ADH-katalysierte Biotransformationen .....	202

---

9.5.11	Bestimmung kinetischer Parameter.....	203
<b>9.6</b>	<b>P450 BM3 ALS NAD(P)H-OXIDASE.....</b>	<b>205</b>
9.6.1	Oxidative kinetische Racematspaltungen .....	205
9.6.2	RasADH-katalysierte oxidative Desymmetrisierung.....	207
9.6.3	HIADH-katalysierte Oxidation primärer Alkohole .....	208
9.6.4	Bestimmung absoluter Umsätze .....	209
<b>9.7</b>	<b>SYNTHESEN.....</b>	<b>212</b>
9.7.1	Generelle Versuchsvorschriften .....	212
9.7.2	Chemoenzymatische Synthese von Travoprost .....	215
9.7.3	P450 BM3 als NAD(P)H-Oxidase zur Regenerierung oxidierter Nikotinamidcofaktoren ...	217
9.7.4	Chemoenzymatische Totalsynthese der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D.....	222
9.7.5	P450 BM3-katalysierte regio- und stereoselektive Hydroxylierung zur Synthese von Phthaliden und Isocumarinen .....	235
9.7.6	Ezetimib.....	255
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>259</b>
<b>10.1</b>	<b>NMR-DATEN DER PUTAMINOXINE B UND D .....</b>	<b>259</b>
<b>10.2</b>	<b>DETAILLIERTE DURCHMUSTERUNGSERGEBNISSE VON P450-ENZYSAMMLUNGEN.....</b>	<b>259</b>
<b>10.3</b>	<b>P450 BM3 WT-SEQUENZEN .....</b>	<b>263</b>
10.2.1	P450 BM3-Gensequenz .....	263
10.2.2	P450 BM3-Proteinsequenz.....	264
<b>11</b>	<b>FORMELREGISTER .....</b>	<b>265</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>269</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>293</b>
<b>14</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>295</b>

Chirale Alkohole stellen wichtige Bausteine für die Synthese von Naturstoffen, Arzneimitteln oder Feinchemikalien dar. Eine Alternative zur klassischen chemischen Darstellung dieser Bausteine bietet die Anwendung von Oxidoreduktasen als Biokatalysatoren in der organischen Synthese. Prominente Vertreter dieser Klasse sind die NAD(P)H-abhängigen Alkoholdehydrogenasen (ADH) und P450 Monooxygenasen, die sich durch exzellente Chemo-, Regio- und Enantioselektivitäten auszeichnen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Potential von Alkoholdehydrogenasen und P450 BM3 Monooxygenasen als Biokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen aufgezeigt. Alkoholdehydrogenasen fanden dabei Anwendung in einer oxidativen Desymmetrisierung, asymmetrischen Reduktionen oder oxidativen kinetischen Racematspaltungen. Im Zuge dieser Biotransformationen gelang es, enantiomerenreine Bausteine (bis zu >99 % ee) bereitzustellen und im Anschluss in die Synthese von Nonenolidnaturstoffen und Prostaglandinanaloga einzubetten. Zusätzlich wurde zur Regenerierung von oxidierten Nikotinamidcofaktoren die P450 BM3 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* als neue, effiziente NAD(P)H-Oxidase in ADH-katalysierten Oxidationen von primären und sekundären Alkoholen im präparativen Maßstab etabliert. Des Weiteren konnte die P450 BM3 Monooxygenase erfolgreich für die regio- und stereoselektive Synthese von Phthaliden und Isocumarinen angewendet werden. Durch Verwendung von verschiedenen P450 BM3-Varianten gelang jeweils die Darstellung beider Enantiomere dieser Verbindungen. Diese Ergebnisse betonen das synthetische Potential von Oxidoreduktasen in der organischen Synthese und präsentieren eine Alternative zu konventionellen chemischen Methoden zur Bereitstellung chiraler Alkohole.