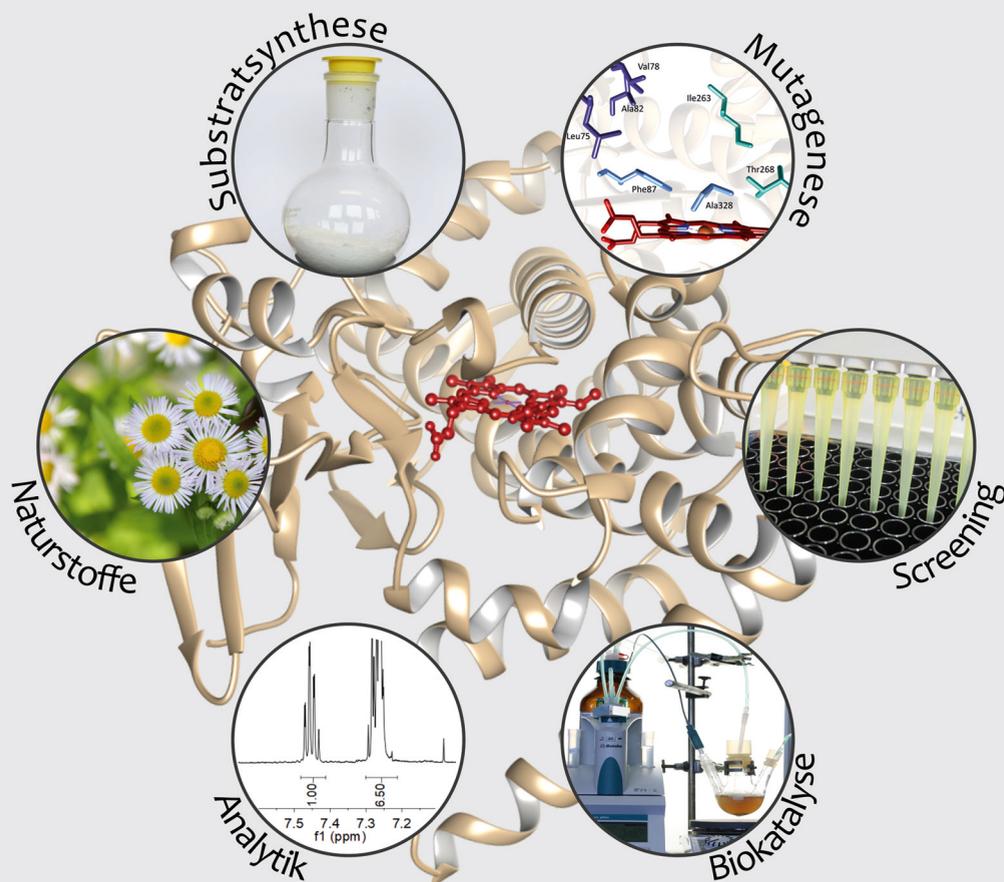


Oxidoreduktasen als vielseitige Katalysatoren in der organischen Synthese

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
1 VORBEMERKUNGEN UND ABKÜRZUNGEN	11
2 KURZZUSAMMENFASSUNG	15
3 ABSTRACT	20
4 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	19
5 KENNTNISSTAND.....	23
5.1 DIE NATUR ALS INSPIRATIONSQUELLE FÜR INNOVATION.....	23
5.1.1 Die Enzymklasse der Oxidoreduktasen	24
5.2 VERWENDUNG VON OXIDOREDUKTASEN ZUR SYNTHESE CHIRALER BAUSTEINE	25
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
5.3 CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN	33
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
6 EIGENE ERGEBNISSE	51
6.1 CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESE VON TRAVOPROST.....	51
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
6.2 P450 BM3 ALS NAD(P)H-OXIDASE ZUR REGENERIERUNG OXIDIERTER NIKOTINAMIDCOFAKTOREN.....	60
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 ⁺ -Regenerierung.....	76
6.2.6 Kurzzusammenfassung.....	82

6.3	CHEMOENZYMATISCHE TOTALSYNTHESE DER VORGESCHLAGENEN STRUKTUREN VON PUTAMINOXIN B UND D.....	83
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
6.4	P450 BM3-KATALYSIERTE REGIO- UND STEREOSELEKTIVE HYDROXYLIERUNG ZUR SYNTHESE VON PHTHALIDEN UND ISOCUMARINEN	98
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
7	ZUSAMMENFASSUNG	149
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
8	AUSBLICK	159
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
9	EXPERIMENTELLE METHODEN	173
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
9.2	ANALYTISCHE METHODEN.....	179
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
9.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	183
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
9.4	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	189
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
9.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	192
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
9.6	P450 BM3 ALS NAD(P)H-OXIDASE.....	205
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
9.7	SYNTHESEN.....	212
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
10	ANHANG	259
10.1	NMR-DATEN DER PUTAMINOXINE B UND D	259
10.2	DETAILLIERTE DURCHMUSTERUNGSERGEBNISSE VON P450-ENZYMSAMMLUNGEN.....	259
10.3	P450 BM3 WT-SEQUENZEN	263
10.2.1	P450 BM3-Gensequenz	263
10.2.2	P450 BM3-Proteinsequenz.....	264
11	FORMELREGISTER	265
12	LITERATURVERZEICHNIS	269
13	DANKSAGUNG	293
14	ERKLÄRUNG	295

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.