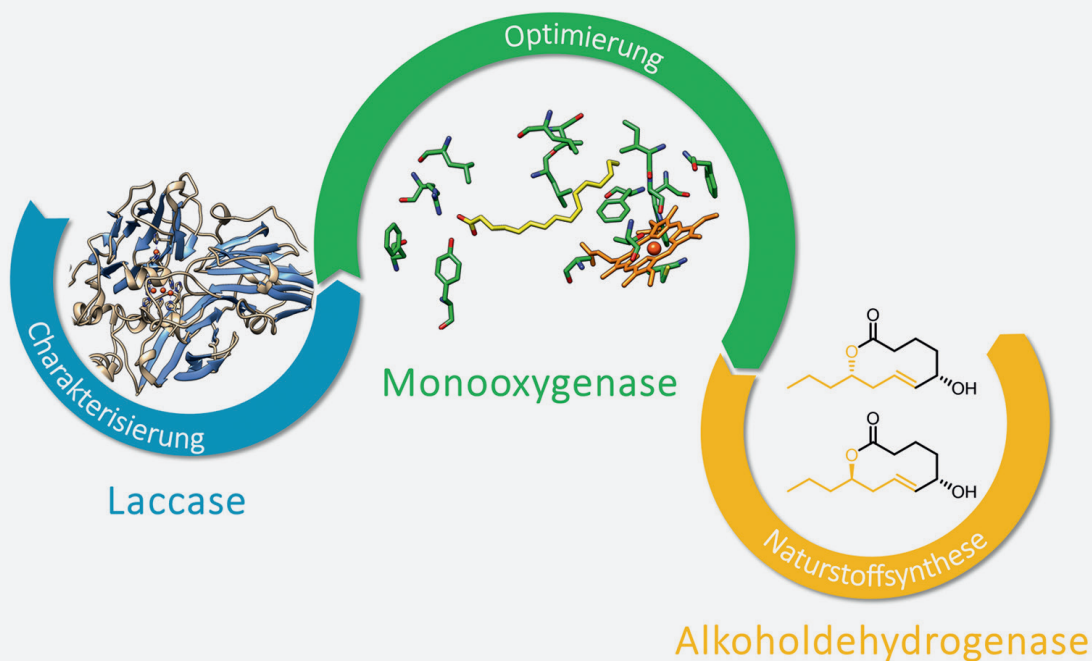


Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren bis zum fertigen Naturstoff

David Dickmann



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

Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren bis zum fertigen Naturstoff

David Dickmann

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

Band 41

ISBN 978-3-95806-573-4

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzeinleitung.....	8
1.1	Biokatalyse.....	8
1.2	Oxidoreduktasen.....	10
2	Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase.....	13
2.1	Einleitung.....	14
2.1.1	Laccasen.....	14
2.1.2	Lignane, Lignansynthese und das BioLiSy-Projekt.....	18
2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	24
2.2.1	Charakterisierung und Expression von Laccasen aus <i>R. solani</i> in <i>E. coli</i>	24
2.2.2	Ermittlung der Originalsequenz der <i>R. solani</i> F-895 Laccase.....	27
2.2.3	Expressionsversuche der <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>E. coli</i>	30
2.2.4	Expressionsversuche der <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>S. cerevisiae</i>	35
2.2.5	Versuche zur Optimierung der heterologen Expression der <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>S. cerevisiae</i>	43
2.3	Kurzzusammenfassung.....	50
2.4	Short Summary.....	52
2.5	Ausblick.....	54
3	Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3.....	57
3.1	Einleitung.....	58
3.1.1	Struktur von CYP102A1 (P450 BM3).....	59
3.1.2	Katalysezyklus von P450 BM3.....	62
3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	64
3.2.1	Allylische Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (11) mit Hilfe von P450 BM3.....	64
3.2.2	Optimierung der allylischen Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (11) mit Hilfe von P450 BM3.....	65
3.2.3	Entwicklung eines Screenings für die Detektion von vicinalen Diolen, in P450 BM3 katalysierten Reaktionen.....	70

3.2.4	Generierung einer Mutantenbibliothek für die bevorzugt α -ständige Hydroxylierung von Substraten mit polaren Substituenten	89
3.3	Kurzzusammenfassung.....	92
3.4	Short Summary	93
3.5	Ausblick.....	94
4	Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-Diastereomer [(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-37]	96
4.1	Einleitung	97
4.1.1	Totalsynthese von Nonenoliden auf Basis von intermolekularen Veresterungen und Ringschlussmetathesen.....	98
4.1.2	Totalsynthese von Nonenoliden auf Basis von Kupplungsreaktionen und anschließender Makrolaktonisierung	101
4.1.3	Vergleich der Strukturdaten von isolierten und synthetisierten Nonenoliden	103
4.1.4	Erste Versuche zur chemoenzymatischen Synthese von Putaminoxin (37) und seinen Analoga	106
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	108
4.2.1	Chemoenzymatische Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-Diastereomer [(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-37]	108
4.2.2	Vergleich der Strukturdaten der neu synthetisierten Nonenolide und Strukturvorschlag für das phytotoxische Nonenolid Putaminoxin (5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i>)-37.....	112
4.3	Kurzzusammenfassung.....	116
4.4	Short Summary	117
4.5	Ausblick.....	118
5	Material und Methoden	119
5.1	Geräte	119
5.2	Software.....	120
5.3	Chemikalien und Lösungsmittel.....	121
5.4	Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten	121
5.4.1	Verwendete Medien und Puffer.....	121
5.4.2	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für Flüssigkulturen	123
5.4.3	Allgemeine Anzucht auf Agarplatten	123
5.4.4	Verwendete Stämme.....	124

5.4.5	Verwendete Plasmide	124
5.4.6	Verwendete Primer	127
5.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	131
5.4.8	Klassische PCR	132
5.4.9	<i>QuikChange</i> TM PCR	132
5.4.10	<i>DpnI</i> -Verdau	134
5.4.11	Agarose-Gelelektrophorese	134
5.4.12	Restriktion von DNA-Molekülen	134
5.4.13	Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA	135
5.4.14	Ligation von DNA-Fragmenten	135
5.4.15	Subklonierung	136
5.4.16	Sequenzierung	136
5.4.17	Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	136
5.4.18	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	137
5.4.19	Isolation genomischer DNA aus <i>R. solani</i> F-895	137
5.4.20	Sequenzierung genomischer DNA von <i>R. solani</i> F-895	137
5.4.21	Isolation der RNA von <i>R. solani</i> F-895	138
5.4.22	Sequenzierung des Transkriptoms von <i>R. solani</i> F-895	140
5.4.23	Erzeugung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	140
5.4.24	Erzeugung und Transformation chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	141
5.4.25	Verwendete Enzyme	143
5.4.26	Eigenhändige Produktion von Enzymen in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	144
5.4.27	Produktion von <i>R. solani</i> Laccasen in <i>E. coli</i>	145
5.4.28	Produktion von <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>S. cerevisiae</i>	146
5.4.29	Produktion von FDH* in <i>E. coli</i>	146
5.4.30	Produktion von PTDH in <i>E. coli</i>	146
5.4.31	Produktion von P450 BM3 in <i>E. coli</i>	146
5.4.32	Herstellung von zellfreien Rohlysaten von <i>E. coli</i>	147
5.4.33	Proteinaufreinigung	148
5.4.34	Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	149

5.4.35	Deglykosilierung von Proteinen	150
5.4.36	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	150
5.4.37	Untersuchung von Proteinen mit MALDI-TOF	151
5.4.38	Western-Blot	152
5.4.39	Bestimmung von Enzymaktivitäten mit photometrischen Assays	152
5.4.40	Bestimmung der P450-Monooxygenase Konzentration.....	155
5.4.41	Biokatalytische Umsetzungen mit der P450 BM3 Monooxygenase	155
5.4.42	Biokatalytische Umsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen	159
5.5	Chemische Arbeiten	160
5.5.1	Allgemeine Geräte und Methoden.....	160
5.5.2	Chemische und biochemische Synthesen von Verbindungen	163
6	Abkürzungsverzeichnis	187
7	Formelregister	189
8	Anhang	191
8.1	Vektorkarten und Sequenzen.....	195
8.1.1	Vektorkarten	195
8.1.2	Sequenzen.....	199
8.2	SDS-Gele.....	231
8.3	NMR-Spektren	232
8.4	NMR-Vergleich publizierter Nonenolide.....	252
9	Literaturverzeichnis.....	257
10	Danksagung.....	272
11	Erklärung.....	274

Das vielfältige Leben auf unserem Planeten, in dem Variantenreichtum wie wir es kennen, ist nur möglich, weil hochspezialisierte Enzyme eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen katalysieren, ohne die es jene Moleküle, welche uns das Leben ermöglichen erst gar nicht geben würde. Das zugrundeliegende Prinzip ist dabei bis heute unverändert geblieben. Ausgehend von genetischer Information werden Enzyme synthetisiert, welche unter dem Einfluss der Evolution immer besser an alte und neue Anforderungen angepasst werden. Diesen Prozess können wir uns zu Nutze machen, in dem wir noch unbekannte Enzyme mit interessanten Eigenschaften entdecken und charakterisieren, bekannte Enzyme gezielt optimieren und mit ihrer Hilfe simple Moleküle oder gar komplexe Naturstoffe synthetisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der gesamte Prozess am Beispiel von drei unterschiedlichen Enzymen aus der Enzymklasse der Oxidoreduktasen vollzogen. Im ersten Teil wurde die Sequenz einer noch wenig erforschten Laccase aus dem Pilz *Rhizoctonia solani* erstmalig bestimmt, welche ein für pilzliche Laccasen ungewöhnliches Aktivitätsmuster in Abhängigkeit vom pH-Wert aufweist. Im zweiten Teil wurde sich der Optimierung einer Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* gewidmet, um die selektive Umsetzung von allylischen Alkoholen zu ermöglichen. Im dritten und finalen Teil wurde sich einer Alkoholdehydrogenase bedient, um ein phytotoxisches Makrolakton und sein Diastereomer zu synthetisieren und zur Strukturaufklärung dieser Naturstoffe beizutragen. Auf diese Weise begleitet Sie diese Arbeit die gesamte Reise von der genetischen Information, bis hin zum fertigen Naturstoff.