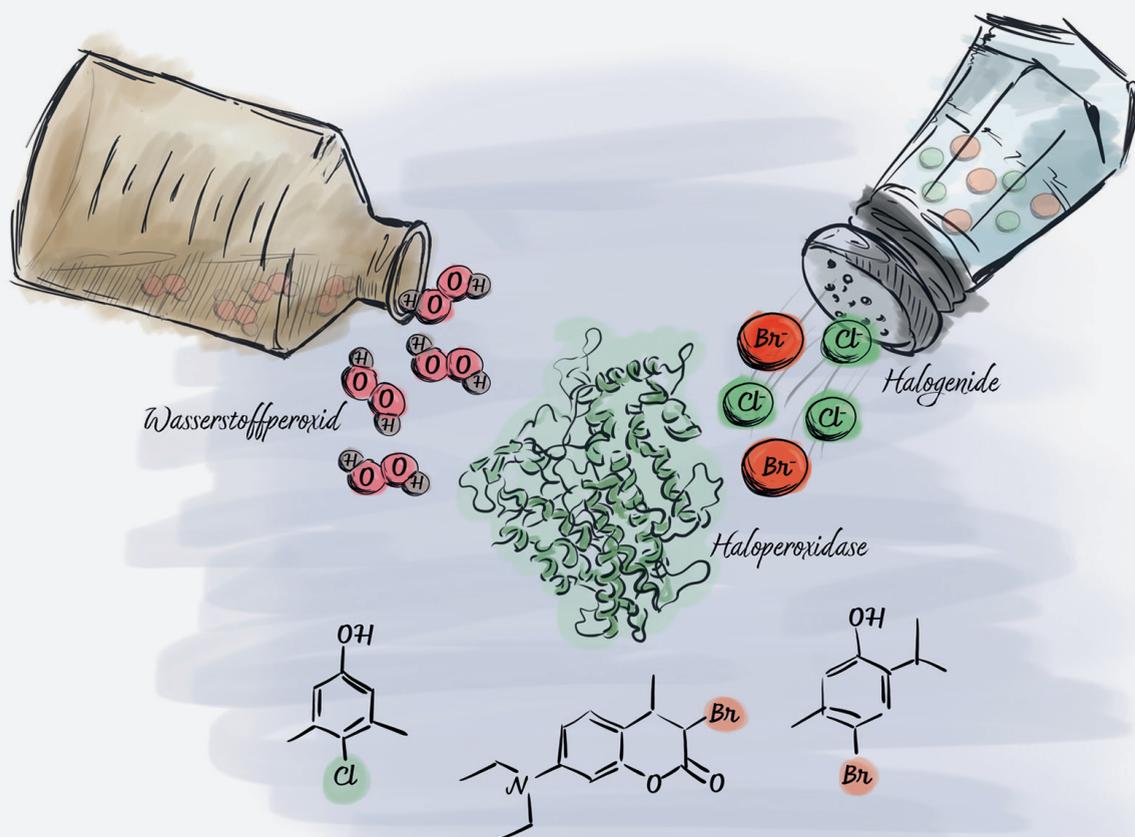


Untersuchungen zu enzymatischen Halogenierungsreaktionen in der organischen Synthese

Alexander Veljko Fejzagić



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

Untersuchungen zu enzymatischen Halogenierungsreaktionen in der organischen Synthese

Alexander Veljko Fejzagić

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

Band 46

ISBN 978-3-95806-728-8

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|------|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 2 | Zusammenfassung | VIII |
| 3 | Abstract..... | X |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Anforderungen an die moderne Synthesechemie | 1 |
| 1.1.1 | Herausforderungen des 21. Jahrhunderts | 1 |
| 1.1.2 | Biotransformationen als „grüne“ Alternative zur klassischen Chemie? | 2 |
| 1.1.3 | Zielsetzung | 3 |
| 2 | Kenntnisstand | 4 |
| 2.1 | Chemie im Wandel | 4 |
| 2.1.1 | Natur- und Wirkstoffe | 4 |
| 2.1.2 | Halogene – Bausteine in der Wirkstoffentwicklung | 5 |
| 2.2 | Halogene – Eigenschaften und Anwendung..... | 7 |
| 2.2.1 | Stereoelektronische Eigenschaften von Halogenen..... | 7 |
| 2.2.2 | Die Rolle verschiedener Halogene in der Wirkstoffforschung | 8 |
| 2.2.3 | Nutzung von Halogenen in der Synthesechemie | 10 |
| 2.2.4 | Energie- und Ressourceneffizienz chemischer Halogenierungen..... | 14 |
| 2.3 | Halogenierende Enzyme als Biokatalysatoren | 17 |
| 2.3.1 | Biokatalyse – die biologische Revolution in der Chemie..... | 17 |
| 2.3.2 | Halogenierende Enzyme..... | 18 |
| 2.3.3 | Flavinabhängige Halogenasen..... | 20 |
| 2.3.4 | α -Ketoglutaratabhängige Halogenasen..... | 24 |
| 2.3.5 | SAM-abhängige Halogenasen | 26 |
| 2.4 | Haloperoxidasen..... | 29 |
| 2.4.1 | Häm-eisenabhängige Haloperoxidasen | 29 |
| 2.4.2 | Vanadiumabhängige Haloperoxidasen | 31 |
| 2.4.3 | Metallfreie Haloperoxidasen / Perhydrolasen | 36 |
| 2.4.4 | Nachweis von Haloperoxidasen..... | 37 |
| 2.4.5 | Anwendung von Haloperoxidasen als Biokatalysatoren | 38 |
| 2.5 | (Kontinuierliche) Durchflusschemie – <i>flow chemistry</i> | 41 |
| 2.5.1 | Prinzip der Durchflusschemie | 41 |
| 2.5.2 | Immobilisierung von (Bio-)Katalysatoren | 42 |
| 2.5.3 | Anwendung von Biokatalysatoren im Durchfluss | 45 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion..... | 48 |
| 3.1 | Homologe Produktion von CPO aus <i>Caldariomyces fumago</i> | 48 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.1.1 | Expression und Kultivierung..... | 48 |
| 3.1.2 | Isolation und Aktivitätsbestimmung | 51 |
| 3.1.3 | Temperatur- und Lösungsmittelstabilität | 52 |
| 3.2 | Etablierung eines Produktionsprotokolls für vanadiumabhängige | |
| | Haloperoxidasen in <i>E. coli</i> | 55 |
| 3.2.1 | Expressionsanalyse | 55 |
| 3.2.2 | Optimierung der Löslichkeit der HPO-Enzyme..... | 58 |
| 3.2.3 | Isolation und Reinigung der Haloperoxidase aus <i>C. inaequalis</i> | 62 |
| 3.3 | Etablierung eines fluoreszenzbasierten Assaysystems für Haloperoxidasen .. | 65 |
| 3.3.1 | Evaluation des Dimedon-Assays..... | 65 |
| 3.3.2 | Etablierung eines kolorimetrischen Assays für Haloperoxidasen..... | 67 |
| 3.3.3 | Etablierung eines fluorimetrischen Assays für Haloperoxidasen..... | 68 |
| 3.3.4 | Evaluation des entwickelten MeDAC-Assays..... | 77 |
| 3.4 | Biochemische Charakterisierung der Haloperoxidase aus <i>C. inaequalis</i> | 79 |
| 3.4.1 | Aktivitätsbestimmung von $V_{Cl}PO-Ci$ | 79 |
| 3.4.2 | 2D-Michaelis-Menten-Kinetik | 80 |
| 3.4.3 | Stabilität gegenüber Temperatur und Lösungsmitteln..... | 84 |
| 3.4.4 | Halogenidselektivität von $V_{Cl}PO-Ci$ | 88 |
| 3.5 | Identifizierung und Charakterisierung neuer Haloperoxidasen | 89 |
| 3.5.1 | Bioinformatische Suche nach neuen Haloperoxidase-Genen | 89 |
| 3.5.2 | Putative V-HPO aus <i>L. pratensis</i> | 92 |
| 3.5.3 | Putative V-HPO aus <i>R. roseus</i> | 96 |
| 3.6 | Etablierung eines Testreaktionssystems für HPOs..... | 101 |
| 3.6.1 | 2,6-Dimethylphenol (51) als Testreaktionssystem..... | 101 |
| 3.6.2 | Thymol (56) als Testreaktionssystem..... | 110 |
| 3.6.3 | HPO-vermittelte O-Methylierung von Thymol..... | 114 |
| 3.7 | Modifikation der Regioselektivität von $V_{Cl}PO-Ci$ | 121 |
| 3.7.1 | Molekulare docking-Studie zur Suche nach Substratbindetaschen | |
| | in $V_{Cl}PO-Ci$ | 121 |
| 3.7.2 | Mutagenese von $V_{Cl}PO-Ci$ zur Änderung der Regioselektivität..... | 123 |
| 3.8 | Vergleich der enzymatischen und chemischen Halogenierung | 129 |
| 4 | Ausblick..... | 134 |
| 4.1 | Schlussfolgerung | 134 |
| 4.2 | Selektivität von Haloperoxidasen..... | 134 |
| 4.2.1 | Rationales Design | 134 |
| 4.2.2 | Charakterisierung neuer Haloperoxidasen | 136 |
| 4.2.3 | $V_{Cl}PO-Ci$ als chassis für neue Redox-Enzyme..... | 137 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3 | Haloperoxidasen als synthetische Werkzeuge | 139 |
| 4.3.1 | Halogenierungen im batch | 139 |
| 4.3.2 | Etablierung von Haloperoxidasen für die (kontinuierliche) Durchflussschemie | 141 |
| 4.3.3 | Immobilisierung von $V_{Cl}PO-Ci$ | 141 |
| 4.3.4 | Optimierung immobilisierter $V_{Cl}PO-Ci$ für die Durchflussschemie | 147 |
| 4.3.5 | Kombination von Haloperoxidasen mit weiteren Systemen im <i>flow</i> | 150 |
| 5 | Experimentalteil | 155 |
| 5.1 | Allgemeines | 155 |
| 5.1.1 | Geräte | 155 |
| 5.1.2 | Software | 158 |
| 5.1.3 | Verbrauchsmaterialien | 159 |
| 5.1.4 | Chemikalien | 159 |
| 5.1.5 | Enzyme | 159 |
| 5.1.6 | Plasmide und Oligonukleotide | 160 |
| 5.1.7 | Mikroorganismen | 162 |
| 5.2 | Molekularbiologische Methoden | 163 |
| 5.2.1 | Primerdesign | 163 |
| 5.2.2 | Klassische PCR | 163 |
| 5.2.3 | Kolonie-PCR | 164 |
| 5.2.4 | Test-PCR | 164 |
| 5.2.5 | QuikChange [®] -PCR | 164 |
| 5.2.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 165 |
| 5.2.7 | Isolation von Plasmid-DNA | 165 |
| 5.2.8 | Restriktionsverdau und Ligation | 165 |
| 5.2.9 | Geleluatung und PCR-Reinigung | 166 |
| 5.2.10 | Gibson Assembly [®] | 166 |
| 5.2.11 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 167 |
| 5.2.12 | DNA-Sequenzierung | 167 |
| 5.3 | Mikrobiologische Methoden | 168 |
| 5.3.1 | Medien | 168 |
| 5.3.2 | Antibiotika- und weitere Stammlösungen zur Kultivierung | 170 |
| 5.3.3 | Herstellung chemisch kompetenter Zellen | 170 |
| 5.3.4 | Hitzeschocktransformation kompetenter Zellen | 171 |
| 5.3.5 | Vorkulturen | 171 |
| 5.3.6 | Herstellung von Glycerinkulturen zur langfristigen Stammlagerung | 171 |
| 5.3.7 | Kultivierung für Expressionsanalysen | 172 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.3.8 | Kultivierung für Proteinisolation in <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3) | 172 |
| 5.4 | Proteinbiochemische Methoden..... | 173 |
| 5.4.1 | Zellaufschluss | 173 |
| 5.4.2 | Proteinisolation mittels IMAC | 173 |
| 5.4.3 | Entsalzung, Dialyse und Konzentration von Proteinlösungen | 174 |
| 5.4.4 | Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen | 175 |
| 5.4.5 | SDS-PAGE..... | 175 |
| 5.4.6 | Aktivitätsbestimmung von Haloperoxidasen..... | 177 |
| 5.4.7 | Michaelis-Menten-Kinetik | 177 |
| 5.5 | Bioinformatische Methoden | 179 |
| 5.5.1 | Sequenzalignment | 179 |
| 5.5.2 | Docking-Studien..... | 179 |
| 5.5.3 | In silico Mutagenese | 180 |
| 5.6 | Chemische Methoden..... | 182 |
| 5.6.1 | Lösungsmittel..... | 182 |
| 5.6.2 | Reaktionskontrollen und (präparative) Chromatographie..... | 182 |
| 5.6.3 | Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)..... | 182 |
| 5.6.4 | NMR-Spektroskopie | 183 |
| 5.6.5 | HPLC-Messungen..... | 183 |
| 5.6.6 | Synthese von 3-Brom-4-methyl-7-diethylaminocumarin 50 | 183 |
| 5.6.7 | Synthese von bromierten und chlorierten Thymolderivaten | 184 |
| 5.7 | Spezieller Experimentalteil | 185 |
| 5.7.1 | Fluoreszenzmessungen | 185 |
| 5.7.2 | Etablierung eines Konzentrationsrechners für MeDAC 49 und BrMeDAC 50 | 185 |
| 5.7.3 | Bestimmung der Nachweisgrenzen des MeDAC-Assays..... | 186 |
| 5.7.4 | Kalibrierung von DMP (51) via GC-MS | 187 |
| 5.7.5 | Kalibrierung von Thymol (56) via GC-MS..... | 188 |
| 5.7.6 | Bestimmung des E ⁺ -Faktors..... | 189 |
| 5.7.7 | Experimente im kontinuierlichen Durchfluss/flow chemistry..... | 190 |
| 5.7.8 | Immobilisierung von V _{Cl} PO-Ci..... | 190 |
| 5.7.9 | Design of Experiment..... | 191 |
| 5.7.10 | Kultivierung von <i>C. fumago</i> | 192 |
| 5.7.11 | Ethanol-fällung und Isolation von CPO-Cf..... | 193 |
| 5.7.12 | Expressionsstudien von Haloperoxidasen | 194 |
| 5.7.13 | Expressionsstudien von Haloperoxidasen als inclusion body Test | 195 |
| 5.7.14 | Aktivitätsbestimmung von Lysaten mit dem DAC-Assay..... | 196 |
| 5.7.15 | Resorufin als alternatives Assaysystem..... | 197 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.7.16 | Aktivitätsnachweis von VPO- <i>Lp</i> mit dem MeDAC-Assay | 197 |
| 5.7.17 | Aktivitätsnachweis neuer Haloperoxidasen mit dem MeDAC-Assay..... | 198 |
| 5.7.18 | Einfluss von CTAB in der HPO-vermittelten Umsetzung von..... Thymol (56)..... | 199 |
| 5.7.19 | Kultivierung von Mutanten von V _{Cl} PO- <i>Ci</i> | 201 |
| 5.7.20 | Dimedon-Assay..... | 201 |
| 5.7.21 | Kalibrierfunktionen für den MeDAC-Assay..... | 202 |
| 5.7.22 | Nachweis von Chlorierung im MeDAC-Assay | 205 |
| 5.7.23 | NMR-Spektrum der Umsetzung von Hydrozimtaldehyd (75) mit | |
| | V _{Cl} PO- <i>Ci</i> | 207 |
| 6 | Anhang..... | 208 |
| 6.1 | Vektorkarten | 208 |
| 6.2 | Bioinformatische Suche nach neuen Haloperoxidasen | 228 |
| 6.3 | NMR-Spektren..... | 229 |
| 6.4 | GC-MS-Spektren | 234 |
| 6.5 | Eigenanteil an Publikationen | 238 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 240 |
| 8 | Danksagung..... | 261 |
| 9 | Erklärung..... | 264 |

Halogenierungen spielen eine wichtige Rolle in der Modifikation und Synthese von Natur- und Wirkstoffen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten halogenierende Enzyme als Biokatalysatoren für die Anwendung im *batch* und kontinuierlichen Durchfluss charakterisiert und etabliert werden. Der Fokus lag dabei auf der Enzymfamilie der Haloperoxidasen, die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Halogeniden Halogenierung aromatischer und elektronenreicher Substrate katalysieren.

Im Verlauf der Arbeit wurde der Fokus auf vanadiumabhängige Haloperoxidasen gelenkt. Hier konnte ein heterologes Kultivierungsprotokoll in *Escherichia coli* etabliert werden, das mit Hilfe einer optimierten Isolationsstrategie lösliches Protein lieferte. Mit der so isolierten literaturbekannten Vanadium-Haloperoxidase aus *Curvularia inaequalis* wurde ein alternativer Fluoreszenzbasierter Aktivitätsassay entwickelt, der die simultane Abnahme des Startmaterials und Zunahme des Produkts dokumentiert und damit eine genaue Quantifizierung von Haloperoxidase-Aktivität erlaubt. Mit Hilfe dieses Systems konnte erstmalig eine zweidimensionale Fließgleichgewichtskinetik einer vanadiumabhängigen Haloperoxidase beschrieben werden.

Mit Hilfe des Assays wurde anschließend verschiedene Eigenschaften des Enzyms untersucht und die Methoden für neue, putative Enzyme angewandt. Dabei konnten zwei Haloperoxidasen bakteriellen Ursprungs aus *Luteitalea pratensis* und *Rhodoplanes roseus* als vanadiumabhängige Haloperoxidasen identifiziert werden. Nach kinetischen Untersuchungen konnte das Enzym aus *R. roseus* eine 100-fach höhere Umsatzzahl bei geringerer Inhibition durch Bromid aufweisen und zeigte eine ähnliche Stabilität wie das Homolog aus *C. inaequalis*. Mit Hilfe eines Immobilisierungsprotokolls über kovalente Trägermaterialien konnten erfolgreich erste Umsätze mit der Haloperoxidase aus *C. inaequalis* im Durchfluss dokumentiert und ein geeigneter Betriebsmodus etabliert werden.