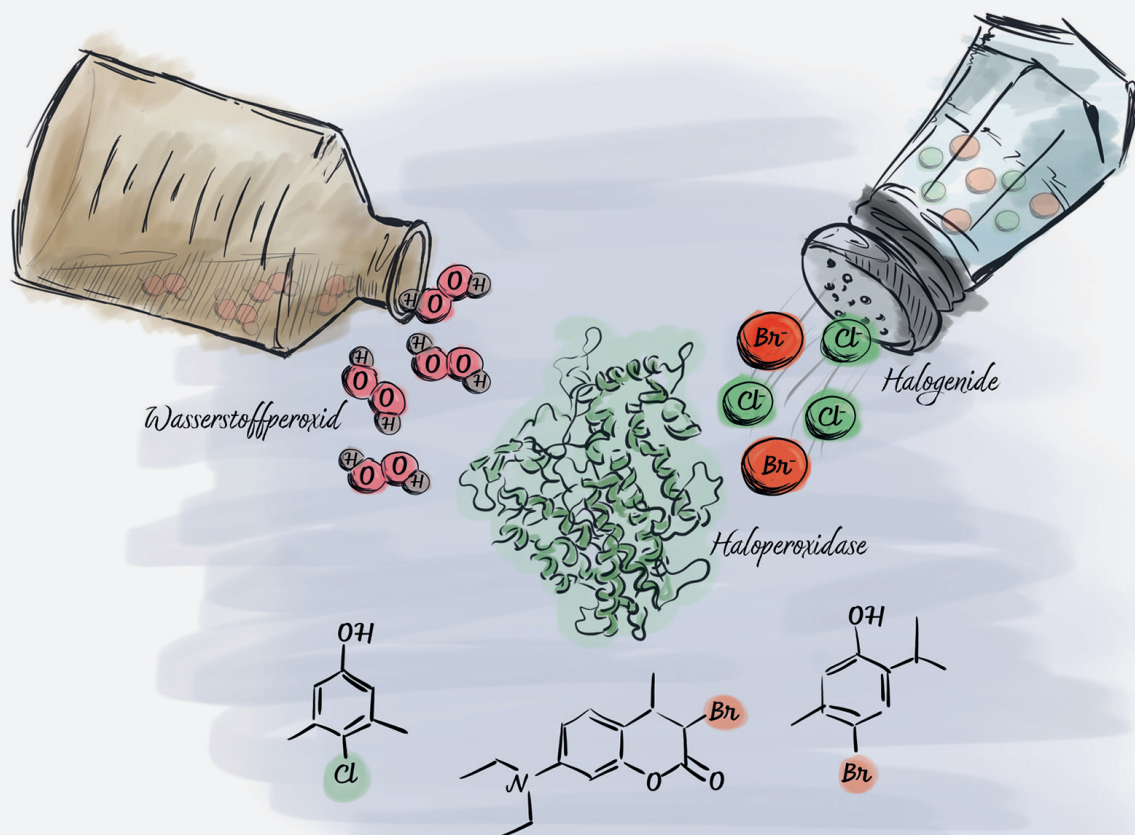


Untersuchungen zu enzymatischen Halogenierungsreaktionen in der organischen Synthese

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 Experimenterteil	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 Fluoreszenz-basierter 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.