

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeines und Abkürzungen	13
1.1	Die Gensonne	15
2	Kurzzusammenfassung	17
3	Summary	19
3.1	Introduction and Objectives.....	19
3.2	Results	19
4	Einleitung und Zielsetzung	33
4.1	Einleitung	33
4.2	Zielsetzung der Arbeit	34
5	Kenntnisstand	37
5.1	Enreduktasen.....	37
5.1.1	Allgemeines und katalytischer Mechanismus	37
5.1.2	Das Substratspektrum der Enreduktasen.....	39
5.1.3	Übersicht: Substratspektren isolierter Vertreter der OYE Familie.....	39
5.1.4	Die Enreduktase YqjM	43
5.2	Die gerichtete Evolution von Enzymen.....	48
5.2.1	Zufallsmutagenese	48
5.2.2	Gerichtete Mutagenese.....	49
5.2.3	Beispiele zur gerichteten Mutagenese von Enreduktasen	52
5.3	Cofaktor-Recycling-Systeme	56
5.3.1	Recycling reduzierter Nicotinamid-Cofaktoren	56
5.3.2	Recycling oxidierter Nicotinamid-Cofaktoren	58
5.3.3	Cofaktor-Recycling durch Mediatoren	59
5.3.4	Photochemisches Cofaktor-Recycling	61
5.4	Profene	62
5.4.1	Allgemeines.....	62
5.4.2	Stereoselektive chemische Methoden zur Synthese von Profenen.....	64
5.4.2.1	Carbonylierung von Alkenen - Hydroxycarbonylierung	64
5.4.2.2	Carbonylierung von Alkenen - Alkoxy-carbonylierung.....	65
5.4.2.3	Carbonylierung von Alkinen.....	66
5.4.2.4	Asymmetrische Hydrierung mittels Übergangsmetallkatalyse	67
5.4.3	Stereoselektive chemoenzymatische Methoden zur Synthese von Profenen.....	69

Inhaltsverzeichnis

5.4.3.1	Kinetische Racematspaltung durch Hydrolasen/ Esterasen, Nitrilasen und Oxidasen	69
5.4.3.2	Dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR)	70
5.4.3.3	Umsetzung prochiraler Vorstufen durch enzymatische Decarboxylierung.	72
5.4.3.4	Isomerisierung durch eine Styrenoxid-Isomerase	74
5.4.3.5	Nicht-enantioselektive biokatalytische Anwendungen	74
6	Eigene Ergebnisse	77
6.1	Die Generierung der Enreduktase YqjM.....	77
6.2	Die gerichtete Mutagenese des Wildtyps YqjM	80
6.2.1	Die <i>QuikChange</i> [®] PCR.....	82
6.2.2	Aktivitätsassay.....	86
6.3	Substrate und Referenzen.....	88
6.3.1	Zugang zu den Substraten mittels Carbonylierung.....	88
6.3.2	Synthesen der 2-Arylessigsäuremethylester	90
6.3.3	Synthesen zum 2-(4-iso-Butylphenyl)essigsäuremethylester (4).....	91
6.3.4	Synthesen der 2-Arylacrylsäuremethylester – <i>Knoevenagel</i> -Kondensation... ..	93
6.3.5	Synthesen zum 2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)acrylsäuremethylester (9)....	94
6.3.6	Synthese der Roche Ester Vorstufe 12	96
6.3.7	Synthesen der Referenzsubstanzen	98
6.4	Versuche zum Fluoreszenz-Screening	101
6.4.1	Synthesen zu Umbelliferylether-basierten Screening-Substraten.....	101
6.4.2	Vorbereitende Versuche zum Fluoreszenz-Screening.....	106
6.4.3	Die Enreduktasen im Fluoreszenz-Screening.....	111
6.5	Die Bioreduktionen mit dem Wildtyp YqjM.....	112
6.5.1	Experimente zur Optimierung.....	112
6.5.2	Die Bioreduktionen mit YqjM im semi-präparativen Maßstab	116
6.5.3	Die Bioreduktionen mit YqjM im präparativen Maßstab.....	118
6.5.4	Synthese des (<i>R</i>)-2-(2-Fluorbiphenyl-4-yl)propionsäuremethylesters (2)..	120
6.6	Die Bioreduktionen mit WT YqjM, den Varianten und OYE.....	123
6.6.1	Diskussion der Ergebnisse der Bioreduktionen im analytischen Maßstab ...	137
7	Ausblick	139
8	Zusammenfassung	141
9	Experimenteller Teil	155
9.1	Material und Methoden – Biologischer Teil	155
9.1.1	Geräte	155

Inhaltsverzeichnis

9.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	157
9.1.3	Chemikalien und Enzyme.....	157
9.1.4	Pufferlösungen.....	157
9.1.5	Stammlösungen von Ampicillin und IPTG.....	158
9.1.6	Nährmedien.....	158
9.1.7	Verwendete Bakterienstämme.....	158
9.1.8	DNA Sequenzierungen.....	159
9.2	Gerichtete Mutagenese der Enreduktase YqjM.....	160
9.2.1	Oligonucleotide.....	160
9.2.2	Polymerasekettenreaktion.....	161
9.2.2.1	Pipettierschema des PCR-Ansatzes für die <i>QuikChange</i> [®] PCR (50 µl)....	161
9.2.2.2	PCR-Programme für die <i>QuikChange</i> [®] PCR.....	162
9.2.3	<i>DpnI</i> -Verdau.....	162
9.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	163
9.2.5	Protokoll für die Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	163
9.2.5.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	163
9.2.5.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	164
9.2.6	Herstellung von Übernachtskulturen.....	164
9.2.7	DNA-Präparation aus den Übernachtskulturen.....	164
9.2.8	Anzucht der Hauptkulturen zur Proteinexpression.....	165
9.2.9	Zellaufschluss.....	165
9.2.10	Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie.....	165
9.2.11	Aktivitätsassay.....	166
9.3	Material und Methoden - Chemischer Teil.....	167
9.4	Synthesen der substituierten Arylessigsäuremethylester.....	171
9.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur säurekatalysierten Veresterung.....	171
9.5	Synthesen zum 2-(4- <i>iso</i> -Butylphenyl)essigsäuremethylester (4).....	177
9.5.1	<i>Friedel-Crafts</i> -Acylierung von Isobutylbenzol (5) zu 1-(4- <i>iso</i> - Butylphenyl)ethanon (6).....	177
9.5.2	Synthese des 2-(4- <i>iso</i> -Butylphenyl)essigsäuremethylesters (4).....	178
9.6	Synthesen der 2-Arylacrylsäuremethylester.....	179
9.6.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur <i>Knoevenagel</i> -Kondensation.....	179
9.7	Synthesen zum 2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)acrylsäuremethylester (9).....	189
9.7.1	2-Hydroxy-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propionsäuremethylester (11).....	189
9.7.2	2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)acrylsäuremethylester (9).....	190
9.8	Synthese der Roche Ester Vorstufe 12	192
9.9	Synthesen der Referenzsubstanzen.....	193
9.10	Synthese des (<i>R</i>)-2-(2-Fluorbiphenyl-4-yl)propionsäuremethylesters [(<i>R</i>)- 2]	206

Inhaltsverzeichnis

9.11	Synthesen zu den Ausgangssubstanzen für eine Carbonylierungsreaktion	210
9.12	Synthesen zum Umbelliferylether-basierten Screening-Substrat 25	215
9.13	Versuche zum Fluoreszenz-Screening	219
9.14	Bioreduktionen	222
9.14.1	Experimente zur Optimierung	222
9.14.2	Semi-präparativer Maßstab	225
9.14.3	Analytischer Maßstab	226
9.14.4	Präparativer Maßstab	227
10	Ergebnisse der Sequenzierungen	229
11	Literaturverzeichnis.....	235
12	Danksagung	255
13	Erklärung	257
14	Formelregister	259