

Enantioselektive allylische Hydroxylierung von ω -Alkensäuren und -estern mittels der P450-BM3-Monooxygenase**

Katharina Neufeld, Birgit Henßen und Jörg Pietruszka*

Abstract: Chirale Allylalkohole der ω -Alkensäuren und entsprechende Derivate sind essentielle Bausteine für die Synthese biologisch aktiver Verbindungen. Die direkte enantioselektive C-H-Oxidation von linearen terminalen Olefinen ermöglicht den effizientesten Zugang zu diesen Strukturen. Synthetische Methoden für diese Umsetzungen stehen jedoch nur begrenzt zur Verfügung und liefern unzureichende Selektivitäten. Hier wird ein enzymatischer Ansatz zu diesen interessanten Zielverbindungen mittels der P450-BM3-Monooxygenase vorgestellt, der allylische Hydroxylierungen mit hohen bis exzellenten Chemo- und Enantioselektivitäten ermöglicht.

Chirale (ω -2)-Hydroxy- ω -alkensäuren sowie die entsprechenden Ester, Vinylactone und geschützten Alkohole sind wichtige Strukturelemente, die in einer Vielzahl von Naturstoffen und biologisch aktiven Verbindungen wie den Dekanoliden, den Oxylipinen, verschiedenen Antibiotika und Pheromonen sowie zahlreichen weiteren Substanzklassen vorkommen.^[1] Weitreichende Bemühungen zur enantioselektiven Herstellung dieser Bausteine resultierten in mehrstufigen Ansätzen, wobei die Effizienz dieser Zugänge durch die Notwendigkeit von Schutzgruppenchemie sowie von Schritten zur Präfunktionalisierung, zur Umwandlung funktioneller Gruppen und zur Änderungen von Oxidationsstufen begrenzt wird.^[2] Den vermutlich einfachsten Zugang bietet eine von unserem Arbeitskreis aufgezeigte chemoenzymatische Sequenz, die als Schlüsselschritt die selektive Reduktion eines prochiralen Ketons mittels einer Alkoholdehydrogenase beinhaltet (2–3 Stufen, 73–77% Gesamtausbeute, >99% ee, beide Enantiomere zugänglich).^[3] Eine signifikante Verbesserung ließe sich durch eine direkte asymme-

trische allylische Oxidation von leicht zugänglichen „nicht-aktivierten“ Olefinen erreichen, weil dieser einstufige Prozess infolge der hohen Atomökonomie die höchste Effizienz sicherstellt.^[4] In diesem Zusammenhang wurden hervorragende Ergebnisse auf dem hochaktuellen Gebiet der C-H-Aktivierung hinsichtlich der enzymatischen Oxidation cyclischer und linearer Moleküle durch Agudo et al. und Li et al. erreicht.^[5,6] Dennoch bleibt die enantioselektive allylische C-H-Oxidation von einfachen linearen Verbindungen aufgrund fehlender Faktoren für die Induktion von Asymmetrie eine Herausforderung.^[7] Die 2008 von White und Mitarbeitern gezeigte enantioselektive allylische Acetoxylierung von terminalen Olefinen mittels eines Pd^{II}/Bis(sulfoxid)-Systems mit Benzochinon als terminalem Oxidationsmittel sowie einer chiralen Cr^{III}(salen)-Lewis-Säure als Cokatalysator ermöglichte ee-Werte bis 63% und gilt als Meilenstein; auf diese Weise konnten die eingangs vorgestellten Zielverbindungen als ca. 5:1-Gemische aus den verzweigten und linearen Estern mit Ausbeuten von 69–89% und ee-Werten von 50–57% hergestellt werden.^[8] Wir nahmen an, dass ein biokatalytischer Ansatz für entsprechende Umsetzungen den konventionellen chemischen Methoden überlegen sein könnte, da Enzyme hohe Selektivitäten durch Bereitstellung chiraler Reaktionsumgebungen gewährleisten. Die bekannte und vielversprechende NADPH-abhängige bakterielle Cytochrome P450-BM3-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* wurde hierbei als Modellsystem ausgewählt, da es sich um ein lösliches und katalytisch autarkes System mit zahlreichen Vorteilen gegenüber anderen Monooxygenasen handelt; zudem standen für dieses Enzym Protokolle für die Produktion und Aufreinigung des Proteins in großem Maßstab zur Verfügung.^[9,10] Als native Funktion von P450 BM3 wird die subterminale Hydroxylierung von Fettsäuren durch Insertion eines O-Atoms aus molekularem O₂ in C-H-Bindungen vermutet; darüber hinaus wurde die Vielseitigkeit und Wand爾barkeit dieser Monooxygenase durch diverse Protein-Engineering-Studien aufgezeigt.^[9,11] Neben der Hydroxylierung von Alkanen an Position 3 mit Enantioselektivitäten bis 46% S-ee ist hierbei insbesondere die Bevorzugung der allylischen Hydroxylierung von terminalen Alkenen und terminal ungesättigten Fettsäuren gegenüber der Epoxidierung dieser Substanzen zu nennen; jedoch wurden weder die präparative Durchführbarkeit dieser Umsetzungen, noch die Enantioselektivität der allylischen Hydroxylierung untersucht.^[12,13] Im Folgenden wird ein enzymatischer Zugang zu S-konfigurierten (ω -2)-Hydroxy- ω -alkensäuren und Estern durch P450-BM3-katalysierte allylische Hydroxylierung beschrieben. Dieser Ansatz ermöglicht die höchsten bislang erreichten Enantioselektivitäten hinsichtlich der allylischen C-H-Oxidation terminaler linearer Olefine und erfüllt gleichzeitig

[*] B.Sc. K. Neufeld, B. Henßen, Prof. Dr. J. Pietruszka
Institut für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich
Stettener Forst, Geb. 15.8, 52426 Jülich (Deutschland)
und
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie),
Forschungszentrum Jülich
52425 Jülich (Deutschland)
E-Mail: j.pietruszka@fz-juelich.de
Homepage: <http://www.iboc.uni-duesseldorf.de>

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Bundeslands Nordrhein-Westfalen und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Stipendium für K.N. im Rahmen des CLIB Graduiertenclusters für Industrielle Biotechnologie) unterstützt. Wir danken Dr. Martina Bischoff und Dr. Thomas Fischer für die Bereitstellung von Referenzverbindungen und Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg für den Zugang zu P450-BM3-Plasmiden.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403537> zu finden.

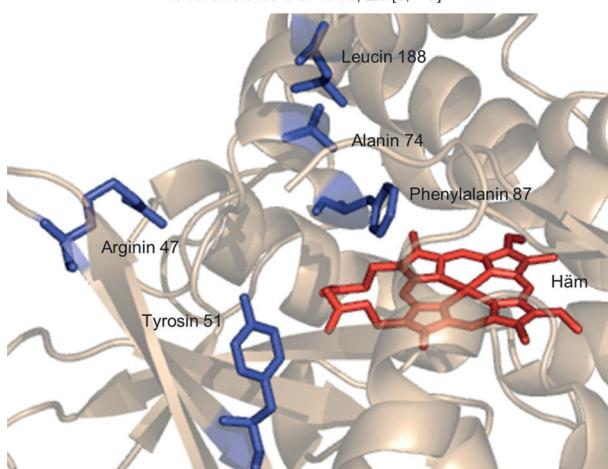
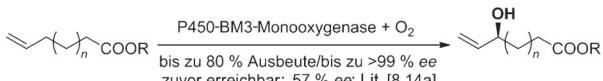


Abbildung 1. Aktives Zentrum von P450 BM3 (PDB: 1BVY). Die Erzeugung einer vielseitigen Mutantenbibliothek erfolgte durch Mutation der farblich gekennzeichneten Aminosäuren. Die erhaltenen Biokatalysatoren ermöglichen allylische C-H-Oxidationen von linearen terminalen Olefinen mit der bislang höchsten Enantioselektivität.

viele Schlüsselkriterien der modernen organischen Synthese wie die Verwendung milder Reaktionsbedingungen, wässriger Medien, nachhaltiger Katalysatoren und O_2 als einem „grünen“ Oxidationsmittel (Abbildung 1).^[14]

Eine vielseitige P450-BM3-Enzyrbibliothek aus 65 Varianten wurde durch Mutation der Aminosäuren R47, Y51, A74, F87 und L188 aufgebaut, wobei alle diese Positionen im aktiven Zentrum lokalisiert sind und als essentielle Faktoren der Aktivität und Selektivität dieses Enzyms gelten (siehe die Hintergrundinformationen: S2).^[9a,15] Diese Biokatalysatoren wurden anschließend zur Durchmusterung der Fähigkeit von P450 BM3 für die allylische Hydroxylierung von 6-Heptensäureethylester (**1a**) als Modellsubstrat herangezogen. Dazu wurden Reaktionen im analytischen Maßstab durchgeführt und mittels GC hinsichtlich des Substratumsatzes sowie der Chemo- und Enantioselektivität der Produktbildung überprüft. Im Einklang mit früheren Berichten der P450-BM3-katalysierten Oxygenierung terminaler Olefine führten alle Mutanten zur Bildung des Allylalkohols (**2a**) als Hauptprodukt sowie des entsprechenden Epoxids (**3a**) als Nebenprodukt, wobei der Alkohol stets die *S*-Konfiguration aufwies.^[13] Dabei wurden Umsätze bis 59% erreicht, die Alkoholpräferenz schwankte zwischen 65 und 97% und die Enantioselektivitäten lagen zwischen 87 und 98% ee (Tabelle 1, Nr. 1; siehe die Hintergrundinformationen: S3). Zudem wurde 6-Heptensäure (**4a**) als Bestandteil der Rohprodukte detektiert, und die Bildung dieser Verbindung konnte auf Hydrolaseaktivität im Rohlysat zurückgeführt werden (siehe die Hintergrundinformationen: S4). Die Mutanten A74G, L188Q und A74G/L188Q (GQ) zeigten die vielversprechendsten Kombinationen der getesteten Parameter und wurden einer vergleichenden Charakterisierung unterworfen. Dazu erfolgte zum einen die Wiederholung der vorherigen Betrachtung mit definierten Enzymmengen und aufgereinigten Pro-

Tabelle 1: Durchmusterung und Charakterisierung von P450-BM3-Mutanten für die stereoselektive allylische Hydroxylierung von 6-Heptensäureester (**1a**).

Nr.	P450-BM3-Mutante	Umsatz [%]	2a/3a	ee [%]	KE [%]
			2a/3a	ee [%]	KE [%]
1	Enzyrbibliothek	0–59	65:35–97:3	87–98	-
2	A74G	47 ± 3	89 (±0):11	96 ± 1	36 ± 1
3	L188Q	37 ± 2	85 (±0):15	93 ± 1	51 ± 1
4	A74G/L188Q	49 ± 1	90 (±0):10	95 ± 1	52 ± 1

Reaktionsbedingungen: $\Sigma 500 \mu\text{L}$: 200 μL P450-BM3-Rohlysat, 2 mM Substrat, 2 Vol.-% DMSO, 300 U Katalase, 30 Vol.-% Aktivitätspuffer (50 mM KPi, 50 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, pH 8.0), GDH-Glukose-NADPH-Recycling (Nr. 1); wie zuvor mit 3 μm aufgereinigtem P450 BM3, 10 mM Substrat und ohne DMSO-Zugabe (Nr. 2–4); $\Sigma 1 \text{ mL}$: 1.5 μm aufgereinigtes P450 BM3, 400 μm Substrat, 2 Vol.-% DMSO, 30 Vol.-% Aktivitätspuffer, 200 μm NADPH (KE-Spalte). Die Werte wurden durch GC-Analyse in Dreifachbestimmung ermittelt; die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgte durch den Vergleich mit einer Referenzverbindung. KE: Kopplungseffizienz.

teinproben, zum anderen wurden die Kopplungseffizienzen dieser Biokatalysatoren ermittelt (Anteil des NADPHs, der „produktiv“ für die Substratoxidation verwendet wird); der letztgenannte Parameter stellt ein wichtiges Maß für die Produktivität von Monooxygenasen dar (Tabelle 1, Nr. 2–4). Die P450-BM3-Doppelmutante GQ erwies sich gemäß diesen Untersuchungen als geeigneter Biokatalysator für die selektive allylische Hydroxylierung von **1a**. Mit einem Umsatz von (49 ± 1)%, einer Alkoholpräferenz von (90 ± 0)%, einem ee von (95 ± 1)% und einer Kopplungseffizienz von (52 ± 1)% erzielte die Doppelmutante im Fall von drei der vier überprüften Parameter bessere Ergebnisse als die Einachtmutanten. Die generelle Anwendbarkeit dieser Variante für die asymmetrische Produktion von Allylalkoholen ausgehend von Verbindungen mit einer ω -Alkensäureeinheit wurde zudem anhand der Durchmusterung der P450-BM3-Bibliothek für den 8-Nonensäureethylester (**1b**) nachgewiesen, da ein Vergleich der besten Mutanten ebenfalls zur Identifizierung der GQ-Mutante führte (siehe die Hintergrundinformationen: S3). Dieses Ergebnis wies ferner darauf hin, dass auf eine Durchmusterung der Enzyrbibliothek mit strukturell verwandten Verbindungen wegen der erwarteten Redundanz verzichtet werden kann. Interessanterweise kamen Reetz und Mitarbeiter im Rahmen ihrer Untersuchung cyclischer Olefine zu einer ähnlichen Schlussfolgerung, wodurch das Potenzial der P450-BM3-Monooxygenase für Synthesen zusätzlich gesteigert wird.^[5]

Eine systematische Überprüfung des Substratspektrums der GQ-Mutante erfolgte durch Betrachtung der Fähigkeit dieses Biokatalysators zur Katalyse der stereoselektiven allylischen Hydroxylierung von ω -Alkensäuren und den entsprechenden Estern mit Kettenlängen von C_6 bis C_{11} . Hierzu wurden semipräparative Umsetzungen durchgeführt und Alkoholbildung durch ^1H -NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die gewünschten Produkte wurden für alle Ester **1a–f** und die langketigen Säuren **4e,f** beobachtet, wobei kurzkettige Ester und langketige Säuren höhere Umsätze liefern (Tabelle 2, Produkte **2a–f** und **5e,f**). Die detektierten

Tabelle 2: Untersuchung des Substratspektrums und der Selektivität der P450-BM3-A74G/L188Q-katalysierten allylischen Hydroxylierung von ω -Alkensäuren und -estern.

Nr.	Substrat	Produkt(e)	Umsatz [%] ^[a]	ee [%] ^[b]
1	1c n=1 R=Et	2c (6a)	49 ^[c]	96
2	1a n=2 R=Et	2a (6b)	42 ^[d]	93
3	1d n=3 R=Et	2d	70	97
4	1b n=4 R=Et	2b	49	>99
5	1e n=5 R=Et	2e	34	n.b.
6	1f n=6 R=Et	2f	18	n.b.
7	4a n=1 R=H	5a	0	—
8	4b n=2 R=H	5b	0	—
9	4c n=3 R=H	5c	0	—
10	4d n=4 R=H	5d	<5	—
11	4e n=5 R=H	5e	6	n.b.
12	4f n=6 R=H	5f	28	n.b.

Reaktionsbedingungen: 3 mL: 3 μ M aufgereinigtes P450 BM3, 10 mM Substrat, 2 Vol.-% DMSO, 1.8 kU Katalase, 30 Vol.-% Aktivitätspuffer, GDH-Glukose-NADPH-Recycling. [a] Ermittelt durch 1 H-NMR-Analyse. [b] Ermittelt durch GC-Analyse; die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgte durch den Vergleich mit Referenzverbindungen. [c] **2c**/**6a** \approx 6:4. [d] **2a**/**6b** \approx 9:1. n.b. = nicht bestimmt.

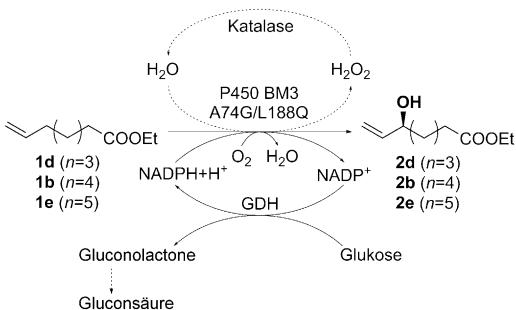
Epoxidsignale waren unterhalb der Integrationsgrenze und wurden daher vernachlässigt. Zudem wurde eine spontane Lactonisierung der Produkte **2a** und **2c** nachgewiesen, und die wenig gespannten γ - und δ -Lactone **6a** und **6b** wurden beobachtet.^[16] Die GC-Analyse der gebildeten Produkte an chiralen stationären Phasen zeigte zudem in allen Fällen hohe Enantioselektivitäten der GQ-katalysierten Oxidationen zugunsten der *S*-Alkohole; der höchste ee wurde mit >99 % für das Produkt **2b** und der niedrigste mit 93 % für den Ester **2a** ermittelt. Dieses Ergebnis stützte erneut die generelle Anwendbarkeit der GQ-Mutante für die asymmetrische Produktion von Allylalkoholen ausgehend von Substraten mit einer ω -Alkensäureeinheit und war erfreulich, da der Einsatz von Biokatalysatoren in Synthesen häufig durch hohe Substratspezifitäten eingeschränkt wird. Das aufgezeigte Substratspektrum wurde außerdem durch Überprüfung unterschiedlicher 6-Heptensäureester mit dem Ziel einer Erhöhung der Enantioselektivität erweitert, wobei Allylalkohole in allen Fällen gebildet wurden und in den meisten Fällen vergleichbare ee-Werte zum Ethylester **2a** aufwiesen. (Siehe die Hintergrundinformationen: S3; Abnahme der Stereokontrolle wurde lediglich bei Anwesenheit einer sterisch anspruchsvollen oder polaren Einheit in unmittelbarer Nähe zum Ester beobachtet.)

Die Produktivität von Biokatalysatoren in präparativen Umsetzungen ist ein essentieller Faktor, dessen Einschätzung anhand der Durchmusterungsexperimente aufgrund abweichender Reaktionsbedingungen nicht möglich ist. In diesem Sinne wurde die Anwendbarkeit der identifizierten GQ-Mutante exemplarisch überprüft. Dazu wurden 7-Octensäureethylester (**1d**), 8-Nonensäureethylester (**1b**), 9-Decensäureethylester (**1e**) und 10-Undecensäure (**4f**) als Substrate

ausgewählt, weil diese Verbindungen im vorhergehenden Assay die besseren Ergebnisse im Vergleich zum alternativen Substrat mit der entsprechenden Kettenlänge geliefert haben. Auf eine Untersuchung der Ester **1c** und **1a** wurde verzichtet, weil die hohe Flüchtigkeit dieser Verbindungen und die Lactonisierung der entsprechenden Produkte **2c** und **2a** die Produktisolierung erschweren würde. Die Wahl der Reaktionsbedingungen erfolgte in Anlehnung an vorhergehende Studien.^[17] O₂ wurde als Reaktant zugesetzt und eine Katalase sollte den Abbau von H₂O₂, einem toxischen Produkt des „unproduktiven“ Verbrauchs von Reduktionsäquivalenten durch P450 BM3, zu H₂O gewährleisten.^[17] Ein Glukosedehydrogenase(GDH)-Glukose-System ermöglichte zudem die Regenerierung von NAPDH, und eine titratorvermittelte Korrektur des pH-Werts stellte einen Wert von 7.5 während der gesamten Reaktionsdauer sicher. Eine Optimierung wurde durch Überprüfung des Einflusses unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen (ein P450-BM3-mutantenspezifischer Parameter abhängig von der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Cosolvensmoleküle),^[18] verschiedenen Arten der O₂-Zugabe (ein substratspezifischer Parameter abhängig von der Flüchtigkeit der Verbindungen) und diverser Möglichkeiten der Katalysatorzugabe (ein enzym-/substratspezifischer Parameter abhängig von der Stabilität des Enzyms in Anwesenheit des Substrats) auf das Ergebnis der Biotransformation am Beispiel des Esters **1d** als Substrat durchgeführt (Tabelle 3, Nr. 1–10). Zum Ausschluss von Hydrolaseaktivität, wodurch anderenfalls die Menge des verfügbaren P450-BM3-Substrats herabgesetzt werden würde, wurden die Oxidationen aller Ester mit aufgereinigten P450 BM3- und GDH-Proben durchgeführt. Die höchste Ausbeute von 45 % wurde in Anwesenheit von 2 Vol.-% DMSO, einer anfänglichen Sättigung der Reaktionslösung mit O₂ und einer wiederholten Zugabe des Biokatalysators erreicht (Tabelle 3, Nr. 10). Auffällig war die Konstanz der Enantioselektivität mit 97 % ee in allen Proben unabhängig von den angewandten Reaktionsbedingungen, obwohl Reetz und Mitarbeiter die Bedeutung der Kontrolle des Substrat-zu-Enzym-Verhältnisses zum Erhalt optimaler Enantioselektivitäten hervorgehoben haben. Die Oxidation der Substrate **1b** und **1e** lieferte anschließend bei Anwendung der optimierten Bedingungen die Produkte **2b** und **2e** mit 24 % und 20 % Ausbeute sowie >99 % und 97 % ee (Tabelle 3, Nr. 11 und 12).

Die Umsetzung der Säure **4f** erfolgte gemäß den vorherigen Erkenntnissen mit Enzymrohlysaten, da Hydrolaseaktivität in diesem Fall irrelevant war. Wegen des unterschiedlichen Verhaltens von P450 BM3 im Fall aufgereinigter Proben und bei Verwendung von Rohlysaten (in vorhergehenden Studien beobachtet, Daten werden nicht gezeigt) wurden verschiedene Katalysatormengen getestet. Zudem wurden die Rohprodukte mit CH₂N₂ methyliert, um die Isolierung des gewünschten Alkohols durch chromatographische Aufreinigung zu erleichtern (Tabelle 4). Die höchste Ausbeute des Alkohols **7** über zwei Schritte wurde mit 80 % bei Einsatz von 9 \times 10⁻² Mol-% Biokatalysator erreicht (Tabelle 4, Nr. 3). Der ee-Wert war erneut unabhängig von dem Substrat-zu-Enzym-Verhältnis, und die Werte lagen zwischen 87 und 92 %. Neben dem Nachweis der präparativen Anwendbarkeit der GQ-Mutante implizierten diese Ergebnisse,

Tabelle 3: Oxidation von ω -Alkensäureethylestern mit aufgereinigtem P450 BM3 A74G/L188Q im präparativen Maßstab.



Nr.	Substrat	Produkt	P450 BM3 [10 ⁻² Mol-%]	DMSO [Vol.-%]	Ausbeute [%] ^[a]	ee [%] ^[b]
1	1d n=3	2d	3.0	0.5	23	97
2	1d n=3	2d	3.0	1.0	27	97
3	1d n=3	2d	3.0	2.0	32	97
4	1d n=3	2d	3.0	3.0	21	97
5 ^[c]	1d n=3	2d	3.0	2.0	21	97
6 ^[c]	1d n=3	2d	6.0	2.0	26	97
7	1d n=3	2d	6.0	2.0	33	97
8	1d n=3	2d	9.0	2.0	27	97
9	1d n=3	2d	6.0 ^[d]	2.0	37	97
10	1d n=3	2d	4.8 ^[e]	2.0	45	97
11	1b n=4	2b	4.8 ^[e]	2.0	24	>99
12	1e n=5	2e	4.8 ^[e]	2.0	20	97 ^[g]

Reaktionsbedingungen: Σ 60 mL: aufgereinigtes P450 BM3, 0.6 mmol Substrat, 36 kU Katalase, 30 Vol.-% Aktivitätspuffer, GDH-Glukose-NADPH-Recycling. [a] Ausbeute des isolierten Produkts. [b] Ermittelt durch GC-Analyse; die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgte durch einen Vergleich mit Referenzverbindungen. [c] Kontinuierliche O_2 -Zufuhr. [d] Die Reaktion erfolgte zunächst mit 3.0×10^{-2} Mol-% Katalysator sowie Zugabe einer weiteren Portion von 3.0×10^{-2} Mol-% 3 h nach Reaktionsbeginn. [e] Die Reaktion erfolgte zunächst mit $3.0 \cdot 10^{-2}$ Mol-% Katalysator sowie Zugabe von weiteren Portionen je 0.6×10^{-2} Mol-% 2, 4 und 6 h nach Reaktionsbeginn. [g] Ermittelt durch HPLC-Analyse nach Acetylierung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid; die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgte durch den Vergleich mit einer Referenzverbindung.

Tabelle 4: Oxidation von 10-Undecensäure (**4f**) mit P450-BM3-A74G/L188Q-Rohlysat im präparativen Maßstab.

Nr.	P450 BM3 [10 ⁻² Mol-%]	Ausbeute [%] ^[a]		ee [%] ^[b]
		1. P450 BM3 A74G/L188Q	2. CH_2N_2	
1	3.0		30	>89
2	6.0		68	>87
3	9.0		80	92
4	15.0		69	>90

Reaktionsbedingungen: Σ 60 mL: P450-BM3-Rohlysat, 0.6 mmol Substrat, 36 kU Katalase, 30 Vol.-% Aktivitätspuffer, GDH-Glukose-NADPH-Recycling. [a] Ausbeute des isolierten Produkts. [b] Ermittelt durch HPLC-Analyse nach Acetylierung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid; die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgte durch den Vergleich mit einer Referenzverbindung sowie anhand des Drehwerts.

dass Umsatzwerte aus Durchmusterungsexperimenten – entgegen ihrer Eignung für den relativen Vergleich unterschiedlicher P450-BM3-Mutanten – keine Aussagekraft hin-

sichtlich der Produktivität von P450-BM3-Mutanten im Rahmen präparativer Synthesen besitzen. Des Weiteren scheint die Monoxygenase eine höhere Aktivität und Stabilität in Rohlysaten aufzuweisen als in aufgereinigten Proben, wobei dieser Effekt bei Anwendung hoher Enzymkonzentrationen besonders auffällig war.

Zusammenfassend wurde die A74G/L188Q-Doppelmutante der P450-BM3-Monoxygenase als aktiver und selektiver Biokatalysator für die asymmetrische allylische Hydroxylierung von ω -Alkensäuren und den entsprechenden Estern identifiziert, wobei dieses Enzym den Zugang zu S-konfigurierten Allylalkoholen ermöglicht und ein breites Substratspektrum aufweist. Die Tatsache, dass eine hohe Chemo- und Enantioselektivität unabhängig von der Kettenlänge der Substrate sowie der vorliegenden Estergruppe beobachtet wurde, weist darauf hin, dass die Ursache der Selektivität nicht in spezifischen Wechselwirkungen mit definierten Aminosäureresten im aktiven Zentrum begründet liegt. Vielmehr muss von einer generellen Orientierung der Verbindungen mit einer ω -Alkensäureeinheit im Substratkanal ausgegangen werden. Die relativ starre Carbonyleinheit könnte dabei als Ankerpunkt für die Orientierung dieser Verbindungen dienen, da in der Vergangenheit geringere Enantioselektivitäten mit den vergleichbaren, aber wesentlich flexibleren Alkanen erhalten wurden.^[12] Das Potential der GQ-Mutante für präparative asymmetrische Synthesen wurde zudem durch die Herstellung von begehrten Bausteinen für die Synthese von biologisch aktiven Verbindungen demonstriert. Dabei konnten Ausbeuten von bis zu 80 % und präzedenzlose Enantioselektivitäten von bis zu >99 % ee verzeichnet werden. Ferner wurden grundlegende Erkenntnisse für die Anwendung dieser vielversprechenden Monoxygenase für synthetische Zielsetzungen im Allgemeinen bereitgestellt.

Experimentelles

Enzytatische Oxidationen von ω -Alkensäuren und Estern (präparativer Maßstab): Die P450-BM3-katalysierten Oxidationen wurden in sterilen 100-mL-Dreihalskolben mit kreuzförmigen Rührfischen und einem Gesamtvolumen von 60 mL durchgeführt. Die Reaktionsgemische enthielten P450-BM3-A74G/L188Q-Monoxygenase (9 μ M, Rohlysat für die Oxidation von Säuren; 3 μ M, aufgereinigtes Enzym für die Oxidation von Estern), 30 Vol.-% Aktivitätspuffer (50 mM KPi, 50 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, pH 8.0), NADP⁺ (200 μ M für die Oxidation mit Rohlysat, 100 μ M für die Oxidation mit aufgereinigtem Enzym), 15 U GDH, 400 mM Glukose (sterile 3.3 M Stammlösung in 50 mM KPi-Puffer, pH 7.5), 36 kU Katalase (aus *Micrococcus lysodeikticus*) und gegebenenfalls DMSO in 50 mM KPi-Puffer (pH 7.5). Die Lösungen wurden unter Rühren durch fünfminütiges Begasen mit O_2 gesättigt und die Reaktionen durch Zugabe von Substrat (0.6 mmol) initiiert. Die Kolben wurde unmittelbar nach Reaktionsbeginn an einen Metrohm-848-Titrino-Plus-pH-Staten angeschlossen, sodass während der gesamten Reaktionsdauer durch kontinuierliche Zugabe einer 1M NaOH-Lösung ein konstanter pH-Wert von 7.5 gewährleistet wurde. Die Oxidationen erfolgten bei 30°C über einen Zeitraum von 16 h; im Fall der aufgereinigten Enzymproben erfolgte Zugabe von zusätzlichem Biokatalysator im Verlauf der Oxidation ($3 \times 0.6 \mu$ M nach 2, 4 und 6 h). Reaktionsverläufe wurden über die zeitabhängige Menge an zugesetzter Base verfolgt und Reaktionen durch Sättigung der Lösung mit NaCl beendet, sobald die Titrationskurve eine Sättigung zeigte. Protein wurde

über Nacht bei 4°C denaturiert, die Reaktionslösungen mit 1M HCl-Lösung auf pH≈2 angesäuert und mit EtOAc (40 mL) extrahiert. Dabei war für den ersten Extraktionsschritt eine Zentrifugation erforderlich, um eine Phasentrennung zu erreichen. An der Interphase bildete sich ein bräunliches Pellets, das mittels eines Spatels in die organische Phase überführt wurde. Es folgten konventionelle Extraktionsschritte (4×40 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck lieferte die Rohprodukte; im Fall der Säuren wurden diese einer Methylierung mit CH₂N₂ unterworfen. Chromatographische Aufreinigungen der Proben an Kieselgel mit n-Pentan/Et₂O-Gemischen (8:2→6:4) lieferten die Produkte.

Eingegangen am 20. März 2014,
veränderte Fassung am 23. Mai 2014
Online veröffentlicht am 22. August 2014

Stichwörter: Allylalkohole · C-H-Aktivierung · Enantioselektivität · Oxidoreduktasen · P450

- [1] Ein allgemeiner Übersichtsartikel: a) A. Lumbroso, M. L. Cooke, B. Breit, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1942–1986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1890–1932; ausgewählte Beispiele für Dekanolide: b) A. Evidente, A. Cimmino, A. Berestetskiy, A. Andolfi, A. Motta, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1897–1901; c) O. Yuzikhin, G. Mitina, A. Berestetskiy, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7707–7711; d) A. Evidente, A. Cimmino, A. Berestetskiy, G. Mitina, A. Andolfi, A. Motta, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 31–34; e) A. Evidente, R. Lanzetta, R. Capasso, A. Andolfi, A. Bottalico, M. Vurro, M. C. Zonno, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1637–1641; für Oxylipine: f) A. Benavides, A. Napolitano, C. Bassarollo, V. Carbone, P. Gazzero, A. Malfitano, P. Saggesse, M. Bifulco, S. Piacente, C. Pizza, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 813–817; g) T. Nagai, H. Kiyoohara, K. Munakata, T. Shirahata, T. Sunazuka, Y. Harigaya, H. Yamada, *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 1183–1193; h) O. Papendorf, G. M. König, A. D. Wright, I. Chorus, A. Oberemm, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1298–1300; i) W. Herz, P. Kulanthaivel, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 89–91; j) J. H. Cardellina, R. E. Moore, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 993–996; für Iso- und Phytoprostan: k) J. D. Morrow, K. E. Hill, R. F. Burk, T. M. Nammour, K. F. Badr, L. J. Roberts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9383–9387; l) M. J. Mueller, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 441–448; für Leukotriene und Lipoxine: m) B. Samuelsson, S.-E. Dahlén, J. Å. Lindgren, C. A. Rouzer, C. N. Serhan, *Science* **1987**, *237*, 1171–1176; für Pheromone: n) R. Ikan, R. Gottlieb, E. D. Bergmann, *J. Insect Physiol.* **1969**, *15*, 1709–1712; weitere Beispiele: o) M. D. Lewis, R. Menes, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5129–5132. Für eine anschauliche Übersicht ausgewählter Beispiele, siehe die Hintergrundinformationen: S8.
- [2] Beispiele für Verwendung chiraler Ausgangsmaterialien: a) J. S. Yadav, N. M. Reddy, N. V. Rao, M. A. Rahman, A. R. Prasad, *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 227–234; b) A. Kamal, P. V. Reddy, M. Balakrishna, S. Prabhakar, *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 143–149; c) S. H. Jacobo, C.-T. Chang, G.-J. Lee, J. A. Lawson, W. S. Powell, D. Pratico, G. A. FitzGerald, J. Rokach, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1370–1379; d) J. Song, R. I. Hollingsworth, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 387–391; Beispiele für kinetische Racematspaltungen: e) D. A. Kumar, H. M. Meshram, *Synth. Commun.* **2013**, *43*, 1145–1154; f) W. Perlikowska, M. Mikolajczyk, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1767–1771; g) A. Miura, S. Kuwahara, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3364–3368; h) P. S. Chowdhury, P. Gupta, P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7018–7020; i) N. Jana, T. Mahapatra, S. Nanda, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2622–2628; Beispiele für asymmetrische Transformationen: j) S. Chatterjee, S. V. Kanjaria, S. Chattopadhyay, A. Sharma, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 367–372; k) J. S. Yadav, R. Somaiah, K. Ravindar, L. Chandraiah, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2848–2850; l) A. K. Perepogu, D. Raman, U. S. N. Murty, V. J. Rao, *Bioorg. Chem.* **2009**, *37*, 46–51; m) D. K. Mohapatra, U. Dash, P. R. Naidu, J. S. Yadav, *Synlett* **2009**, 2129–2132; n) E. J. Corey, A. Guzman-Perez, S. E. Lasherith, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11769–11776.
- [3] a) T. Fischer, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1533–1536; b) T. Fischer, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2521–2530; c) N. Hoffmann, J. Pietruszka, C. Söffing, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 959–963.
- [4] a) E. Roduner, W. Kaim, B. Sarkar, V. B. Urlacher, J. Pleiss, R. Gläser, W.-D. Einicke, G. A. Spenger, U. Beifuß, E. Klemm, C. Liebner, H. Hieronymus, S.-F. Hsu, B. Plietker, S. Laschat, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 82–112; b) M. Bisshop, J. Pietruszka, *Synlett* **2011**, *18*, 2689–2692.
- [5] R. Agudo, G.-D. Roiban, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1465–1473.
- [6] Y. Yang, J. Liu, Z. Li, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3184–3188; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3120–3124.
- [7] R. Giri, B.-F. Shi, K. M. Engle, N. Maugel, J.-Q. Yu, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3242–3272.
- [8] D. J. Covell, M. C. White, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6548–6551; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6448–6451.
- [9] Aktuelle Übersichtsartikel: a) C. J. C. Whitehouse, S. G. Bell, L.-L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1218–1260; b) G. Di Nardo, G. Gilardi, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 15901–15924; c) S. T. Jung, R. Lauchli, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 1–9; d) J. C. Lewis, F. H. Arnold, *Chimia* **2009**, *63*, 309–312; e) S. Eiben, L. Kaysser, S. Maurer, K. Künnel, V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 662–669.
- [10] a) S. Pflug, S. M. Richter, V. B. Urlacher, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 481–488; b) U. Schwaneberg, A. Sprauer, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *J. Chromatogr. A* **1999**, *848*, 149–159.
- [11] A. W. Munro, D. G. Leys, K. J. McLean, K. R. Marshall, T. W. B. Ost, S. Daff, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, C. C. Moser, C. C. Page, P. L. Dutton, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 250–257.
- [12] M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13442–13450.
- [13] a) N. Shirane, Z. Sui, J. A. Peterson, P. R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13732–13741; b) E. T. Farinas, M. Alcalde, F. Arnold, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 525–528; c) X. Chen, Z. Su, J. H. Horner, M. Newcomb, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7427–7433.
- [14] a) D. J. Covell, M. C. White, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7771–7778; b) B. Zhang, S.-F. Zhu, Q.-L. Zhou, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2665–2668; c) Lit. [8], zit. Lit.
- [15] a) Q.-S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, R. D. Schmid, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1531–1536; b) Q.-S. Li, U. Schwaneberg, M. Fischer, J. Schmitt, J. Pleiss, S. Lutz-Wahl, R. D. Schmid, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2001**, *1545*, 114–121.
- [16] a) M. Utaka, H. Watabu, A. Takeda, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4363–4368; b) C. Romero-Guido, I. Belo, T. M. N. Ta, L. Cao-Hoang, M. Alchihab, N. Gomes, P. Thonart, J. A. Teixeira, J. Destain, Y. Waché, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 535–547; c) ref. [2c].
- [17] K. Neufeld, J. Marienhagen, U. Schwaneberg, J. Pietruszka, *Green Chem.* **2013**, *15*, 2408–2421.
- [18] D. Roccatano, T. S. Wong, U. Schwaneberg, M. Zacharia, *Biopolymers* **2006**, *83*, 467–476.