ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Α) ΣΤΕΡΕΟΕΚΛΕΚΤΙΚΕΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΑΝΑΓΩΓΕΣ ΠΡΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΩΝ ΛΑΚΤΑΜΩΝ Β) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ RALSTONIA ADH ΚΑΙ SPHINGOBIUM SPP

Τυρίκος-Εργάς Θεόδωρος

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Σμόνου Ιουλία

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ISOLATION AND SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

ORGANIC CHEMISTRY LABORATORY

Master Thesis

STEREOSELECTIVE BIOCATALYTIC REDUCTIONS TOWARDS THE SYNTHESIS OF CHIRAL LACTAMS B) DEVELOPMENT AND ACTIVITY CONTROL OF THE ENZYMES RALSTONIA ADH AND SPHINGOBIUM SPP

Tyrikos-Ergas Theodore

Master Thesis Supervisor: Smonou Ioulia

HERAKLION 2017

Εξεταστική Επιτροπή

Σμόνου Ιουλία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα), Τμήμα Χημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τσιώτης Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα», στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας - Βιοκατάλυσης, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, καθώς χωρίς την στήριξη των ανθρώπων αυτών, τίποτε από αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με έκανε δεκτό στο Μεταπτυχιακό του Πρόγραμμα και μου παρείχε την απαραίτητη υλικοτεχνική υποδομή.

Κυρίως, ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ιουλία Σμόνου, η οποία με δέχτηκε στο εργαστήριο και με εμπιστεύθηκε από την πρώτη στιγμή καθοδηγώντας με σε κάθε βήμα και ήταν δίπλα μου σε καλές και κακές στιγμές.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κ. Στρατάκη Εμμανουήλ και κ. Τσιώτη Γεώργιο, που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή μου επιτροπή.

Θέλω να αναφερθώ ξεχωριστά και να ευχαριστήσω θερμά τον ομότιμο καθηγητή κ. Ορφανόπουλο Μιχαήλ. Οι εποικοδομητικές συζητήσεις, οι συμβουλές και η ενθάρρυνση του προς το πρόσωπό μου ήταν καθοριστικές για την διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Στο πειραματικό μέρος, σημαντική ήταν και η συμβολή του Δρ. Καλαϊτζακη Δημήτρη.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου, Διονυσοπούλου Χ., Τζανακάκη Α., Γιαννόπουλο Β., Ζωίδη Μ. και όλους τους υπόλοιπους νέους και παλιούς συνεργάτες για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που υπήρχε μονίμως μέσα στο εργαστήριο.

Κλείνοντας, θα ήταν παράβλεψη αν δεν ευχαριστούσα τα παιδιά του εργαστηρίου Βιοχημείας, την Κουρπάς Κ., την Μαθιουδάκη Ε., την Στρατάκη Β. και τον Βαλσαμίδη Γ. για την απίστευτη υποδοχή και καθοδήγηση στο εργαστήριο τους κατά την τετράμηνη παρουσία μου εκεί.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: **Θεόδωρος**
Επώνυμο: **Τυρίκος-Εργάς**
Φύλο: Αρρεν
Ημερομηνία/Τόπος γεννήσεως: 5 Ιουνίου 1991/ Αγ.Βασίλειος, Κάλυμνος, Ελλάδα

Εθνικότητα: Έλληνας
Ιδιότητα: Μεταπτυχιακός φοιτητής
Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Ηράκλειο-Πανεπιστημιούπολη Βουτών, Κρήτη 71003, ΕΛΛΑΔΑ
Email: thoriaki@yahoo.gr

Εκπαίδευση

2015-σήμερα: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Οργανική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Μεταπτυχιακή Διατριβή με τίτλο *"α) Στερεοεκλεκτικές βιοκαταλυτικές αναγωγές προς σχηματισμό χειρόμορφων λακταμών β) Ανάπτυξη και έλεγχος δραστικότητας των ενζύμων Ralstonia ADH και Sphingobium spp"* υπό την επίβλεψη της Αναπλήρωτριας Καθηγήτριας Ι. Σμόνου, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2010-2015: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Βαθμός: Λίαν καλώς (7.58/10.0)

2014-2015: Πτυχιακή Διπλωματική εργασία με τίτλο *"Ενζυμικές αναγωγές ποικίλων ακόρεστων καρβόνυλων ενώσεων"* υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ι. Σμόνου, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Εμπειρία

2016 **:** Βοηθός Εργαστηρίου σε προπτυχιακά εργαστήρια Οργανικής Χημείας Ι και ΙΙ.

01/07/2014-30/09/2014 **:** Πρακτική Άσκηση στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλειου (ΠΑΓΝΗ) στο εργαστήριο Ανοσοιστοχημείας στον τομέα της Παθολογοανατομίας.

Ξένες Γλώσσες

- Δίπλωμα Αγγλικών ECCE
- ΚΠΓ επίπεδο Β2 στα Γερμανικά

Συμμετοχή σε συνέδρια

26-30 July 2015:	Bariotaki, A.; Giannopoulos, V.; **Tyrikos-Ergas, T**.; Smonou, I. *Highly stereoselctive bioreductions of methyl substituted diketo esters,* Biotrans 2015, Vienna, Austria. (poster presentation)
11-14 October 2016:	Smonou, I.; Tzanakaki, A.; **Tyrikos-Ergas, T**.; Giannopoulos, V. *Bioreductions as the key step for the synthesis of biologically active natural products,* The 5th international conference on Novel Enzymes 2016, Groningen, Netherlands. (poster presentation)
26-28 March 2016:	**Tyrikos-Ergas, T**.; Smonou, I. *Chemoenzymatic approach towards the synthesis of the natural products (R)-rugulactone and maurenone,* 18th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (poster presentation)
2-4 May 2017:	**Tyrikos-Ergas, T**.; Smonou, I. *Stereoselective bioreductions towards the synthesis of chiral γ- and δ-lactams,* 19th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (oral presentation)
9-13 July 2015:	Giannopoulos, V.; **Tyrikos-Ergas, T**.; Tzanakaki, A.; Zoidi, M.; Smonou, I. *Stereocontrolled Enzymatic Transformation of di- and tri- carbonyl compounds,* Biotrans 2017, Budapest, Hungary (poster presentation).

CURRICULUM VITAE

First Name:	**Theodore**
Family name:	**Tyrikos-Ergas**
Gender:	male
Date/Place of birth::	5 June 1991/ Ag.Vasileios, Kalymnos, Greece
Nationality:	Greek
Status:	Postgraduate student Department of Chemistry University of Crete Heraklion-Voutes Campus, Crete 71003, GREECE
Email:	thoriaki@yahoo.gr

Education

2015-present: M.Sc in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete

Sept. 2017 (expected): M.Sc Diploma Thesis " A) Stereoselective biocatalytic reductions toward the synthesis of chiral lactams B) Development and activity control of the enzymes Ralstonia ADH and Sphingobium spp " Supervisor Associate. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete.

2010-2015: B.Sc in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete

Grade: Very good (7.58/10.0)

2014-2015: Senior undergraduate Diploma Thesis entitled *"Enzymatic reduction of various unsaturated carbonyl compounds"* elaborated under the supervision of Assoc. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete.

Experience

2016 (winter and spring semester)**:** Laboratory Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory I & II.

01/07/2014-30/09/2014 **:** Practical internship in the General University Hospital of Heraklion at Immunochemistry laboratory of the Division of Pathology in the framework of the Operational Program "Education & Lifelong Learning" co-funded by the European Union (European Social Fund) and National Resources .

Language skills

- Certificate of Competency in English (ECCE)
- KPG level B2 in German

Participation in Conferences

26-30 July 2015:	Bariotaki, A.; Giannopoulos, V.; **Tyrikos-Ergas, T**.; Smonou, I. *Highly stereoselctive bioreductions of methyl substituted diketo esters,* Biotrans 2015, Vienna, Austria. (poster presentation)
11-14 October 2016:	Smonou, I.; Tzanakaki, A.; **Tyrikos-Ergas, T**.; Giannopoulos, V. *Bioreductions as the key step for the synthesis of biologically active natural products,* The 5th international conference on Novel Enzymes 2016, Groningen, Netherlands. (poster presentation)
26-28 March 2016:	**Tyrikos-Ergas, T**.; Smonou, I. *Chemoenzymatic approach towards the synthesis of the natural products (R)-rugulactone and maurenone,* 18th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (poster presentation)
2-4 May 2017:	**Tyrikos-Ergas, T**.; Smonou, I. *Stereoselective bioreductions towards the synthesis of chiral γ- and δ-lactams,* 19th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (oral presentation)
9-13 July 2015:	Giannopoulos, V.; **Tyrikos-Ergas, T**.; Tzanakaki, A.; Zoidi, M.; Smonou, I. *Stereocontrolled Enzymatic Transformation of di- and tri- carbonyl compounds,* Biotrans 2017, Budapest, Hungary (poster presentation).

Περίληψη

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από τρία Κεφάλαια στα πλαίσια των οποίων μελετήθηκαν οι στερεοεκλεκτικές ενζυμικές αναγωγές με NADPH-εξαρτώμενες αλκοολικές αφυδρογονάσες, για την σύνθεση πολύτιμων χειρόμορφων ενδιαμέσων.

Στο **Κεφάλαιο 1** παρουσιάζεται η διαδικασία ανάπτυξης και απομόνωσης ανασυνδυασμένων κυττάρων E.coli, που περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν δυο νέες αλκοολικές αφυδρογονάσες, την RasADH και την SyADH. Τα κύτταρα απομονώθηκαν λυοφιλοποιήθηκαν και δοκιμάστηκαν σε περαιτέρω πειράματα για την δραστικότητά τους.

Στο **Κεφάλαιο 2** παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση του επιμερούς του φυσικού προϊόντος (*R)*-rugulactone. Οι α-πυρόνες αποτελούν αναστολείς του πυρηνικού παράγοντα NF-kB που σχετίζεται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Ως στάδιο κλειδί για την σύνθεση του κύριου ενδιάμεσου, αποτελεί η εκλεκτική ενζυμική αναγωγή ενός άλλυλο εστέρα.

Τέλος, στο **Κεφάλαιο 3** παρουσιάζεται η μελέτη της εναντιοεκλεκτικής αναγωγής α-νιτριλό-β-κετοεστέρων με χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών προς σχηματισμό οπτικά ενεργών, υψηλής αξίας ενδιαμέσων. Οι α-νιτριλό-β-υδροξυεστέρες μπορούν να κυκλοποιηθούν, δίνοντας τις αντίστοιχες χειρόμορφες γ-λακτάμες.

Abstract

The present thesis consists of three Chapters, in which the stereoselective enzymatic reactions using NADPH-dependent alcohol dehydrogenases for the synthesis of valuable chiral intermediates, were studied.

Chapter 1 presents the process of developing and isolating recombinant E.coli cells, containing genes encoding two new alcohol dehydrogenases, RasADH and SyADH. The isolated cells were lyophilized and tested for their activity in further experiments.

Chapter 2 presents the chemoenzymatic synthesis of the epimer of the natural product (*R)*-rugulactone. The α-pyrones are inhibitors of the nuclear facton NF-kB associated with various cellular functions. The key step for the synthesis of the main intermediate, is the selective enzymatic reduction of an allyl ester.

Finally, Chapter 3 presents the study of the enantioselective reduction of α-nitrile-β-ketoesters using isolated ketoreductases to form optically active, high value intermediates. The -nitrile-β-hydroxyesters can be cyclized to give the corresponding chiral γ-lactams

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βιοκατάλυση στην οργανική σύνθεση 13-15

Ορισμένες εφαρμογές Βιοκατάλυσης σε βιομηχανικες συνθετικες πορείες..... 16-17

Ταξινόμηση ενζύμων και κετορεδουκτασών..... 17-20

Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες και αναγέννηση συνενζύμου 20-21

Κετορεδουκτάσες στην ασύμμετρη σύνθεση 21-24

Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών 25-26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Εισαγωγή..... 28-29
   1.1 RasADH 29-30
   1.2 Καταλυτικός μηχανισμός της RasADH 30-32
   1.3 Καταλυτικές εφαρμογές των νέων αλκοολικών αφυδρογονασών RasADH και SyADH. 32-35
   1.4 Τεχνικές και μέθοδοι για την υπερέκφραση και απομόνωση των ενζύμων από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli 36
      1.4.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων και επαγωγή πρωτεϊνών … 36-45
      1.4.2 Λύση κυττάρων και περαιτέρω καθαρισμός της SyADH . 45-53
   1.5 Προσπάθειες εύρεσης βέλτιστων συνθηκών για ενζυμικές βιομετατροπές με τις νέες αλκοολικές αφυδρογονάσες 53-59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Χημειοενζυμική σύνθεση του επιμερούς του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone. 61-66
2.2 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων 67-78
2.3 Πειραματικός μέρος 79-85

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}HNMR ΚΑΙ ^{13}CNMR 85-95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές για την σύνθεση χειρόμορφων γ-λακταμών..... 97-100
3.2 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων 101-109
3.3 Πειραματικό μέρος 110-115

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}HNMR, ^{13}CNMR ΚΑΙ GC 116-132

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 133-136

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βιοκαταλυση στην οργανικη σύνθεση

Υπάρχουν λίγα επιστημονικά πεδία τα οποία έχουν επωφεληθεί σε τόσο μεγάλο βαθμό, από την τεχνολογική πρόοδο, όσο ο τομέας της Βιοκατάλυσης και της Βιοτεχνολογίας. Πριν από 25 χρόνια, στα περισσότερα συνθετικά ερευνητικά εργαστήρια, η έννοια της βιοκατάλυσης περιοριζόταν σε απλές βιομετατροπές καταλυόμενες κυρίως από υδρολάσες. Ωστόσο υπήρξαν ορισμένες ερευνητικές ομάδες που εμβάθυναν μελετώντας περισσότερα βιοκαταλυτικά συστήματα. Ελάχιστες όμως βιοκαταλυτικές διεργασία ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς υπήρχε το σημαντικό πρόβλημα της διαθεσιμότητας των ενζύμων.

Σήμερα υπάρχει μια τεράστια ποικιλία ενζύμων, διαθέσιμα σε μεγαλύτερες ποσότητες, πράγμα που οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη της πρωτεϊνικής μηχανικής, της κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών (Directed Evolution) και του στοχευμένου in silico σχεδιασμού μέσω της βιοπληροφορικής, για τη μεθοδευμένη σύνθεση γονιδίων και την παραγωγή ενζύμων.

Η Βιοκατάλυση θεωρείται ευρέως ως μία από τις τεχνολογίες αιχμής που εκπληρούν τις 12 αρχές της Πράσινης Χημείας.[1] Ακόμη η αντικατάσταση των χημικών καταλυτών που συνήθως αποτελούν σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης,[2] με περιβαλλοντικά αποδεκτούς βιοκαταλύτες (ένζυμα) οδηγεί στην ανάγκη μεταβολής των παραγωγικών προτύπων και στην εφαρμογή των αρχών της Πράσινης Χημείας, σύμφωνα με τις νέες απαιτήσεις. (**Πίνακας 1**)

Πίνακας 1: Σύνδεση Βιοκατάλυσης με Πράσινη Χημεία.

Αρχές Πράσινης Χημείας	Βιοκατάλυση
1. Πρόληψη αποβλήτων	Μείωση αποβλήτων με καινοτόμα βιοκαταλυτικά συστήματα.
2. Οικονομία ατόμων	Αποδοτικότερες βιοκαταλυτικές συνθετικές πορείες
3. Χρήση λιγότερων επιβλαβών ουσιών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον	Γενικά χαμηλά επίπεδα τοξικότητας
4. Σχεδιασμός λιγότερων τοξικών ουσιών	-

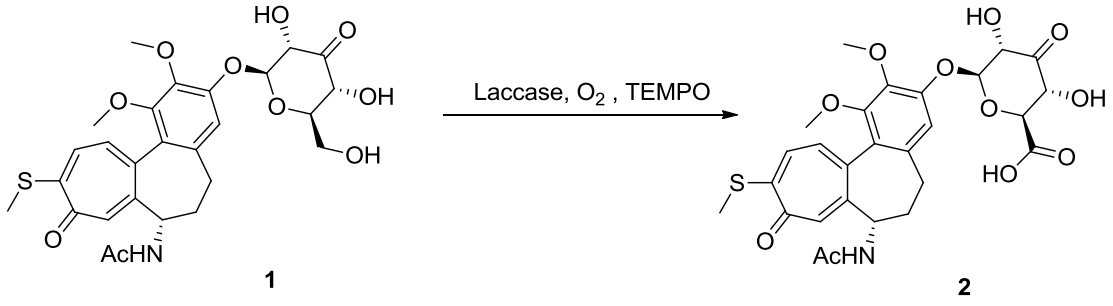
5. Πιο ασφαλείς διαλύτες	Κυρίως υδατικά διαλύματα
6. Ενεργειακά αποδοτικά συστήματα	Θερμοκρασίες ελαφρώς υψηλότερες από θερμοκρασία δωματίου
7. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες	Ανανεώσιμοι βιοκαταλύτες
8. Η άσκοπη παραγωντοποίηση πρέπει να αποφεύγεται.	Η εκλεκτικότητα των ενζύμων συχνά αποτρέπει την ανάγκη για παραγοντοποίηση
9. Τα καταλυτικά αντιδραστήρια είναι προτιμότερα από τα στοιχειομετρικά	Εξ ορισμού χρήση ενζύμων
10. Οι χημικές ουσίες πρέπει στο τέλος της χρήσης τους να βιοαποικοδομούνται	Περιβαλλοντικά αποδεκτοί βιοκαταλύτες
11. Παρακολούθηση μιας διεργασίας σε πραγματικό χρόνο για τον έγκαιρο έλεγχο πριν από το σχηματισμό επικίνδυνων ουσιών	-
12. Σωστά επιλεγμένες χημικές ουσίες για την μείωση των χημικών ατυχημάτων	Ήπιες συνθήκες ενζυμικών αντιδράσεων

Τα *ένζυμα* είναι εξειδικευμένα πρωτεϊνικά μόρια στους ζωντανούς οργανισμούς που συμπεριφέρονται ως καταλύτες στις βιολογικές διεργασίες και σε χημικές αντιδράσεις. Όπως όλοι οι καταλύτες, αυξάνουν τον ρυθμό μιας χημικής αντίδρασης χωρίς να μεταβληθούν τα ίδια, πετυχαίνοντας ταχύτητες της τάξης του 10^8-10^{10}. Δρουν σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την πιθανότητα δημιουργίας ανεπιθύμητων προϊόντων. Ακόμη εμφανίζουν επιδεκτικότητα σε πληθώρα φυσικών και μη φυσικών υποστρωμάτων χωρίς να περιορίζονται στο φυσικό τους ρόλο. Είναι συμβατά μεταξύ τους αφού τα περισσότερα είναι δραστικά κάτω από τις ίδιες ή παρόμοιες συνθήκες αντίδρασης, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα αντιδράσεων στην ίδια φιάλη χωρίς απομόνωση ενδιαμέσων.

Η δυνατότητα τους να καταλύουν χημικές μετατροπές με υψηλή **χημειο-**, **τοπο-**, και **στερεοεκλεκτικότητα**, σε ρυθμιστικά διαλύματα, τα καθιστά σημαντικότατο εργαλείο στη διάθεση ενός οργανικού χημικού.

α) χημειο-εκλεκτικότητα

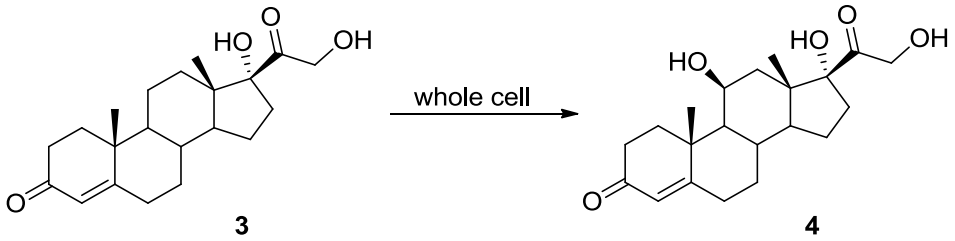
Είναι η ιδιότητα του ενζύμου να επιδρά σε μια συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα και να αφήνει άλλες λειτουργικές ομάδες ανέπαφες. Στο παρακάτω παράδειγμα η ερευνητική ομάδα του Barato[3] μελέτησε την χημειοεκλεκτική οξείδωση του γλυκοσιδίου **1** στην γλουκορονίδη **2** με χρήση απομονωμένης λακκάσης (**Σχήμα 1**).



Σχήμα 1: Εκλεκτική οξείδωση του **1**.

β) τοπο- και στερεοεκλεκτικότητα

Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες, οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος (**τοποεκλεκτικότητα**), αλλά ακόμη και εναντιο- ή διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου (**στερεοεκλεκτικότητα**). Μια από τις σημαντικότερες βιομετατροπές στην ιστορία της βιοκατάλυσης είναι η σύνθεση της υδροκορτιζόνης **4**, στα τέλη του 1940, με μια υδροξυλίωση από ολόκληρα κύτταρα (**Σχήμα 2**).[4]



Κορτιζόνη Υδροκορτιζόνη

Σχήμα 2: Τοπο- και στερεοεκλεκτική υδροξυλίωση του **3**.

Μέχρι τότε η ολική σύνθεση του **4** απαιτούσε 40 συνθετικά βήματα και επιτεύχθηκε από τον καθηγητή R.B. Woodward (βραβείο Nobel Χημείας 1965), ενώ ήταν ο μόνος τρόπος παραγωγής αυτού του σημαντικού φαρμάκου και πολύτιμου ενδιαμέσου.[5] Σήμερα υπάρχει η τεχνογνωσία ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί βιοκαταλυτικά εκλεκτική υδροξυλίωση σε οποιαδήποτε θέση του σκελετού του στεροειδούς..[6]

Ορισμένες εφαρμογές Βιοκατάλυσης σε βιομηχανικές συνθετικές πορείες

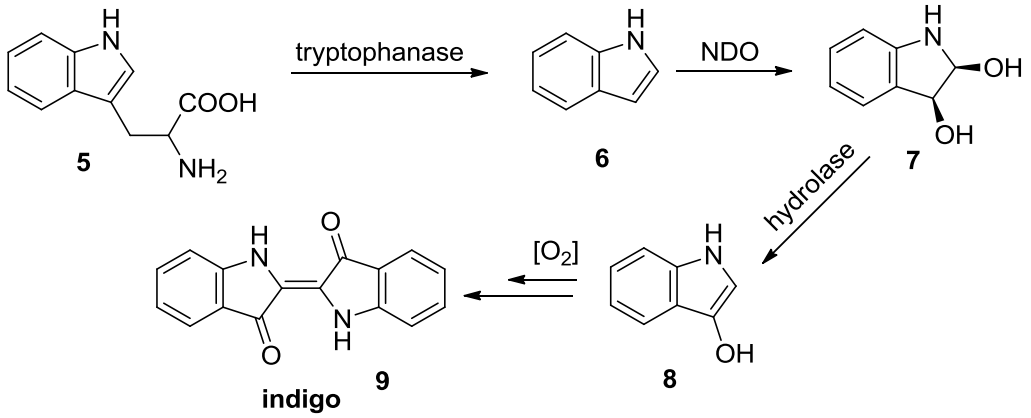
Η εφαρμογή ολόκληρων κυττάρων ή απομονωμένων ενζύμων στην χημική βιομηχανία αναπτύσσεται ραγδαία, και πολλές εταιρίες επενδύουν τεράστια ποσά στη λεγόμενη *άσπρη βιοτεχνολογία,* τον κλάδο δηλαδή της βιοτεχνολογίας που σχετίζεται με το σχεδιασμό μεγάλων εγκαταστάσεων παραγωγής προϊόντων από γενετικά τροποποιημένους ή όχι μικροοργανισμούς.

Οι περισσότερες βιοκαταλυτικές διεργασίες στοχεύουν σε νέες ενώσεις οι οποίες είναι δύσκολο να συντεθούν με τους κλασσικούς τρόπους σύνθεσης. Για να υιοθετηθεί στη βιομηχανία η αντικατάσταση μια συνθετικής πορείας από μια βιοκαταλυτική διαδικασία, θα πρέπει το προϊόν να είναι ίδιας η καλύτερης ποιότητας, και να παράγεται με χαμηλότερο κόστος με την καινούργια διεργασία.

Το indigo είναι η βαφή που χρησιμοποιείται για το χαρακτηριστικό μπλε βάψιμο των τζινς και υπολογίζεται πως απαιτούνται περίπου 17.000 τόνοι ετησίως για την κάλυψη της παγκόσμιας βιομηχανίας. Οι φυσικές πηγές όπου μπορεί κανείς να αντλήσει το indigo και τα παράγωγα του είναι από εκχυλίσεις φυτών και ζώων (π.χ θαλάσσιο σαλιγκάρι *Hexaplex trunculus*).

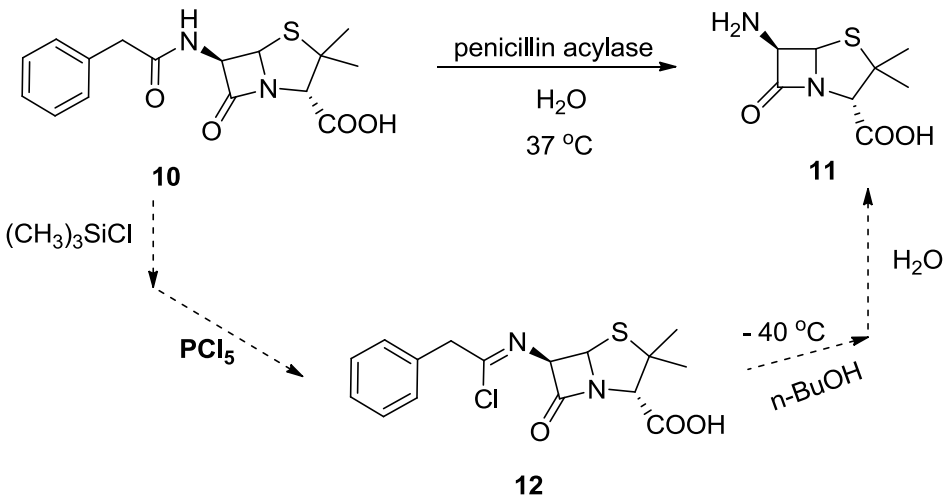
Σήμερα το indigo παράγεται σε βιομηχανικό επίπεδο ξεκινώντας από την N-φαίνυλογλυκίνη. Η σύνθεση περιλαμβάνει πολλά στάδια και υψηλές θερμοκρασίες (900 ^{o}C). Το 2002 η Genecor ανέπτυξε μια νέα, φιλική προς το περιβάλλον σύνθεση του indigo **9** (**Σχήμα 3**), βασιζόμενη στη ζύμωση της γλυκόζης, χρησιμοποιώντας γενετικά τροποποιημένα κύτταρα E.Coli.[7] Αρχικά τροποποιήθηκε το μεταβολικό μονοπάτι της τρυπτοφάνης για την ποσοτική παραγωγή του ινδολίου **6**, ενώ το ανασυνδυασμένο DNA περιείχε και γονίδια τα οποία κωδικοποιούσαν την διοξυγενάση του ναφθαλένιου (NDO). Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση του **6**

στην αντίστοιχη διόλη **7** η οποία με την σειρά της αφυδατώνεται προς την ένωση **8**. Η διαδικασία αυτή έγινε και σε μεγαλύτερη κλίμακα (300.000 λίτρα).



Σχήμα 3: Νέο βιοκαταλυτικό μονοπάτι για την παραγωγή του indigo.

Ακόμη μία βιοκαταλυτική διαδικασία που επιτυχημένα αντικατέστησε μια χημική σύνθεση είναι η βιομετατροπή της πενικιλλίνης G **10** στην ένωση **11**, η οποία είναι σημαντικό ενδιάμεσο για όλα τα πενικιλινούχα φάρμακα. Η ένωση **11** παράγεται σε περισσότερο από 1000 τόνους ετησίως με αυτή την διαδικασία.[8]



Σχήμα 4: Χημική και βιοκαταλυτική μετατροπή της ένωσης **10** στο οξύ **11**.

Ταξινόμηση ενζύμων και κετορεδουκτάσες

Τα ένζυμα ταξινομούνται σε έξι κύριες ομάδες, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει υποκατηγορίες ενζύμων. (**Πίνακας 2**)

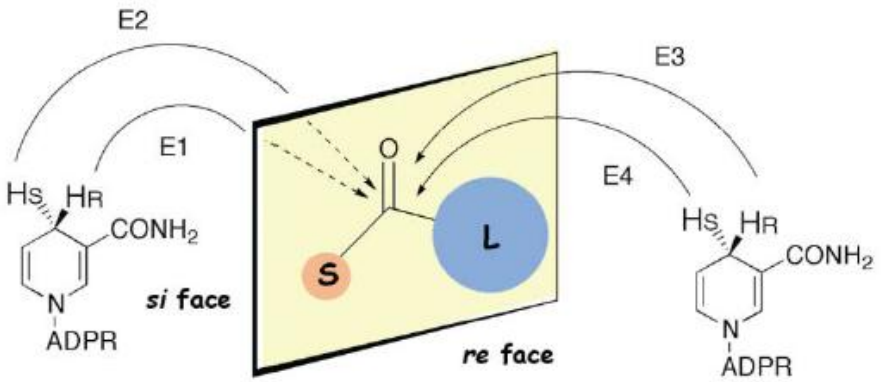
Πίνακας 2: Ταξινόμηση ενζύμων.

Ομάδα	Ένζυμα
Οξειδοαναγωγάσες	Αφυδρογονάσες, Οξειδάσες, Καταλάσες, Οξυγενάσες, Υπεροξειδάσες, Υδροξυλάσες
Τρανσφεράσες	Τρανσαλδολάσες, Τρανσκετολάσες, Κινάσες, Φωσφομουτάσες
Υδρολάσες	Εστεράσες, Αμιδάσες, Θειολάσες, Λιπάσες, Φωσφατάσες, Πεπτιδάσες, Γλυκοζιδάσες, Απαμινάσες κ.α.
Λυάσες	Αλδολάσες, Υδρολάσες, Αποϋδρολάσες
Ισομεράσες	Ρακεμάσες, Μουτάσες
Συνθετάσες	Συνθετάση του γλουταμινικού κ.α .

Οι κετορεδουκτάσες ανήκουν στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών και καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου από ένα υπόστρωμα δότη ηλεκτρονίων σε ένα άλλο υπόστρωμα δέκτη ηλεκτρονίων. Είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μονομερή ένζυμα, όμως σε μικρό ποσοστό έχουν απομονωθεί και τετραμερείς κετορεδουκτάσες, κυρίως από θηλαστικά.[9] Τα ένζυμα αυτά για να δράσουν απαιτουν την παρουσία ενός ή περισσοτέρων συμπαραγόντων (μέταλλο, συνένζυμο ή προσθετική ομάδα), οι οποίοι συμπεριφέρονται ως ενδιάμεσοι και μεταβατικοί δέκτες ηλεκτρονίων.

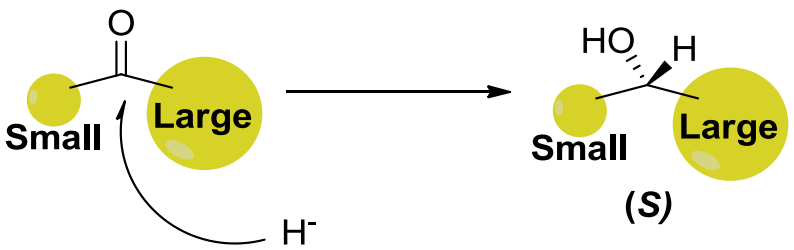
Ένα ευρύ φάσμα κετονών μπορεί να αναχθεί στερεοεκλεκτικά προς χειρόμορφες δευτεροταγείς αλκοόλες χρησιμοποιώντας αλκοολικές αφυδρογονάσες. Κατά την ενζυμική αντίδραση αναγωγής, μεταφέρεται το υδρίδιο του πυριδινικού δακτυλίου του συνενζύμου είτε από την si-επιφάνεια είτε από την re-επιφάνεια της κετόνης, σχηματίζοντας αντίστοιχα, τις (*R*) - ή (*S*) - αλκοόλες (**Σχήμα 5**). Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα.[10] Τα ένζυμα της κατηγορίας E1 και E2, με τα οποία η προσβολή του υδριδίου γίνεται από την si-επιφάνεια της καρβονυλομάδας, και τα

ένζυμα E3 και E4, με τα οποία η προσβολή γίνεται από την re- επιφάνεια, προκύπτοντας αντίστοιχα οι *R* και *S* αλκοόλες (**Σχήμα 5**). Μηχανιστικά τα ένζυμα που ανήκουν στις E1 και E2 κατηγορίες μεταφέρουν το pro-(*R*)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ αυτά των E3 και E4 το pro-(*S*)-υδρίδιο.



Σχήμα 5: Αναγωγή του καρβονυλίου απο το NADPH.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, το στερεοχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο, αναφερόμενο ως *κανόνας του Prelog* (**Σχήμα 6**).[11]



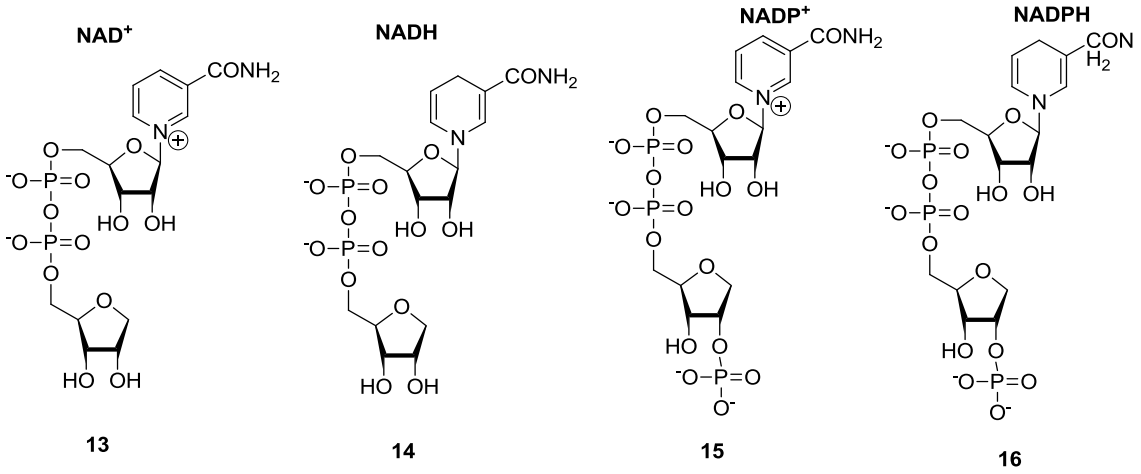
Σχήμα 6: Κανόνας του Prelog για την ασύμμετρη αναγωγή των κετονών.

Ο κανόνας προέκυψε από το στερεοχημικό αποτέλεσμα μικροβιακών αναγωγών με την Curvularia falcata, όπου σύμφωνα με τον Prelog αυτή η αφυδρογονάση μεταφέρει

το ιόν υδριδίου στην re-επιφάνεια μιας προχειρόμορφης κετόνης οπότε προκύπτει η (*S*)-αλκοόλη. Οι περισσότερες εμπορικά διαθέσιμες αφυδρογονάσες, όπως η Yeast Alcohol Dehydrogenase (YADH), η Horse Liver Alcohol Dehydrogenase (HLADH) και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, όπως baker's yeast ακολουθούν τον κανόνα του Prelog, για την στερεοειδική αναγωγή κετονών. Λίγα απομονωμένα ένζυμα αυτής της οικογενείας εμφανίζουν anti-Prelog εκλεκτικότητα κατά την αναγωγή.

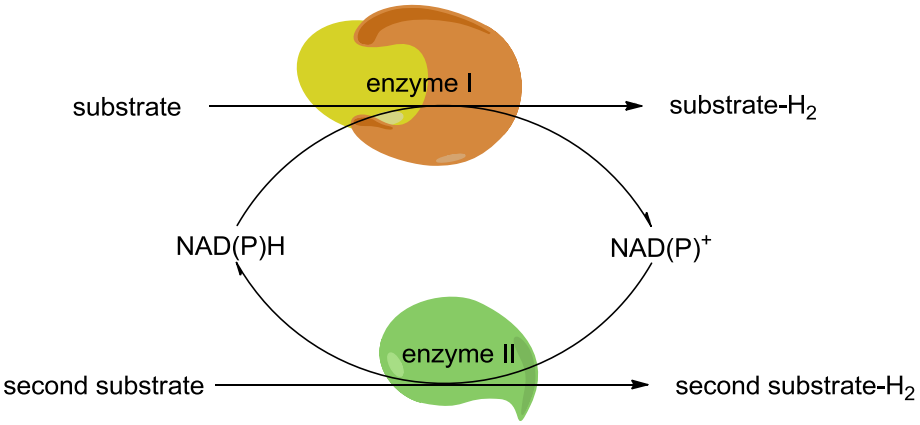
Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες και αναγέννηση συνενζύμου

Ο συνδυασμός συμπαράγοντα και ενζύμου, δίνει την λειτουργική μορφή που είναι το *ολοένζυμο*. Τα περισσότερα οξειδοαναγωγικά ένζυμα χρησιμοποιούν ως συμπαράγοντα το νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD^+) ή το 2-φωσφορυλιωμένο άλας ($NADP^+$). Ο πυριδινικός δακτύλιος των παραπάνω ενώσεων είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, και μπορεί να δεχτεί ένα υδρίδιο για τον σχηματισμό αντίστοιχα των NADH και NADPH. (**Σχήμα 7**)



Σχήμα 7: Νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο και η 2-φωσφορυλιωμένη μορφή του.

Η αναγέννηση του συμπαράγοντα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην βιομηχανική βιοκατάλυση, αφού συχνά η διαδικασία αναγέννησης κοστίζει περισσότερο από το ίδιο το προϊόν.[12] Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση του NADH και NADPH. Το σύστημα που πλεονεκτεί είναι αυτό με τη χρήση δύο ανεξάρτητων ενζύμων (Coupled-Enzyme Approach). (**Σχήμα 8**)



Σχήμα 8: Αναγέννηση NADP(H) με δύο ένζυμα και βοηθητικό υπόστρωμα.

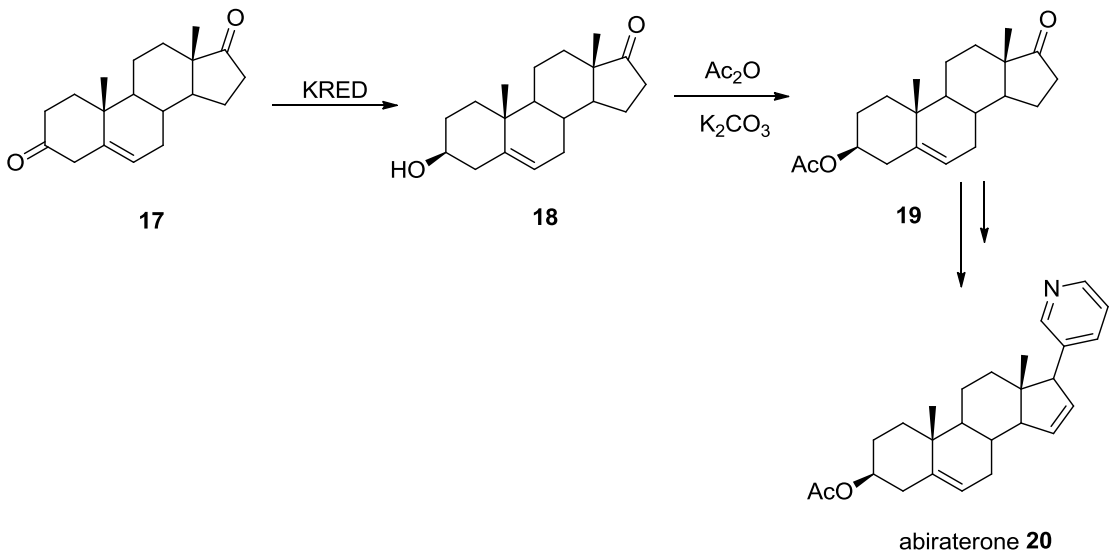
Σε αυτή τη διαδικασία γίνονται παράλληλα δυο οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις από δύο διαφορετικά ενζυμα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 8**.[13] Για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν πιο αποδοτικό σύστημα, πρέπει και τα δύο ένζυμα να εμφανίζουν εξειδίκευση για τα αντίστοιχα υποστρώματά τους, έτσι ώστε να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα δύο ανεξάρτητες ενζυμικές αντιδράσεις όπου τα δύο υποστρώματα δεν ανταγωνίζονται για την θέση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που πρόκειται να πραγματοποιήσει τον μετασχηματισμό.

Κετοredουκτάσες στην ασύμμετρη σύνθεση

Όπως έχει αναφερθεί, η χειρομορφία είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την βιολογική δραστικότητα πολλών φυσικών προϊόντων και φαρμάκων. Για το λόγο αυτό οι φαρμακευτικές βιομηχανίες αναζητούν ολοένα και περισσότερους καταλύτες για τη σύνθεση οπτικώς ενεργών ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια οι κετοredουκτάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ασύμμετρη σύνθεση. Απόδειξη αποτελεί η ολοένα και αυξανόμενη χρήση τους στην σύνθεση φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Παρακάτω αναφέρονται μερικά πρόσφατα χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής των κετοredουκτασών στην ασύμμετρη σύνθεση.

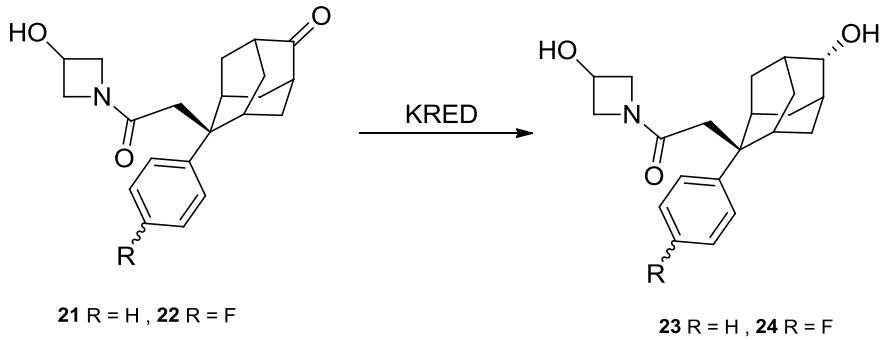
Το 2016 δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό Organic Process Research and Development μια ερευνητική εργασία, η οποία είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών ερευνητικών ομάδων και αφορά την σύνθεση της ακετυλο διυδροεπιανδροστερόνης **19**. Η ένωση αυτή αποτελεί χειρόμορφο ενδιάμεσο για την σύνθεση του φαρμάκου abiraterone **20**, που χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση του

καρκίνου του προστάτη.[14] Στο καθοριστικό συνθετικό στάδιο πραγματοποιείται ενζυμική αναγωγή της ένωσης **17** χρησιμοποιώντας απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Η χημειοενζυμική σύνθεση του οπτικά καθαρού προϊόντος **18** (de >99%, ee >99%) εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία στην χημική βιομηχανία . (**Σχήμα 9**)



Σχήμα 9: Χημειοενζυμική σύνθεση της abiraterone **20**.

Ακόμη μια εντυπωσιακή εργασία είναι εκείνη της ερευνητικής ομάδας του Patel,[15] η οποία εφαρμόστηκε και σε μεγάλη κλίμακα στην εταιρία Bristol-Myers-Squibb. (**Σχήμα 10**)



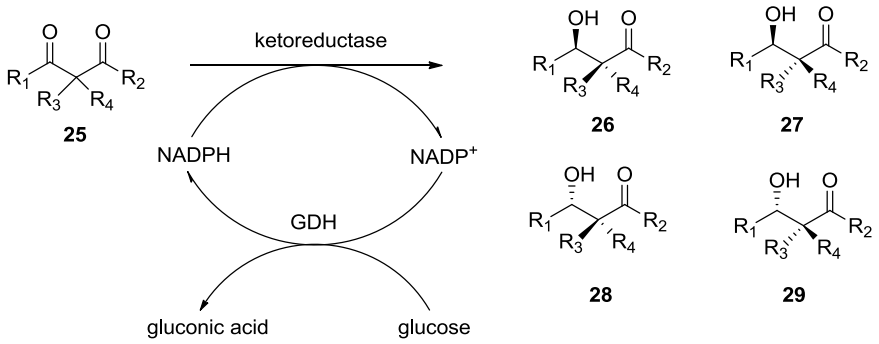
Σχήμα 2: Βιοαναγωγή των υποστρωμάτων 21 και 22, προς σχηματισμό των αντίστοιχων υδρόξυ ενώσεων .

Η 11-*β*-υδρόξυ στεροειδής αφυδρογονάση (11-*β*-hsd1), καταλύει την αναγωγή της κορτιζόνης σε κορτιζόλη. Η κορτιζόλη αλληλεπιδρά με τα γλυκοκορτικοειδή στους ανθρώπινους ιστούς επηρεάζοντας πολλά μεταβολικά μονοπάτια. Ενώσεις που

αναστέλλουν το ένζυμο αυτό (όπως οι ενώσεις **23** και **24**) βρίσκονται στο επίκεντρο πολλών ερευνητικών ομάδων, καθώς σχετίζεται με πολλών τύπου ασθένειες.[16-18]

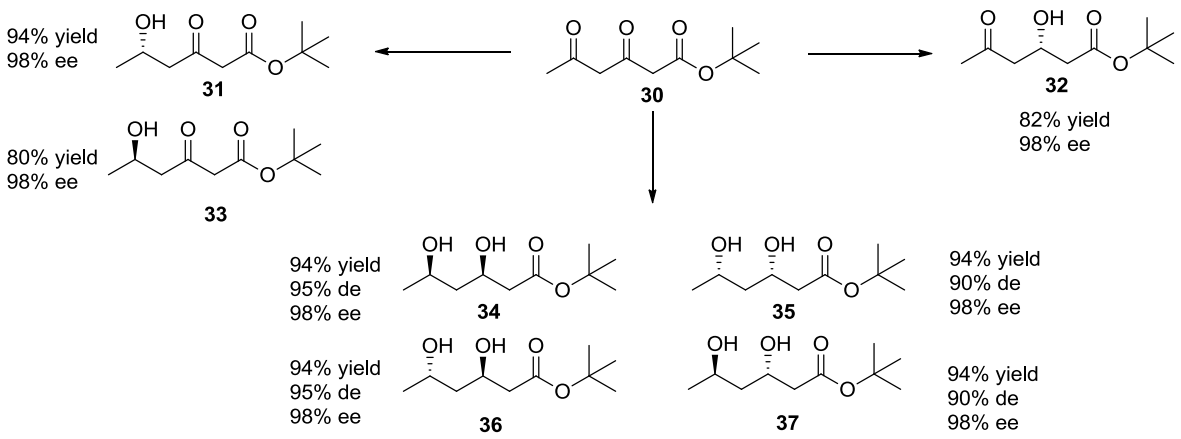
Προηγούμενες μελέτες βιοαναγωγών από την ερευνητική μας ομάδα

Στην ερευνητική μας ομάδα τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί περισσότερο τα τελευταία χρόνια είναι οι κετορεδουκτάσες (KRED). Το 2005 για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε η διαστερεο- και εναντιοεκλεκτική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονων και α-αλκυλο-β-κετοεστέρων με χρήση 20 εμπορικά διαθέσιμων NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών σε υψηλα ποσοστά μετατροπής και εξαιρετική εναντιοεκλεκτική και σιαστερεοεκλεκτική περίσσεια. (**Σχήμα 11**)[19] Σε κάθε περίπτωση εφαρμόστηκε το ανακυκλωτικό σύστημα αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH) / γλυκόζη, για την ανακύκλωση του NADPH.



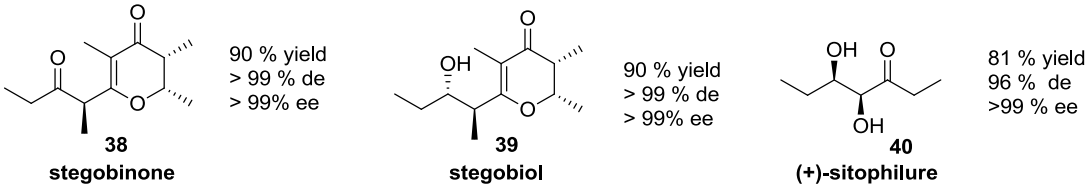
Σχήμα 3 : Ενζυμική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-β-κετο εστέρων με NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.

Το 2012, πραγματοποιήθηκε μελέτη ενζυμικών αναγωγών πιο πολύπλοκων υποστρωμάτων και συγκεκριμένα των β,δ-δικετο εστέρων. Τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας έναν από τους πιο απλούς δικετοεστέρες, τον 3,5-διοξοεξανοϊκό τριτ-βουτυλεστέρα. (**Σχήμα 12**) Με χρήση 23 εμπορικά διαθέσιμων απομονωμένων κετορεδουκτασών, έγινε δυνατή η σύνθεση των 7 από τα 8 στερεοϊσομερή προϊόντα αναγωγής, με εξαιρετικά υψηλή οπτική καθαρότητα. Επιπλέον, πραγαματοποιήθηκε με επιτυχία η σύνθεση των τεσσάρων στερεοϊσομερών διυδρόξυ εστέρων σε μια φιάλη (one pot),[20] με συνδυασμό των κατάλληλων κάθε φορά ενζύμων, χωρίς απομόνωση του ενδιάμεσου προϊόντος απλής αναγωγής.



Σχήμα 4: Τα 7 από τα 8 στερεοϊσομερή προϊόντα της αναγωγής του 3,5-διοξοεξανοϊκό τριτ-βουτυλεστέρα, **30**.

Οι βιοκαταλυτικές αυτές μέθοδοι έχουν ήδη εφαρμοστεί στη χημειοενζυμική σύνθεση φυσικών προϊόντων, όπως τα προϊόντα Stegobinone,[21] Stegobiol[21] και Sitophilure.[22]

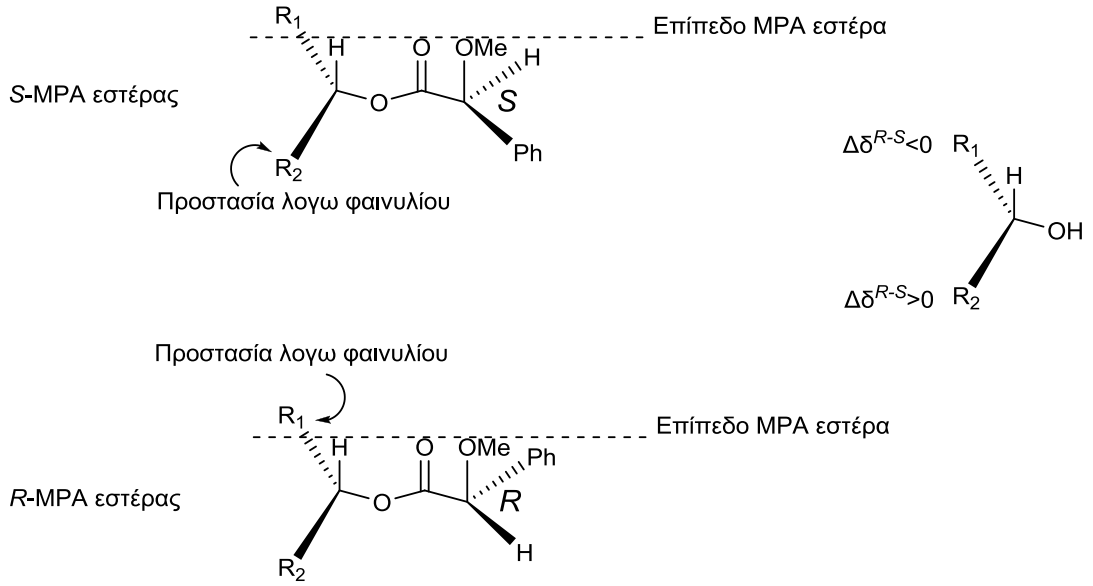


Οι κετορεδουκτάσες έχουν χρησιμοποιηθεί στην ασύμμετρη σύνθεση κυρίως σε απομονωμένη μορφή και όχι ως ολόκληρα κύτταρα. Αν και η χρήση ολόκληρων κυττάρων για βιοαναγωγή είναι μια διαδικασία πιο οικονομική, τα προηγούμενα χρόνια δεν είχε προτιμηθεί από την επιστημονική κοινότητα. Ένας από τους κύριους λόγους που συνέβαινε αυτό είναι πως στα πειράματα με ολόκληρα κύτταρα υπάρχει μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας παραπροϊόντων από τα άλλα ένζυμα που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο ξενιστή και συμβάλλουν στις δικές του ανάγκες. Με την ανάπτυξη ωστόσο της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια, υπάρχει η δυνατότητα υπερέκφρασης του γονιδίου που μας ενδιαφέρει μέσα στο κύτταρο ξενιστή, με αποτέλεσμα κάθε άλλου είδους ένζυμο μέσα στο κύτταρο να αποτελεί λιγότερο από 1%.

Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων βασίζεται ολοένα και περισσότερο σε απλές και αξιόπιστες μεθόδους. Η κλασσική μέθοδος ανισοτροπίας, την οποία εισήγαγαν και αξιοποίησαν οι Dale και Mosher,[23] ο Trost και οι συνεργάτες του[24] και άλλοι ερευνητές[25] συνεχίζει να αποτελεί την απλούστερη και πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων στο φάσμα ^{1}H NMR των δυο διαστερεομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δύο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστηρίου ανισοτροπίας, όπως το α-μεθοξυ-α-τριφθορομεθυλο-φαινυλοξικό οξύ (MTPA) ή το α-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA).

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα διαμόρφωσης για διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας που να εξηγούν τα φάσματα ^{1}H NMR και να προβλέπουν την απόλυτη στερεοχημεία των ενώσεων. Το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την εύρεση της απόλυτης στερεοδομής των δευτεροταγών αλκοολών, ήταν το α-μεθοξυ φαινυλοξικό οξύ (MPA).



Σχήμα 13. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (R)-MPA και (S)-MPA εστέρες δευτεροταγών αλκοολών.

Το μοντέλο διαμόρφωσης που προτείνεται για το αντιδραστήριο αυτό φαίνεται στο **Σχήμα 13**. Μετά την εστεροποίηση της δευτεροταγούς αλκοόλης και με

τα δυο εναντιομερή του MPA, η διαμόρφωση των MPA-εστέρων βρίσκει το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και την μεθόξυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι κάθε ομάδα της αλκοόλης (R_1, R_2) έχει απέναντί της ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, είτε υδρογόνο, είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα, η ομάδα R_1 του (*R*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα φαινύλιο, ενώ η R_2 ένα υδρογόνο. Αντιθέτως, η ομάδα R_1 του (*S*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η R_2 ένα φαινύλιο.

Γενικά οι ομάδες οι οποίες είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα ^{1}H NMR, λόγω προστασίας. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομάδα R_1 του (*R*)-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλότερα ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη του (*S*)-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις στο φάσμα ^{1}H NMR για την ομάδα R_1 μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι αρνητική ($\Delta\delta^{R-S}<0$).

Αντιθέτως, η ομάδα R_2, στον (*S*)-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με την αντίστοιχη του (*R*)-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις για την ομάδα R_2 μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι θετική ($\Delta\delta^{R-S}>0$). Εξαιτίας των διαφοροποιήσεων αυτών στο φάσμα ^{1}H NMR μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοχημείας των δευτεροταγών αλκοολών.

Η μέθοδος αποδείχτηκε ικανοποιητική για τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς όλες οι κορυφές και οι διαφορές στις μετατοπίσεις ήταν ευδιάκριτες. Επίσης οι διαφορές στις μετατοπίσεις των κορυφών ανάμεσα στα δυο φάσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απόκλιση από το μοντέλο. Εκτός της αξιοπιστίας και της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αυτής, σημαντικά πλεονεκτήματά της είναι και η ευκολία και η ταχύτητα της. Όλα αυτά την καθιστούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής χειρόμορφων δευτεροταγών αλκοολών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1

1.Εισαγωγή

Οι αλκοολικές αφυδρογονάσες έχουν χρησιμοποιηθεί από την επιστημονική κοινότητα αλλά και από την βιομηχανία, για την ασύμμετρη αναγωγή προχειρόμορφων καρβονυλομάδων σε οπτικά ενεργές δευτεροταγείς αλκοόλες.[26] Δυστυχώς, πολλά από τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν περιορισμό στο μέγεθος των καρβόνυλο ενώσεων που δέχονται ως υποστρώματα, καθώς όσο μεγαλώνουν οι υποκαταστάτες, δεξιά και αριστερά του προχειρόμορφου κέντρου, αυξάνεται το υδρόφοβο μέρος του υποστρώματος, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι αλληλεπιδράσεις με το υδρόφιλο τμήμα του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει, πως οι περισσότερες αλκοολικες αφυδρογονάσες προτιμούν ως υποστρώματα, μικρού όγκου κετόνες (small-bulky), δηλαδή κετόνες όπου ο ένας από τους δυο υποκαταστάτες είναι μικρός[27] ώστε να μην υπάρχουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις μεταξύ υποστρώματος και ενεργού κέντρου. Μέχρι στιγμής στην βιβλιογραφία αναφέρονται πολύ λίγα παραδείγματα βιοαναγωγής κετονών που φέρουν δύο ογκώδεις υποκαταστάτες (bulky-bulky) εκατέρωθεν του καρβονυλίου, χρησιμοποιώντας ολόκληρα κύτταρα[28] ή απομονωμένα ένζυμα.[29] Στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν τέτοιου είδους μικροοργανισμοί ή ένζυμα, στόχος δεν ήταν να βρεθεί ένας βιοκαταλύτης κατάλληλος για μεγάλο εύρος ογκωδών υποστρωμάτων, αλλά η στοχευμένη εφαρμογή του για την αναγωγή συγκεκριμένων προχειρόμορφων κετονών, που αποτελούν υψηλής αξίας οπτικά ενεργά συνθετικά ενδιάμεσα.[30]

Την τελευταία δεκαετία, από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας έχει γίνει εκτενής μελέτη βιοκαταλυτικών αναγωγών πλήθους κορεσμένων δικετονών, β-κετοεστέρων και β,δ-δικετοεστέρων με απομονωμένες κετοredουκτάσες.[31] Τα περισσότερα από τα υποστρώματα που μελετήθηκαν είναι τύπου «small-small» και «bulky-small», και περιγράφηκαν αναλυτικότερα στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής.

Ωστόσο, για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση πολυπλοκότερων συνθετικών στόχων, μέσω χημειοενζυμικής προσέγγισης με σημαντικά βήματα βιοαναγωγής, απαιτείται η χρήση ενζύμων, που είναι κατάλληλοι καταλύτες για αναγωγή πιο ογκωδών υδρόφοβων υποστρωμάτων.

Στα πλαίσια επιστημονικής συνεργασίας με την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Wolfgang Kroutil, δόθηκε η δυνατότητα να δοκιμαστούν δύο νέες αλκοολικές

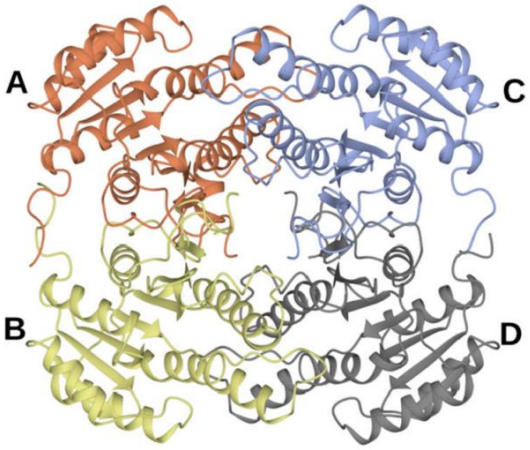
αφυδρογονάσες, οι οποίες έχουν πρόσφατα εκφραστεί και περαιτέρω μελετηθεί[32] από την ίδια ομάδα και έχουν δείξει ότι είναι κατάλληλοι βιοκαταλύτες για πολύ στερεοεκλεκτική αναγωγή στερεοχημικά παρεμποδισμένων υποστρωμάτων. Τα ένζυμα αυτά είναι η αλκοολική αφυδρογονάση (RasADH) του στελέχους *Ralstonia* sp. DSM 6428 και η αλκοολική αφυδρογονάση (SyADH) από τον μικροοργανισμό *Sphingobium yanoikuyae* DSM 6900.

1.1 RasADH

Η RasADH είναι μια $NADP^+$-εξαρτώμενη αφυδρογονάση και ανήκει στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών μικρής αλυσίδας ρεδουκτασών (Short-chain Dehydrogenases/Reductases). Παρουσιάζει μια τεταρτοταγή δομή ομοτετραμερών, (**Εικόνα 1**) η αποία μπορεί να περιγραφεί ως ένα διμερές ομοδιμερών όπου σε κάθε υπομονάδα, μια ενιαία *β*-πτυχωτή αποτελούμενη από εφτά παράλληλους *β*-κλώνους, πλαισιώνεται από τρεις *α*-έλικες σε κάθε πλευρά δημιουργώντας μια τύπου Rossmann[33] περιοχή δέσμευσης δινουκλεοτιδίων. Η ταυτοποίησή της βάσει της pair-wise αλληλουχίας, μεταξύ διαφορετικών μελών της οικογένειας SDR, είναι μόλις 15-30%, αλλά όλες οι διαθέσιμες δομές εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με την *α/β* υπερδευτερογενή τοπολογία περιλαμβάνοντας και την αναδιάταξη Rossmann. Τα περισσότερα SDR ένζυμα διαθέτουν μια κύρια δομή 250-350 καταλοίπων, όπου τη συντηρημένη αλληλουχία καλύπτει ένα μεταβλητό TGXXXGXG μοτίβο στο N-τελικό άκρο, ως τμήμα της περιοχής δέσμευσης των νουκλεοτιδίων, ενώ το ενεργό κέντρο περιλαμβάνει μια σημαντικής καταλυτικής σημασίας τετράδα που αποτελείται από κατάλοιπα Asn, Ser, Tyr και Lys.

Τα ένζυμα της SDR οικογένειας είναι NAD^+- είτε $NADP^+$-εξαρτώμενα. Κρυσταλλογραφικές μελέτες από διάφορα NAD^+ και $NADP^+$ εξαρτώμενα ένζυμα έδειξαν μια συνηθισμένη *βαβ* αναδίπλωση στις περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων, όπου στα πρώτα τρία *β* φύλλα και στις δύο *α* έλικες εμπεριέχεται και η περιοχή πρόσδεσης του AMP. Σε αυτήν την συγκεκριμένη περιοχή[34] παρατηρήθηκε πως τα NAD^+ εξαρτώμενα ένζυμα, φέρουν ένα αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Asp στο C-τερματικό άκρο της δεύτερης *β*-αλυσίδας. Το κατάλοιπο αυτό δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τις 2- και 3- υδρόξυ ομάδες της αδενοσίνης της ριβόζης του NAD^+.

Στην αντίστοιχη περιοχή των $NADP^+$ εξαρτώμενων ενζύμων, δεν υπάρχει κατάλοιπο Asp, ωστόσο δημιουργούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την φωσφορική ομάδα που βρίσκεται στο υδροξύλιο του ATP μέσω ενός θετικά φορτισμένου κατάλοιπου Arg.



Εικόνα 1:Η δομή της RasADH ως αποένζυμο, με τις 4 υπομονάδες (A-D) που συγκροτούν το τετραμερές.

1.2 Καταλυτικός μηχανισμός της RasADH

Το ενεργό κέντρο αυτού του ενζύμου περιλαμβάνει τα 4 διατηρημένα κατάλοιπα Asn111, Ser137, Tyr150 και Lys154 από τα οποία, Ser-Tyr-Lys αποτελούν την καταλυτική τριάδα.[35] Στην πλειοψηφία των χαρακτηρισμένων SDRs αυτή η καταλυτική τριάδα εκτείνεται από ένα επίσης διατηρημένο κατάλοιπο Asn (Asn111 στη RasADH). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο κύριος παράγοντας στον οποίο οφείλεται η κατάλυση στην οικογένεια των SDRs είναι το φαινολικό ιόν της Tyr, το οποίο προσλαμβάνει ή προσφέρει (στην οξείδωση ή στην αναγωγή αντίστοιχα) το πρωτόνιο από ή προς το υπόστρωμα. Η οξύτητα της αλυσίδας της Tyr ενισχύεται από το γειτονικό κατάλοιπο Lys, το οποίο μαζί με τον θετικά φορτισμένο νικοτιναμιδικό συμπαράγοντα στην οξειδωμένη του κατάσταση, συνεισφέρει στην ενέργεια Coulomb.[36]

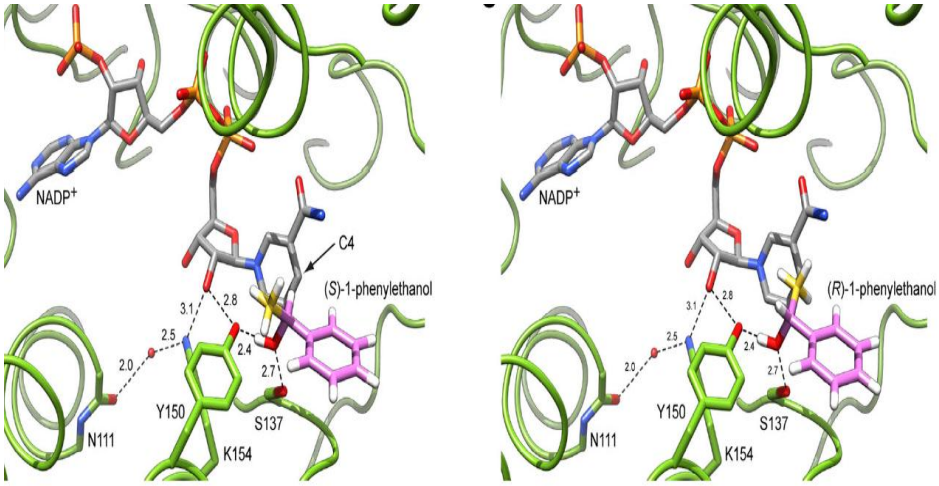
Η ε-αμινομάδα της λυσίνης επίσης εμπλέκεται στη δέσμευση της νικοτιναμιδικής ριβόζης, ενώ κατάλοιπα σερίνης σταθεροποιούν και πολώνουν την καρβονυλομάδα του οξειδωμένου προϊόντος που προέρχεται από την ενζυμική αντίδραση.[37] Ένα κατάλοιπο Asn, παρουσιάζει μία χαρακτηριστική ελικοειδή δίπλωση, και η

καρβονυλομάδα της κύριας ανθρακικής αλυσίδας του, προσδένει ένα μόριο νερού στην πλευρική αλυσίδα της ενεργής περιοχής της λυσίνης, σε απόσταση ενός δεσμού υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύστημα όπου το ένζυμο εκμεταλλεύεται τον μεγάλο όγκο του διαλύτη προς παραγωγή πρωτονίων.

Για την κατανόηση του μηχανισμού της βιοκαταλυτικής αντίδρασης οξείδωσης, το υπόστρωμα (S)-1-φαινυλοαιθανόλη ακινητοποιήθηκε στο ενεργό κέντρο του συμπλόκου RasADH-$NADP^+$, χρησιμοποιώντας παρόμοια πειραματική μέθοδο με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της κρυσταλλικής δομής της αναγωγάσης της τροπινόνης II του μικροοργανισμού *Datura Stramonium*.[38] Στην μέθοδο αυτή, η υδροξυλομάδα της (S)-1-φαινυλοαιθανόλη προσαρμόζεται μεταξύ των καταλοίπων Tyr150 και Ser137, ενώ το υδρίδιο που αποχωρεί δεσμεύεται από το C4 άτομο του οξειδωμένου νικοτιναμιδικού δακτυλίου του συμπαράγοντα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα **2**, η Ser137 σταθεροποιεί τον προσανατολισμό του υποστρώματος και είναι πιθανό ότι η αντίδραση οξείδωσης ξεκινά με μεταφορά πρωτονίου από την υδροξυλομάδα του υποστρώματος στο φαινολικό ανιόν του κατάλοιπου Tyr150 , δρώντας ως καταλυτική βάση, ακολουθούμενη από μεταφορά υδριδίου στο $NADP^+$. Ο πρωτονιοεξαρτώμενος αυτός μηχανισμός θα μπορούσε να περιλαμβάνει και το 2΄-OH της νικοτιναμιδικής ριβόζης, τη βασική πλευρική αλυσίδα της Lys154 και τον σκελετό του καρβονυλικού οξυγόνου του Asn111, ο οποίος αλληλεπιδρά με το μόριο νερού που αναφέρθηκε παραπάνω. Όσον αφορά στην αντίστροφη διαδικασία (αναγωγή) που καταλύεται από την RasADH, το pro-(R)-υδρίδιο του NADPH πρέπει να είναι σε θέση να προσβάλει την προχειρόμορφη κετόνη από την *re* επιφάνεια, ώστε να σχηματιστεί η αντίστοιχη (*S*)-αλκοόλη. Όπως και οι περισσότερες ADH έτσι και η RasADH υπακούουν στον κανόνα του Prelog.

Για να επιβεβαιωθεί αυτή η επιλεκτικότητα οξείδωσης του (*S*)-εναντιομερούς, μελετήθηκε και ο τρόπος σύνδεσης του επιμερούς με το ενεργό κέντρο. Το νέο υπόστρωμα δείχνει να προσαρμόζεται κανονικά στο ενεργό κεντρο απέναντι από καταλοιπα Tyr και Ser. Η στερεοεκλεκτικότητα προς το (*S*)-εναντιομερές είναι αμέσως εμφανής. Αρχικά δεν είναι εφικτή η μεταφορά υδριδίου από το (*R*)-υπόστρωμα στον C4 του $NADP^+$ (**Εικόνα** 2 δεξιά) καθώς το υδρίδιο δεν «βλέπει» αυτόν τον άνθρακα. Ακόμη η απόσταση μεταξύ του μεθυλίου του υποστρώματος και του C4 ατόμου του $NADP^+$, είναι πάρα πολύ μικρή, πράγμα που δημιουργεί στερεοχημικές παρεμποδίσεις και δεν θα επέτρεπε στο υπόστρωμα να δεσμευτεί από ενεργό κέντρο. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε πειραματικά χρησιμοποιώντας το

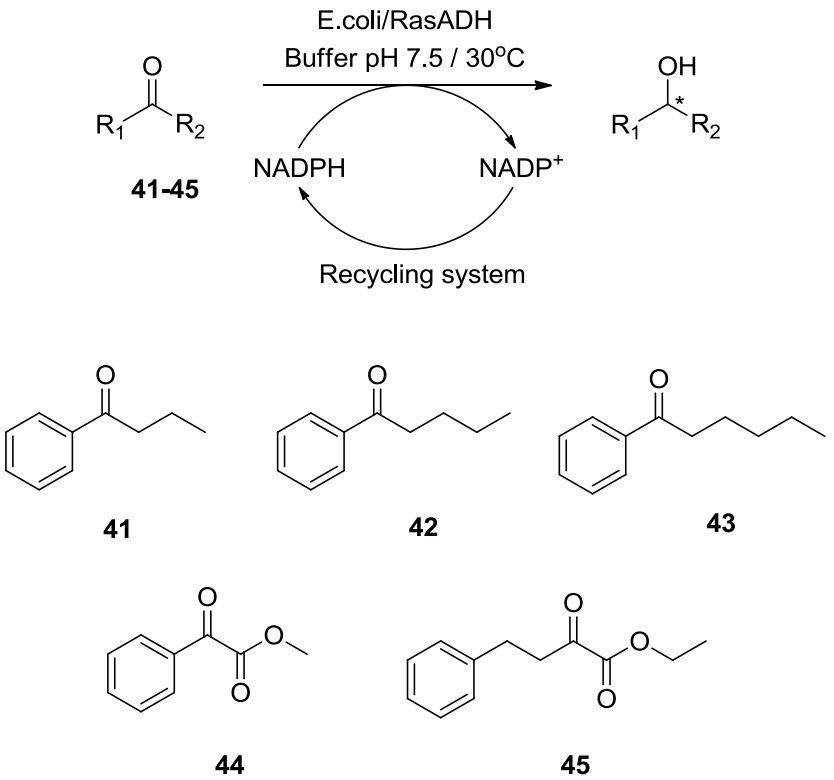
λογισμικό Glamdock,[39] όπου με συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο αγκυροβολήθηκε αυτόματα το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο της RasADH και περαιτέρω μελετήθηκε. Πάνω από 30 διαφορετικές θέσεις στο χώρο δοκιμάστηκαν και υπέδειξαν πως το υπόστρωμα αυτό είναι ακατάλληλο.



Εικόνα 5: Αριστερά φαίνεται η (S)-1-φαινυλοαιθανόλη (με κίτρινο χρώμα αναπαρίσταται ο άνθρακας του συμπαράγοντα) αγκυροβολημένη στο ενεργό κέντρο. Ο C4 άνθρακας του NADP+ επισημαίνεται με βέλος. Δεξία φαίνεται το (R)-εναντιομερές και σε μία μη ευνοούμενη θέση μέσα στο ενεργό κέντρο.

1.3 Καταλυτικές εφαρμογές των νέων αλκοολικών αφυδρογονασών RasADH και SyADH.

Τόσο η RasADH όσο και η SyADH, που έχει λίγες διαφόρες από την πρώτη, έχουν μελετηθεί, αν και όχι εκτενώς, για την επιδεκτικότητά τους σε διάφορα υποστρώματα και την δραστικότητά τους σε διάφορες συνθήκες αντιδράσεων. Για πρώτη φόρα το 2008 ο Kroutil και οι συνεργάτες του ανέφεραν την ταυτοποίηση δύο νέων αλκοολικών αφυδρογονασών, που είναι ικανές να μετασχηματίζουν στερικά παρεμποδισμένα υποστρώματα, την Ralstonia sp. DSM 6428 (RasADH)[32] και την Sphingobium yanoikuyae DSM 6900 (SyADH)[40]. Πραγματοποιήθηκαν βιοαναγωγές σε ογκώδη υποστρώματα, οδηγώντας σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις σε προϊόντα υψηλής οπτικής καθαρότητας. (**Σχήμα 14**)

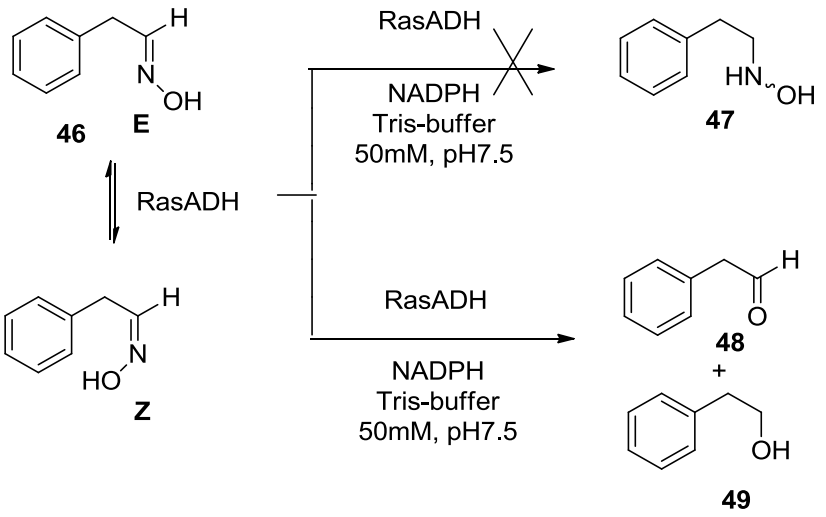


Σχήμα 14: Βιοκαταλυτικές αναγωγές ογκωδών υποστρωμάτων από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli που υπερεκφράζουν την RasADH.

Για την ανακύκλωση του συμπαράγοντα χρησιμοποιήθηκε το κλασικό σύστημα γλυκόζης/GDH αλλα και το σύστημα με την ισοπροπανόλη ως δότη πρωτονίων, με το πρώτο να είναι πιο αποδοτικό. Οι bulky-bulky αρυλο-αλκυλο κετόνες 4**1-43** ανάχθηκαν στις αντίστοιχες οπτικά καθαρά υδρόξυ προϊόντα με εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια (>99%). Στις περιπτώσεις των υποστρωμάτων 4**2** και 4**3** τα προϊόντα σχηματίστηκαν με την μεγαλύτερη εναντιομερική περίσσεια που έχει ποτέ επιτευχθεί από βιοκαταλυτική αναγωγή. Μια αλλαγή στην στερεοεκλεκτικότητα παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις 4**4** και 4**5** που οφείλεται στην διαφορετική δέσμευση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο, καθώς η άρυλο ομάδα δεν κατευθύνεται στην ίδια θέση του ενεργού κέντρου όπως στην περίπτωση των υποστρωμάτων 4**1-43**.

Μερικά ακόμα αξιοσημείωτα αποτελέσματα από τις αρχικές έρευνες είναι πως μερικά μη ογκώδη υποστρώματα με τα οποία δεν αναμενόταν να παρατηρηθεί βιοαναγωγή, έδωσαν υψηλές μετατροπές και εναντιοεκλεκτικότητες, ενώ ακόμη διαπιστώθηκε πως η αλλαγή δότη πρωτονίου στο ανακυκλωτικό σύστημα (από ισοπροπανόλη σε αιθανόλη) μπορεί να αναστρέψει την στερεοεκλεκτικότητα.[32,40]

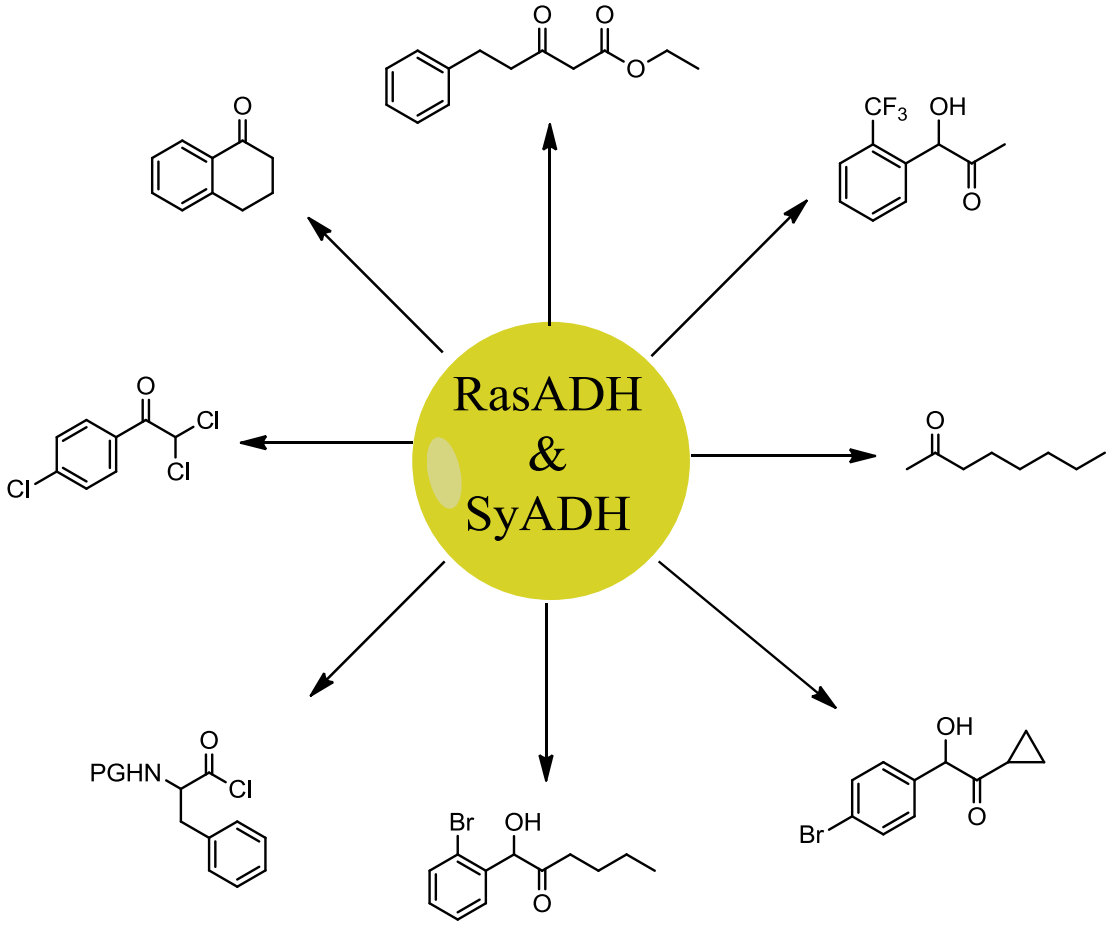
Το 2010 η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε μια διαφορετική δράση της RasADH κατά την βιοαναγωγή αλδοξιμών. (**Σχήμα 15**)[41]



Σχήμα 15: Βιοαναγωγή της οξίμης **6** χρησιμοποιώντας την RasADH.

Η αρχική προσπάθειά τους, ήταν η αναγωγή του διπλού δεσμού της οξίμης **46** προς σχηματισμό της υδροξυλαμίνης **47,** η οποία εύκολα μπορεί να μετατραπεί στην αντίστοιχη αμίνη.[42] Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμμία τέτοιου είδους βιοναγωγή, αλλά αντίθετα ο σχηματισμός της αλδεϋδης **48** και της αλκοόλης **49.** Διάφορα πειράματα και μηχανιστικές μελέτες απέδειξαν ότι πραγματοποιείται η αναγωγή της αλδοξίμης **46** προς μια ασταθή ενδιάμεση ιμίνη, η οποία κατόπιν υδρολύεται για να δώσει το προϊόν **48**. Το ίδιο το ένζυμο καταλύει και την μετατροπή της αλδεϋδης **48** στην αντίστοιχη αλκοόλη.

Τα επόμενα χρόνια δοκιμάστηκαν όλο και πιο ογκώδεις ενώσεις[43,44,45] (**Εικόνα 3**) ως πιθανά υποστρώματα, μερικά από τα προϊόντα των οποίων αποτελούν χειρόμορφα ενδιάμεσα για φάρμακα.[46] Πρόσφατα για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις με καθαρό σταθεροποιημένο ένζυμο RasADH.[47]



Εικόνα 3: Υποστρώματα ενζυμικών αναγωγών με τις νέες αλκοολικές αφυδρογονάσες.[46,47] Οι βιομετατροπές πραγματοποιήθηκαν με εξαιρετική εναντιο- και διαστερεοεκλεκτικότητα.

1.4 Τεχνικές και μέθοδοι για την υπερέκφραση και απομόνωση των ενζύμων από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli τα οποία διαθέτουν γονίδια έκφρασης αλκοολικών αφυδρογονασών από τους μικροοργανισμούς *Ralstonia* sp. DSM 6428 (RasADH) και *Sphingobium yanoikuyae* DSM 6900 (SyADH), μια ευγενική προσφορά του καθηγητή W. Kroutil.

1.4.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων και επαγωγή πρωτεΐνών

Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία βάσει βιβλιογραφίας.[47] Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κυττάρων E.coli χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες δύο τύπων. Αρχικά καλλιέργεια μικρής κλίμακας (100 mL) για δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης και στη συνέχεια μεγάλης κλίμακας (2 L) για την υπερέκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών.

Θρεπτικό υλικό LB (Luria Broth) - 1L

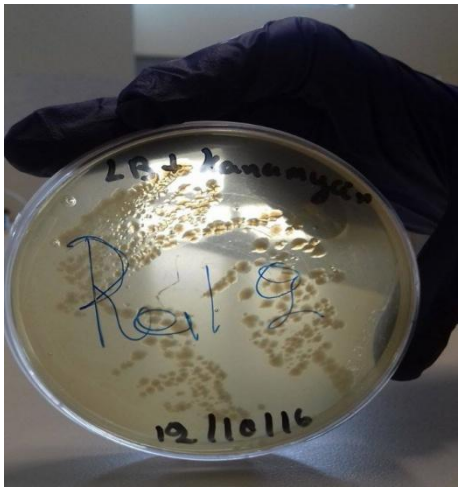
- 10 gr Tryptone
- 5 gr Yeast extract
- 10 gr NaCl
- 15 gr Agar

Για την προετοιμασία του υγρού θρεπτικού υλικού LB, διαλύουμε όλες τις στερεές ουσίες σε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 7. Ογκομετρούμε στον επιθυμητό όγκο και τέλος αποστειρώνουμε το θρεπτικό υλικό σε κλίβανο αποστείρωσης, στους 120 ^{o}C για 30 min.

Για την στερεή καλλιέργεια, χρησιμοποιούμε 100 mL από αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό LB στο οποίο προσθέτουμε agar και αντιβιοτικό kanamycin, σε τελική συγκέντρωση 50 μgr/mL. Το stock του αντιβιοτικού φυλάσσεται στους -20 ^{o}C και προκειμένου να χρησιμοποιηθεί μεταφέρεται και διατηρείται σε πάγο. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αναδεύεται ελαφρά και μοιράζεται στα τρυβλία, καθένα από τα οποία χωράει περίπου 25 mL. Αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου να πήξει το θρεπτικό υλικό και τέλος φυλάσσονται στους 4 ^{o}C.

Προκαλλιέργεια:

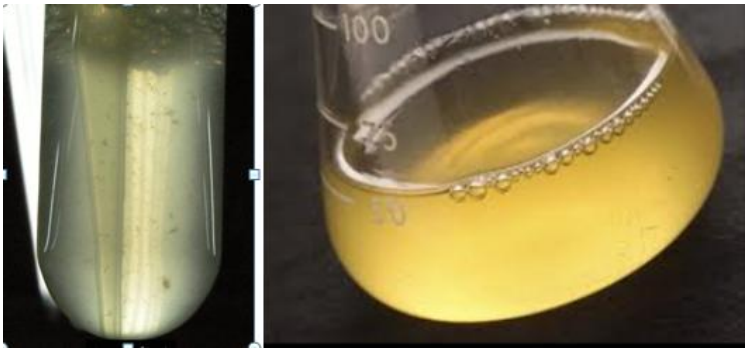
Με τη χρήση φλόγας γίνεται η ασηπτική μεταφορά 3 mL θρεπτικού υλικού σε αποστειρωμένα φιαλίδια (falkon) των 15 mL. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 50 μgr/mL και μία μεμονωμένη αποικία από το τρυβλίο (**Εικονα 4)** εμβολιάζεται στο falkon με το θρεπτικό υλικό. Οι υγρές προκαλλιέργειες επωάζονται ολονύκτια στους 37 ^{o}C υπό ανάδευση (220 rpm).



Εικόνα 4: Τρυβλίο με εμφανείς αποικίες των κυττάρων του στελέχους Ralstonia sp.

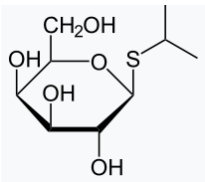
Καλλιέργεια:

Το θρεπτικό υλικό έχει αποστειρωθεί μέσα στις κατάλληλες φιάλες, και αφού φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται σε αυτό κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 50 μgr/mL. Έπειτα, εμβολιάζεται με την προκαλλιέργεια βακτηρίων που έχει επωαστεί ολονύκτια στους 37 ^{o}C. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση στην κατάλληλη θερμοκρασία μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm (OD600) να είναι κοντά στο 0,5, τιμή που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. (**Εικόνα 5**)



Εικόνα 5: Προκαλλιέργεια βακτηρίων σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB (αριστερά), κύρια καλλιέργεια βακτηρίων σε 100 ml θρεπτικού μέσου (δεξιά).

Η επαγωγή έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιείται με την προσθήκη ισοπρόπυλο β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG), ουσία η οποία αποτελεί ένωση – μιμητή της λακτόζης. Απουσία λακτόζης στο κύτταρο, ο καταστολέας της λακτόζης προσδένεται ισχυρά στον προαγωγέα του γονιδίου, με αποτέλεσμα η RNA-πολυμέραση να μην μπορεί να προσδεθεί και να αποτρέπεται με αυτό τον τρόπο η έκφραση της πρωτεΐνης. Όταν στο περιβάλλον του βακτηρίου βρεθεί ο IPTG (**Εικόνα 6**) που δομικά μοιάζει με την λακτόζη, τότε προσδένεται στον καταστολέα, αλλάζοντας τη διαμόρφωσή του. Με τον τρόπο αυτό, αφήνει ελεύθερο τον προαγωγέα και η RNA-πολυμεράση μπορεί πλέον να πραγματοποιήσει την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.



Εικόνα 6: Ισοπροπυλο β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη (IPTG).

Πειραματική πορεία

Stock διάλυμα IPTG, 1M παρασκευάζεται με τη χρήση αποστειρωμένου, απιονισμένου νερού και φυλάσσεται στους -20 ^{o}C. Λίγο πριν τη χρήση, βγαίνει από τους -20 ^{o}C και διατηρείται στον πάγο. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm είναι ~ 0,5 γίνεται επαγωγή με την προσθήκη ποσότητας IPTG (τελική

συγκέντρωση 1 mM) και ακολουθεί επώαση στην επιθυμητή θερμοκρασία υπό ανάδευση για 5h.

Πίνακας 3: Τιμές Απορρόφησης καλλιέργειας μετά από 2 ώρες επώαση.

	RasADH	SyADH
Τιμή A_{600nm} (2 ώρες επώαση)	**0.496**	**0.542**

Έλεγχος του χρόνου επώασης

Όπως προαναφέρθηκε ο κατάλληλος χρόνος επώασης του IPTG είναι 5 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε από πείραμα. Δείγμα 1 ml πάρθηκε και από τις δύο υγρές καλλιέργειες (Ral και Sy), πριν από την προσθήκη του IPTG, 3 και 5 h μετά την προσθήκη. Τα έξι συνολικά δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και συλλέχτηκαν τα ιζήματα για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). (**Εικόνα 6**) Για το λόγο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν οι βασικές αρχές της μεθόδου.[48]

Βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης, η οποία βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (υ) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

$$\upsilon = Ez / f$$

Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδατικά διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι

παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (SDS-PAGE)

Είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων, ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους (π.χ. western blotting, IEF, mass spectrometry).

Οι πηκτές πολυακριλαμιδίου είναι χημικά αδρανείς και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου με το αντιδραστήριο N,N'-methylenebisacrylamide. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous), επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli,[49] το πήκτωμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

Η μήτρα στην οποία σχηματίζεται το πήκτωμα μπορεί να είναι είτε μικροί κυλινδρικοί σωλήνες είτε ένα sandwich επίπεδων υάλων (ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια ή επίπεδη). Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται είτε στην επιφάνεια των σωλήνων, είτε σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας», όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο

οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Η απόσταση μετακίνησης των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Rf) κάτω από αυτές τις συνθήκες σε ομοιογενή πηκτώματα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. σε πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο, καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται πραγματοποιώντας χρώση Coomassie, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών.

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε σύστημα SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους και της σχετικής ποσότητας (αφθονία) πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα, αλλά και για τον καθορισμό της κατανομής πρωτεϊνών σε διάφορα βιοχημικά εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων.

<u>Διαλύματα παρασκευής πηκτών για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση</u>

Ακρυλαμίδιο – δισακρυλαμίδιο (ABmix)	
Acrylamide	49,5 % w/v
N-N-Methylenebisacrylamide	3 % w/v

Ρυθμιστικό Διάλυμα πηκτής 3x (Gel buffer 3x)	
Trizma base	3M
SDS	0,3 % w/v
pH 8,45	(ρύθμιση με δ/μα HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα Ανόδου (10x)	
Trizma base	1M
pH 8,9	(ρύθμιση με δ/μα HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα Καθόδου (10x)	
Trizma base	1M
Tricine	1M
SDS	1 % w/v
pH 8,25	-

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Sample buffer)	
SDS	12 % w/v
Glycerol	10 % w/v
Mercaptoethanol	6 % w/v
Serva Blue G	0,05 % w/v
Tris -HCl	150 mM, pH 7

Πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (Bio-Rad)	
Phosphorylase b	97,4 kDa
Serum albumin	66,2 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carbonic anhydrase	31 kDa
Trypsin inhibitor	21,5 kDa
Lysozyme	14 kDa

Για την προετοιμασία των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβασης για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες διαλυμάτων.

Πηκτή διαχωρισμού 30 ml (12%)	
Glycerol	3 gr
Gel buffer 3x	10 ml

AB mix solution	6 ml
Προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 30 ml	
APS (10%)	150 μl
TEMED	15 μl

Πηκτή επιστοίβασης 12 ml (4%)	
Gel buffer 3x	4 ml
AB mix solution	1 ml
Προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 12 ml	
APS (10%)	90 μl
TEMED	9 μl

Αρχικά, συναρμολογείται η συσκευή πηξίματος των gel με τις γυάλινες επιφάνειες και τα διαχωριστικά πλαστικά (spacers). Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού και τοποθετείται μεταξύ των γυάλινων επιφανειών της συσκευής, καλύπτοντας περίπου το 70% της συνολικής επιφάνειας. Έπειτα εφαρμόζεται μια μικρή στρώση βουτανόλης, η οποία βοηθά στη δημιουργία μιας ευθείας επιφάνειας, και η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί. Όταν έχει πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός, η βουτανόλη αφαιρείται και ξεκινά η παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης, η οποία καλύπτει το υπόλοιπο μέρος μεταξύ των γυάλινων επιφανειών. Πριν πήξει το διάλυμα, τοποθετείται η υποδοχή (χτένα) που θα σχηματίσει τα πηγάδια φόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Όταν το πήκτωμα πολυμεριστεί, αφαιρείται η υποδοχή και το gel είναι έτοιμο προς χρήση. Τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται εσωτερικά με το διάλυμα καθόδου 1x και εξωτερικά με το διάλυμα ανόδου 1x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 20 mA, ενώ μόλις τα δείγματα περάσουν την πηκτή επιστοίβασης, το ρεύμα αυξάνεται στα 40 mA, έως ότου το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Προτού τα δείγματα φορτωθούν στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, προετοιμάζονται κατάλληλα έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν. Έτσι, αναμιγνύεται το δείγμα με το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) σε αναλογία 3:1 (3 όγκοι δείγματος προς 1 όγκο sample buffer) και επωάζεται για 10 λεπτά στους 100 ^{o}C με

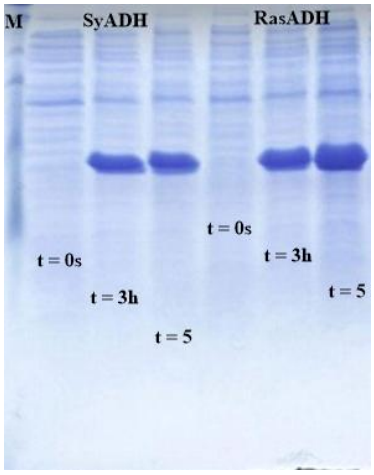
σκοπό την αναδιάταξη των πρωτεϊνών. Σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής φορτώνονται 20 μg πρωτεϊνικού δείγματος.

Τα συστατικά του sample buffer βοηθούν το πρωτεϊνικό δείγμα να υποστεί τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης με τον εξής τρόπο:

- *SDS*: Είναι ένα ισχυρό ανιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο διαταράσσει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Ανιόντα του απορρυπαντικού προσδένονται στα αμινοξέα της πρωτεΐνης, προσδίδοντάς της αρνητικό φορτίο.
- *Μερκαπτοαιθανόλη*: Διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης, βοηθώντας στην αποδιάταξη της.
- *Glycerol*: Διευκολύνει την τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια
- *Serva Blue*: Δίνει χρώμα στο δείγμα έτσι ώστε να μπορούμε να παρατηρούμε που βρίσκεται μέσα στην πηκτή.

Χρώση και παρατήρηση της πηκτής μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιείται χρώση της πηκτής με το διάλυμα χρώσης Coomassie. Η πρόσδεση της Coomassie στις πρωτεΐνες δημιουργεί έγχρωμα σύμπλοκα και έτσι δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης της εικόνας των διαχωρισμένων πρωτεϊνών πάνω στη πηκτή. Η διαδικασία της χρώσης συνήθως διαρκεί ολονύχτια. Έπειτα, ακολουθεί ο αποχρωματισμός με το αντίστοιχο διάλυμα, αφού πρώτα έχει απομακρυνθεί η περίσσεια της χρώσης. Οι εκπλύσεις επαναλαμβάνονται τακτικά έως ότου η πηκτή αποχρωματιστεί πλήρως. (**Εικόνα 7**)



Εικόνα 7: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπου συγκρίνονται τα κλάσματα που συλλέχθηκαν για κάθε πρωτεΐνη πριν την επαγωγή (t = 0 s) όπως επίσης και για 3 και 5 ώρες μετά την επαγωγή.

Παρατηρείται ότι στα κύτταρα που συλλέχθηκαν και για τις δύο αφυδρογονάσες (SyADH, RasADH), τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις 5 h μετά την επαγωγή φαίνεται να περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα της αντίστοιχης πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνεται από την ισχυρότερη ένταση των ταινιών σε σύγκριση με τα κλάσματα που προέρχονται από τις 3 h επαγωγής.

Μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου επώασης της καλλιέργειας, γίνεται η συλλογή των κυττάρων στην φυγόκεντρο Sorval. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρισης χωρητικότητας 250 ml και φυγοκεντρούνται για 15 min στα 5000 rpm στους 4 ^{o}C. Κατόπιν, το ίζημα των κυττάρων, συλλέγεται σε αποστειρωμένα falkon των 50 mL και αφού ζυγιστούν φυλάσσονται στους -20 ^{o}C.

1.4.2 Λύση κυττάρων και περαιτέρω καθαρισμός της SyADH

Μετά την συλλογή κυττάρων, το επόμενο στάδιο είναι η λύση αυτών. Από τις δύο πρωτεΐνες που θα προέκυπταν, μόνο η SyADH ήταν εφικτό να καθαριστεί καθώς έφερε την σήμανση strep στο C τερματικό άκρο της. Για να επιβεβαιώσουμε την ανίχνευση της πρωτεΐνης με την σήμανση strep πραγματοποιούμε ανοσολογικό έλεγχο με χρήση της μεθόδου Western blot.

Western Blot

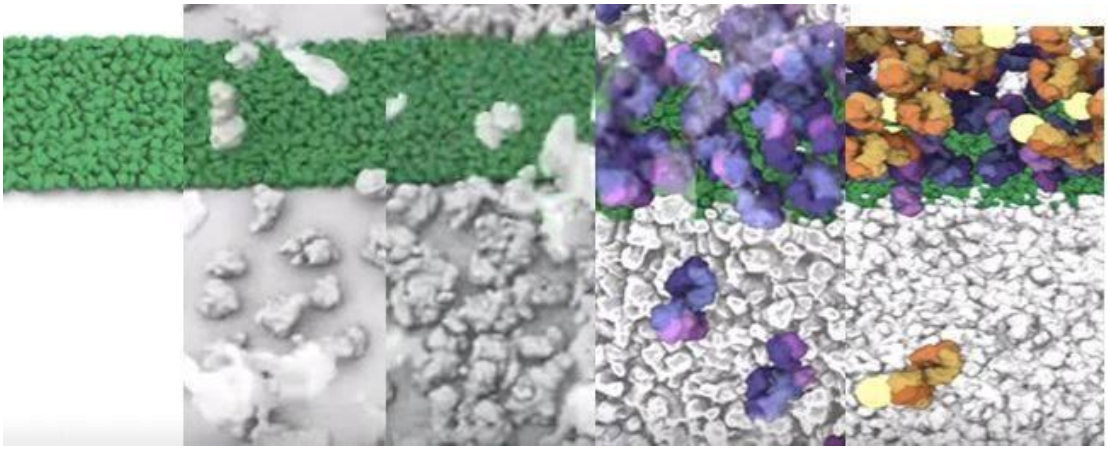
Το western blot[50] είναι μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών μέσα σε ένα βιολογικό δείγμα. Η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, η οποία μας επιτρέπει να αναγνωρίζουμε αν στο δείγμα βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη ή όχι. Αρχικά, το πρωτεϊνικό δείγμα τρέχει σε πήκτωμα πολυακριλαμιδίου με τις πρωτεΐνες να αποδιατάσσονται και να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος. Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται με το κατάλληλο αντίσωμα (anti-strep στην περίπτωσή μας), ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο και τέλος λαμβάνει χώρα η εμφάνιση με τη βοήθεια μορίων που μας προκαλούν την εμφάνιση έγχρωμων προϊόντων σε μία συγκεκριμένη χημική αντίδραση.

Υλικά

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Διηθητικό χαρτί
- Μεθανόλη
- TBST
  - 10mM Tris/HCl pH = 8
  - 150mM NaCl
  - 0,05% w/v Tween 20
- Αλκαλική φωσφατάση (ALP Buffer)
  - 100mM Tris/HCl, pH=9,5
  - 100mM NaCl
  - 5mM MgCl2
- BSA 2% w/v σε TBST
- Αντίσωμα, anti- Strep tag, αραίωση 1:2000 σε TBST
- BCIP/NBT

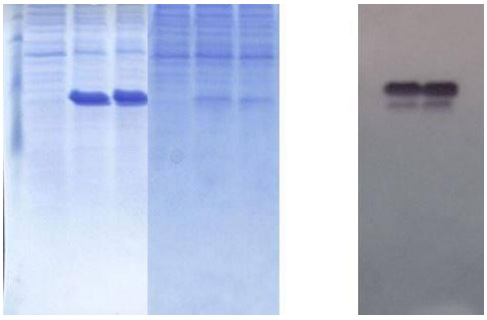
Προκειμένου να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιείται ενεργοποίηση της

μεμβράνης με μεθανόλη, πριν αυτή έρθει σε επαφή με την πηκτή. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς αφού πρώτα έχουν καλυφθεί εξωτερικά με 5 στρώσεις διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με TBST. Η μεταφορά πραγματοποιείται από τον θετικό προς τον αρνητικό πόλο κι έτσι η μεμβράνη τοποθετείται στην κάθοδο ενώ η πηκτή στην άνοδο. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα για 1 h και 30 min σε σταθερό ρεύμα 1 mA/cm^2. Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται υπό ανάδευση σε BSA 2% w/v σε TBST από 1 h έως ολονύχτια προκειμένου να γίνει δέσμευση των θέσεων μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος. Έπειτα ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 min με TBST και στη συνέχεια γίνεται η επώαση για 1 h με το ειδικό αντίσωμα ως προς τη σήμανση που φέρει η ανασυνδυασμένη-επιθυμητή πρωτεΐνη. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 min με TBST και 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία προσδένεται στο ειδικό αντίσωμα.(**Εικόνα 8**)



Εικόνα 8: 'Ολα τα στάδια western blot. Από δεξιά προς τα αριστερά φαίνεται με πράσινο η strep επισημασμένη πρωτεΐνη, με άσπρο το αρχικό μπλοκάρισμα των μη ειδικών περιοχών, με μωβ το anti-strep αντίσωμα και τέλος με πορτοκαλοκαφέ η αλκαλική φωσφατάση που προσδένεται στο αντίσωμα.

Τέλος, γίνεται η εμφάνιση της μεμβράνης με τη χρήση διαλύματος BCIP/NBT μέχρι να εμφανιστούν οι ταινίες ιώδους χρώματος, που δηλώνουν την πρωτεΐνη-στόχο. Ο χρωματισμός των ταινιών είναι αποτέλεσμα της υδρόλυσης του BCIP από την αλκαλική φωσφατάση, απόπου προκύπτει ένα ενδιάμεσο προϊόν που διμερίζεται, δίνοντας στην ταινία το χαρακτηριστικό χρώμα. (**Εικόνα 9**)



Εικόνα 9: Μεταφορά πρωτεΐνης σε επιφάνεια νιτροκυτταρίνης και μετέπειτα χρωματισμός της. Αριστερά φαίνεται η πηκτή πριν την μεταφορά της πρωτεΐνης, ενώ στο κέντρο μετά την μεταφορά αυτής. Δεξία είναι το φύλλο νιτροκυτταρίνης με εμφανείς τις έγχρωμες ταινίες.

Από τις δύο παραπάνω πηκτές μπορεί κανείς να διακρίνει ότι υπερεκφράζονται οι επιθυμητές πρωτεΐνες, ενώ και από το western blot στην περίπτωση της SyADH, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της strep-επισημασμένης πρωτεΐνης στο βιολογικό δείγμα. Στην συνέχεια ακολούθησε η λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων, 40 % amplitude, για 9 κύκλους, 20 sec on / 40 sec off, σε παγωμένο υδατόλουτρο και η μετέπειτα υπερφυγοκέντριση (35.000 rpm για 1 h). Από τα δύο υπερκείμενα υπερφυγοκέντρισης, το ένα (RasADH) φυλάχτηκε στους 0 ^{o}C για περαιτέρω έλεγχο της βιοκαταλυτικής του δραστικότητας, σε αντίθεση με το δεύτερο υπερκείμενο (SyADH) το οποίο υπέστη διαδικασία καθαρισμού με στήλη στρεπταβιδίνης.

Χρωματογραφία συγγένειας-Στήλη στρεπταβιδίνης.

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μία μέθοδος διαχωρισμού της επιθυμητής πρωτεΐνης από ένα μίγμα άλλων πρωτεϊνών και στηρίζεται στις ειδικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ ενός μορίου προσδέτη (στατική φάση) και των πρωτεϊνικών μορίων στο διάλυμα (κινητή φάση). Η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να διακριθεί σε 3 μέρη:

1) Πρόσδεση της πρωτεΐνης στην στατική φάση
2) Έκλουση μη προσδεδεμένων μορίων με διαδοχικές πλύσεις
3) Έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης

Το ενδιάμεσο βήμα της έκπλυσης πραγματοποιείται με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που δεν διαταράσουν τις συνθήκες αλληλεπίδρασης μεταξύ στατικής φάσης και πρωτεϊνικού μορίου. Αντίθετα, στην έκλουση χρησιμοποιούνται διαλύματα που αλλάζουν τις συνθήκες της αλληλεπίδρασης αυτής, με αποτέλεσμα

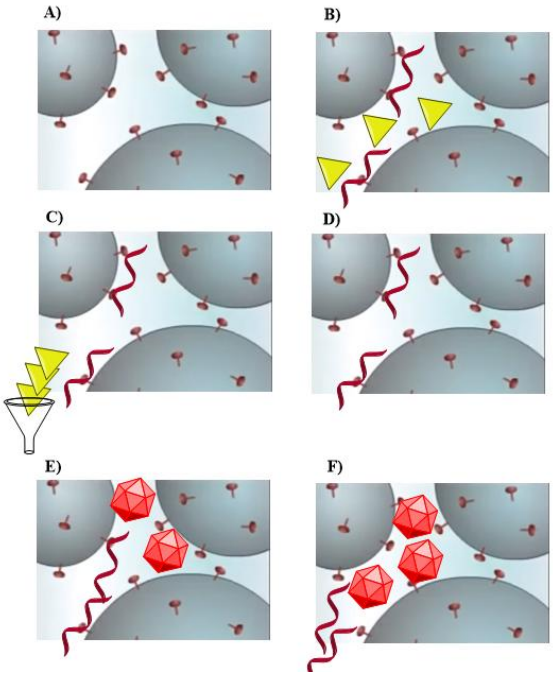
την απελευθέρωση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τον προσδέτη. Η στήλη στρεπταβιδίνης είναι μια ευρέως γνωστή μέθοδος καθαρισμού πρωτεϊνών και βασίζεται στην ιδιότητα της στρεπταβιδίνης να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με την βιοτίνη. Η ιδιότητα αυτή τροφοδότησε την ιδέα δημιουργίας ενός πεπτιδίου ικανού να προσδένεται στη θέση πρόσδεσης της βιοτίνης, πάνω στα μόρια στρεπταβιδίνης και κατά συνέπεια να καθιστά την πρωτεΐνη ικανή να διαχωρίζεται. Το μικρό αυτό πεπτίδιο αποτελείται από 8 αμινοξέα (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) και ονομάζεται strep- tag. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που φέρει το strep- tag μπορεί να κατακρατηθεί από τα ακινητοποιημένα στη στατική φάση μόρια της στρεπταβιδίνης και με αυτό τον τρόπο να διαχωριστεί. Προκειμένου να γίνει η έκλουση, χρησιμοποιείται στην κινητή φάση δισθειο- βιοτίνη (5 mM), ένα σταθερό ανάλογο της βιοτίνης, η οποία αποτελεί τον φυσικό υποκαταστάτη της στρεπταβιδίνης. (**Εικόνα 10**)

Ρυθμιστικό έκπλυσης (Wash Buffer)
- 150mM NaCl
- 20mM HEPES, pH= 8
- 1mM EDTA, pH=8

Ρυθμιστικό έκλουσης (Elution Buffer)
- Wash Buffer
- 5m M disthiobiotin

Η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση κολώνας στρεπταβιδίνης περιγράφεται στα παρακάτω βήματα:

1) Πλύση της στήλης με 30- 50 mL απιονισμένου νερού
2) Εξισορρόπηση με 2 όγκους στήλης Wash Buffer
3) Το δείγμα περνά από τη στήλη και συλλέγεται το έκλουσμα
4) Πλύση με 5 όγκους στήλης Wash Buffer
5) Έκλουση με 6 x 0,5 όγκους στήλης



Εικόνα 10: A) Πακεταρισμένη στήλη με μόρια στρεπταβιδίνης (κόκκινο), B) Πρόσδεση επιθυμητών πρωτεϊνών στην στατική φάση, C) Έκλουση μη προσδεδεμένων πρωτεϊνών, D) Στήλη με προσδεμένη την επιθυμητή πρωτεΐνη, E) Μόρια δισθειοβιοτίνης με μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για εκτοπισμό της πρωτεΐνης, F) Έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν βρίσκεται μόνη της στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν βρίσκεται προσδεδεμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιοντική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλέγματος πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων. Απλώς για κάθε περιοχή (χαμηλής ή υψηλής συγκέντρωσης) πρέπει να γίνει διαφορετική καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται βάσει γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης που προέρχεται από ορό βοδιού. Για την κατασκευή της καμπύλης, αρχικά λαμβάνονται εις τριπλούν, οι ποσότητες, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 και 20 μl από το διάλυμα της πρότυπης πρωτεΐνης BSA (2 mg/ml) και αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 100 μl με ρυθμιστικό διάλυμα A. Παρασκευάζεται επίσης και ένα τυφλό δείγμα (blank) το οποίο περιέχει μόνο 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος A. Σε όλα τα δείγματα προστίθενται 900 μl διαλύματος Bradford, αναδεύονται με vortex και αφήνονται για

επώαση 5-10 min. Οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετρούνται στα 595 nm, στο μήκος κύματος που απορροφά το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η τιμή της απορρόφησης του τυφλού δείγματος αφαιρείται από τις τιμές των υπόλοιπων δειγμάτων. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίζεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία είναι της μορφής :

$$\mathbf{y=ax+\beta}$$

με $\alpha = 0{,}0328$ και $\beta = -0{,}0016$

Κατά τη διαδικασία της μεθόδου αυτής είναι σημαντικό οι απορροφήσεις των δειγμάτων να μετρηθούν όσο τον δυνατόν πιο σύντομα μετά την προσθήκη τους διαλύματος Bradford.

Πίνακας 4 : Εύρεση συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

	Έκπλυση	Υπερ.Υπ RasADH	Υπερ.Υπ SyADH	Έκλουση
Συγκέντρωση (mg/ml)	**0.225**	**1.6**	**1.12**	**0.277**

<u>Κατακρίμνηση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ (TCA)</u>

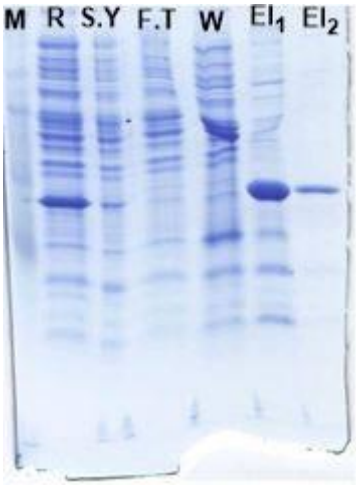
Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η κατακρίμνηση των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα δείγμα χαμηλής συγκέντρωσης, προκειμένου να είναι ευκολότερη η περαιτέρω μελέτη του.

Στην εκάστοτε ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος προστίθεται 10% τριχλωροξικού οξέως TCA (100 %w/v) και αφού το διάλυμα αναδευτεί παραμένει στους 4 ^{o}C καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας. Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντριση στα 11.500 g για 10 min στους 4 ^{o}C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το ίζημα πλένεται με την προσθήκη παγωμένης ακετόνης (100 %) ποσότητας ίσης με την ποσότητα του αρχικού δείγματος, και φυγοκεντρείται στα 11.500 g για 10 min στους 4 ^{o}C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για

λίγη ώρα στον αέρα και επαναδιαλυτοποιείται σε sample buffer. Επωάζεται σε λουτρό υπερήχων για 15 min περίπου και είναι έτοιμο να φορτωθεί σε πηκτή πολυακριλαμιδίου.

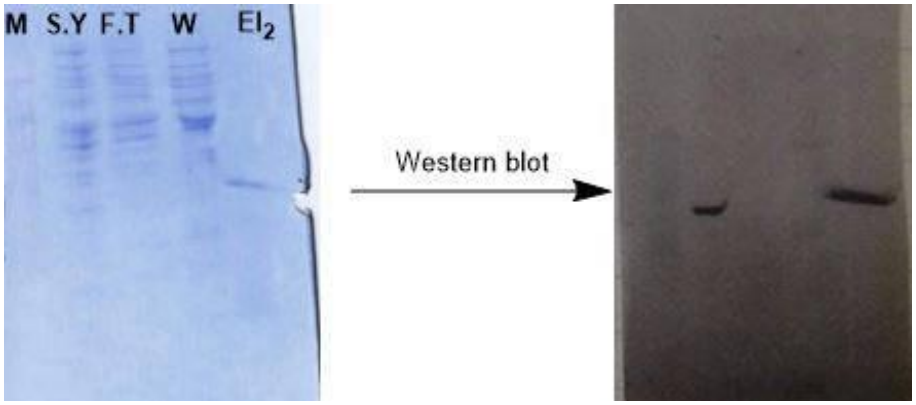
SDS – Ηλεκτροφόρηση ύστερα από σπάσιμο κυττάρων και καθαρισμό της SyADH

Για να δούμε αν βρίσκονται οι πρωτεΐνες μας στα υπερκείμενα υπερφυγοκέντρησης και αν όντως έχει καθαριστεί η SyADH μετά από την στήλη χρωματογραφίας, πραγματοποιήσαμε SDS-ηλεκτοφόρηση και έπειτα western blot.



Εικόνα 6 : M: Marker , R: Υπερκείμενο Υπερφυγοκέντρισης RasADH, S.Y: Υπερκείμενο υπερφυγοκέντρισης SyADH, W: wash, F.T: Flow threw, El_1: Elution με TCA, El_2: Elution.

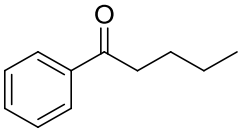
Παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες μας είναι εμφανείς και στα 2 υπερκείμενα υπερφυγοκέντρισης όπως ήταν και αναμενόμενο. Στο κλάσμα του F.T, δεν εμφανίζεται η ταινία της πρωτεΐνης SyADH πράγμα που επιβεβαιώνει την πρόσδεσή της στη κολώνα. Τα κλάσματα (El_1, El_2) που αφορούν την έκλουση της πρωτεΐνης μας, εμφανιζούν την επιθυμητή ταινία. Η περαιτέρω απόδειξη ότι επιτεύχθηκε ο καθαρισμός της σωστής πρωτεΐνης, είναι η μεταφορά της σε φύλλο νιτροκυτταρίνης με πείραμα Western blot. (**Εικόνα 12**)



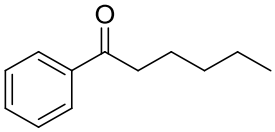
Εικόνα 12: Επιτυχής μεταφορά πρωτεΐνης σε φύλλο νιτροκυτταρίνης με πείραμα Western blot.

1.5 Προσπάθειες εύρεσης βέλτιστων συνθηκών για ενζυμικές βιομετατροπές με τις νέες αλκοολικές αφυδρογονάσες

Όλες οι ενζυμικές δοκιμές, έγιναν χρησιμοποιώντας δύο γνωστά υποστρώματα από την βιβλιογραφία. Τα ποσοστά βιομετατροπής προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία ^{1}HNMR, μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος και εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, τα υποστρώματα **42** και **43**, μπορούν να αναχθούν μόνο από τις RasADH και SyADH.



42



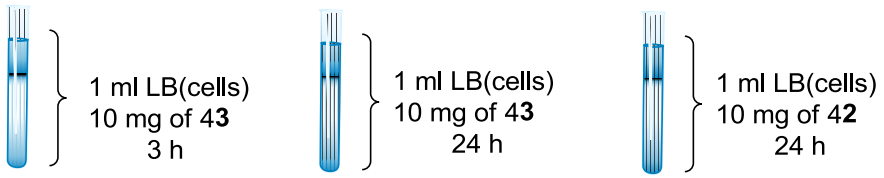
43

Πειράματα με ολόκληρα κύτταρα RasADH

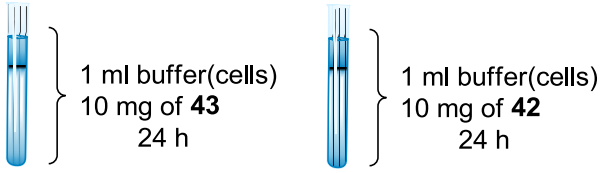
Τα πρώτα πειράματα έγιναν αμέσως μετά την πεντάωρη επαγωγή με IPTG, χρησιμοποιώντας το LB που περιείχε ολόκληρα κύτταρα, απευθείας από την κυτταροκαλλιέργεια. Η υπόλοιπη καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε και τα κύτταρα περισυλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 5 ml Tris – HCl buffer 50 Mm pH 7.5.

Συγκεκριμένα:

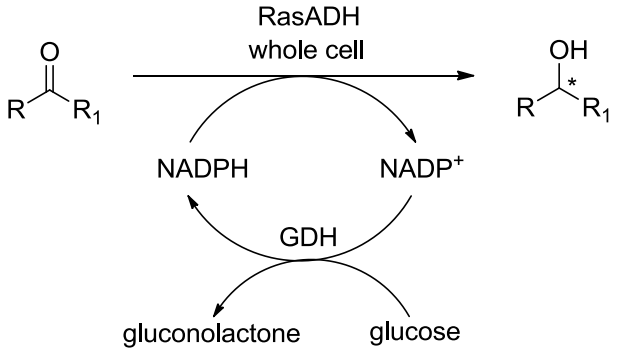
Πείραμα 1:



Πείραμα 2:

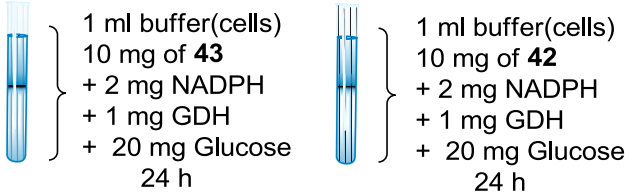


Σε κανένα από τα παραπάνω πειράματα δεν παρατηρήθηκε βιομετατροπή. Τα κύτταρα, είτε βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον (LB), είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα, δεν εμφάνισαν κάποια ενεργότητα, οπότε προχωρήσαμε σε πειράματα όπου προσθέσαμε ποσότητες NADPH, GDH, Glucose, υποβοηθώντας έτσι τα κύτταρα να δράσουν.(**Σχήμα 16**)



Σχήμα 16: Βιομετατροπη με χρήση του συστήματος glucose/GDH ανακύκλωσης του συμπαράγοντα.

Πείραμα 3:

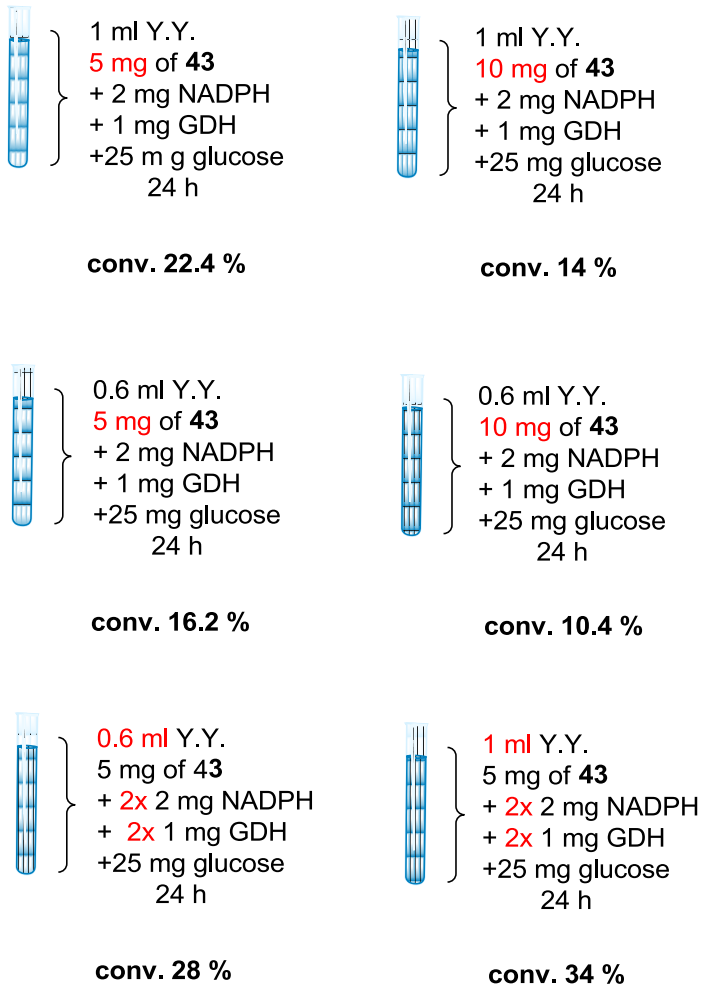


Και στις δύο περιπτώσεις υπήρξε για πρώτη φορά βιομετατροπή, 19% για το υπόστρωμα **43** και 23% για το **42** αντίστοιχα. Η μετατρόπη αυτή δεν ανταποκρίνεται

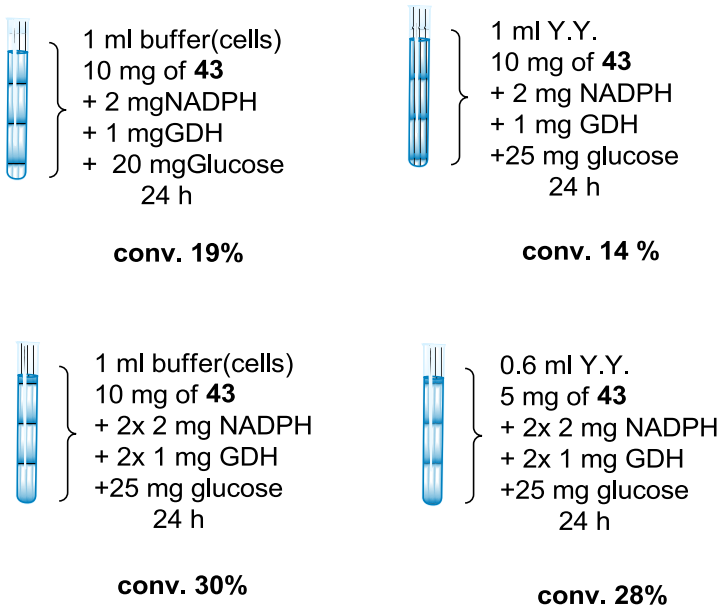
στην πραγματική απόδοση της αντίδρασης, καθώς οι ποσότητες που χρησιμοποιήσαμε, του συμπαράγοντα και των υπολοίπων, δεν είναι σωστές, αφού δεν γνωρίζαμε τη συνολική μάζα των κυττάρων που εμπεριέχονται σε 1 ml buffer. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν πραγματοποιήσαμε πείραμα με 10 mg υποστρωματος **2**, διπλάσιες ποσότητες NADPH και GDH σε 1 ml κυττάρων, παρατηρώντας πως η απόδοση έφτασε το 30%.

Δοκιμές με Υπερκείμενο Υπερφυγοκέντρισης (Υ.Υ) RasADH

Πείραμα 4:



Παρατηρούμε ότι, όπως και στα ολόκληρα κύτταρα, έτσι και στο υπερκείμενο υπερφυγοκέντρισης, αυξάνοντας την συγκέντρωση του συμπαράγοντα και του ανακυκλωτικού συστήματος στο διάλυμα, αυξάνεται και η απόδοση της αντίδρασης. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην απόδοση μεταξύ πειραμάτων ολόκληρων κυττάρων και πειραμάτων με το υπερκείμενο (**Εικόνα 12**). Οι μικρές αποκλίσεις στην απόδοση οφείλονται στο διαφορετικό πληθυσμό κυττάρων που περιέχονται σε 1ml buffer, από την αντίστοιχη ποσότητα ακάθαρτης πρωτεΐνης στο 1ml υπερκειμένου.

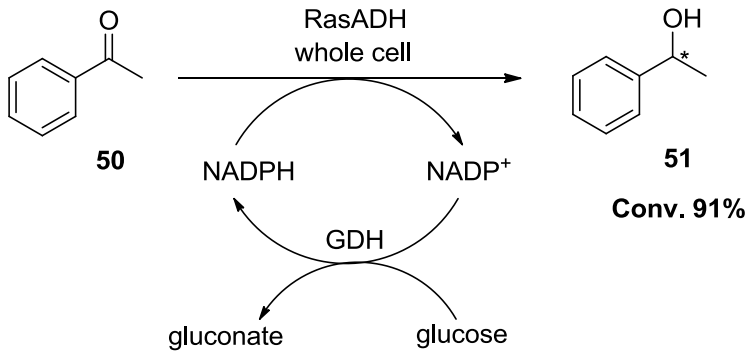


Εικόνα 12: Πειράματα με ολόκληρα κύτταρα και με υπερκείμενο υπερφυγοκέντρισης (Y.Y).

Άρα καταλήξαμε πως υπάρχει ανάγκη λυοφιλοποίησης των κυττάρων, έτσι ώστε να προστίθεται η σωστή ποσότητα συμπαράγοντα και ανακυκλωτικού συστήματος. Η λυοφιλοποίηση ενός υλικού περιλαμβάνει την ψύξη του και στη συνέχεια τη μείωση της περιβάλλουσας πίεσης, ώστε το παγωμένο νερό που περιέχεται στο υλικό να εξαχνωθεί, δηλαδή να περάσει κατευθείαν από τη στερεή στην αέρια κατάσταση. Το υλικό ψύχεται σε θερμοκρασία κάτω του τριπλού σημείου του, δηλαδή σε θερμοκρασία χαμηλότερη από εκείνη που η στερεή και η υγρή μορφή του μπορούν να συνυπάρχουν. Αυτό εξασφαλίζει ότι στο νερό που περιέχεται θα συμβεί εξάχνωση και όχι τήξη. Οι θερμοκρασίες στις οποίες φτάνει το υλικό είναι -50 ^{o}C έως -80 ^{o}C.

Δοκιμές με λυοφιλοποιημένα κύτταρα RasADH

Όπως έχει προαναφερθεί η RasADH, εκτός από ογκώδη υποστρώματα, έχει βρεθεί να καταλύει μερικά μη ογκώδη. Ένα από αυτά είναι η ακετοφαινόνη **10**. Εκτελώντας ένα πείραμα με 15 mg κυττάρων παρατηρήσαμε μετατροπή 91% (**Σχήμα 17**) . Η απόδοση αυτή είναι ακριβώς η ίδια με την απόδοση την ενζυμικής βιοαναγωγής της χλωροακετοφαινόνης από ολόκληρα κύτταρα RasADH.[40] Η απόλυτα επιτυχημένη επαναληψιμότητα της συγκεκριμένης βιομετατροπής αποδεικνύει την επιτυχημένη διαδικασία καλλιέργειας και απομόνωσης των κυττάρων.



Σχήμα 17 : Ενζυμική βιοαναγωγή της ακετοφαινόνης χρησιμοποιώντας ολόκληρα κύτταρα RasADH.

Καθαρή πρωτεΐνη SyADH

Η τελική συγκέντρωση της καθαρής πρωτεΐνης είναι 0,277 mg/ml. Όλα τα πειράματα που έγιναν δεν έδειξαν κάποια βιομετατροπή. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως η πρωτεΐνη αυτή είναι πολύ ασταθής, καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία η RasADH, η οποία μοιάζει πολύ με την SyADH, έχει χρόνο ζωής μόλις 6 ώρες[51] και για να χρησιμοποιηθεί ως καθαρό ένζυμο πρέπει πρώτα να σταθεροποιηθεί με διάφορα πολυμερή.

Γενικό πειραματικό ενζυμικών αντιδράσεων με λυοφιλοποιημενα κύτταρα RasADH.

Λυοφιοποιημένα κύτταρα E.coli/RasADH (15 mg) επανυδατώνονται σε Eppendorf με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (1 ml, 50 mM, pH 7,5), και τοποθετούνται στον

αναδευτήρα για 30 min στους 30 ^{o}C και στις 170 rpm. Έπειτα προστίθεται η κετόνη (5 mg), η γλυκόζη (24 mg), το NADPH (2 mg) και η GDH(1 mg). Η αντίδραση αφήνεται προς ανάδευση στους 30 ^{o}C για 24 h. Τέλος ακολουθούν εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα (2 x 0.5 ml) και οι οργανικές φάσεις διαχωρίζονται από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (2 Min, 1300 rpm). Το ποσοστό βιομετατροπής προσδιορίζεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

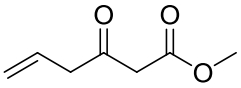
Γενικό πειραματικό ενζυμικών αντιδράσεων με λυοφιλοποιημενα κύτταρα RasADH από βιβλιογραφία.[32]

Λυοφιοποιημένα κύτταρα E.coli/RasADH (20 mg) επανυδατώνονται σε Eppendorf με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (600 μl, 50 mM, pH 7,5, 1 mM NADPH), και τοποθετούνται στον αναδευτήρα για 30 min στους 30 ^{o}C και στις 120 rpm. Έπειτα προστίθεται η κετόνη (10 mg), η γλυκόζη (5 eq) και η GDH (1 U). Η αντίδραση αφήνεται προς ανάδευση στους 30 ^{o}C για 24 h. Τέλος ακολουθούν εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα (2 x 0.5 ml) και οι οργανικές φάσεις διαχωρίζονται από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (2 Min, 1300 rpm).

Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, επιτεύχθηκε η καλλιέργεια και η περαιτέρω λυοφιλοποίηση ανασυνδυασμένων E.coli που περιέχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την RasADH. Εφαρμόστηκε τροποποιημένη πειραματική διαδικασία ενζυμικών αντιδράσεων, καθώς οι αποδόσεις των βιοαναγωγών δεν ανταποκρινόταν με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας, όταν χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο πειραματικό της. Ενζυμικές αντιδράσεις με ολόκληρα κύτταρα και υπερκείμενο διάλυμα, δεν έδειξαν αισθητές διαφορές, πράγμα που επιβεβαιώνει πως η πρωτεΐνη μας βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση (υπερέκφραση) και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του υπερκείμενου δεν είναι σε ικανή ποσότητα ώστε να δημιουργήσουν κάποιο πρόβλημα τόσο στο υπόστρωμα όσο και στο προϊόν της αναγωγής. Βρέθηκε ότι η κατάλληλη ποσότητα λυοφιλοποιημένων κυττάρων είναι 10 mg για τις αντίστοιχες ποσότητες υποστρώματος (5 mg) και ανακυκλωτικού συστήματος (NADPH 2 mg, GDH 1mg, γλυκόζη 24 mg). Ωστόσο, κρίνεται σκόπιμη η αύξηση της ποσότητας των χρησιμοποιούμενων κυττάρων σε 15 mg, ώστε να εξασφαλίζεται η αποδοτικότητα των πληθυσμών. Αντίστοιχα, μετά τον καθαρισμό της SyADH, δεν παρατηρήθηκε

πειραματικά καμία βιομετατροπή με το καθαρό ένζυμο. Αυτό οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στο γεγονός ότι το ένζυμο είναι ασταθές στη καθαρή του μορφή, όπως συμβαίνει και στο αντίστοιχο της RasADH. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν βιομετατροπές και σε υποστρώματα που λόγω μικρού μεγέθους δεν αναμενόταν να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναφερθεί η εφαρμογή της RasADH στο συγκεκριμένο μη ογκώδες υπόστρωμα **52**.



52

Τέλος, με τη διαδικασία που πραγματοποιήθηκε, είναι πλέον διαθέσιμα δύο νέα ένζυμα RasADH και SyADH, για περαιτέρω βιοκαταλυτικές αναγωγές με ογκώδη και μη υποστρώματα.

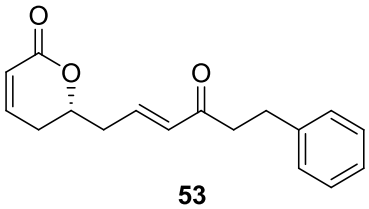
ΚΕΦΑΛΑΙΟ

2

2.1 Χημειοενζυμική σύνθεση του επιμερούς του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone.

Τα φυτά παράγουν μια τεράστια ποικιλία από φυσικά προϊόντα διαφόρων δομών. Τα προϊόντα αυτά ονομάζονται *δευτερογενείς μεταβολίτες*, και σε αντίθεση με τους *πρωτογενείς* δεν σχετίζονται με την ανάπτυξη και τις ζωτικές ανάγκες του φυτού. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα στο παρελθόν να χαρακτηριστούν αυτές οι ουσίες ως "απόβλητα" (waste products) με καμία δραστική λειτουργία στο φυτό. Πλέον, εδώ και αρκετά χρόνια είναι γνωστό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλουν στην άμυνα των φυτών απέναντι στα φυτοφάρμακα και τους παθογόνους μικροοργανισμούς και κυρίως λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια ή ορμόνες για την εκκίνηση ή τον τερματισμό μιας διαδικασίας όπως π.χ η αναπαραγωγή. Κατά την διάρκεια της ιστορίας του ανθρώπινου γένους, τα φυτά έχουν αποτελέσει μια ανεξάντλητη πηγή φυσικών προϊόντων, για την παραγωγή καρυκευμάτων, χρωστικών και κυρίως φαρμακευτικών ουσιών.[52]

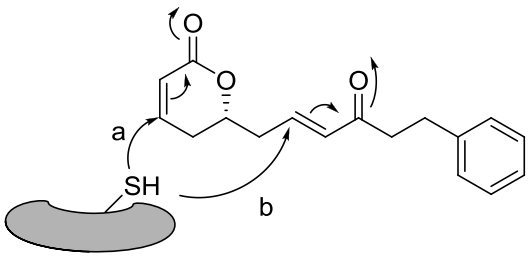
Το 2009 ο Cardellina και οι συνεργάτες του, απομόνωσαν για πρώτη φορά την ένωση 6-(4-οξο-6-φαινυλ-εξ-2-ενυλ)-5,6-διυδρο-πυραν-2-ονη, ή αλλιώς (*R*)-rugulactone **53** (**Σχήμα 16**), μια νέα α-πυρανόνη η οποία αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη του φυτού Cryptocarya rugulosa της οικογένειας Lauraceae.[53]



53

Σχήμα 16: (*R*)-rugulactone **53**.

Τα πιο κοινά φυτικά προϊόντα που εκχυλίζονται συνήθως από αυτήν την οικογένεια είναι αλκαλοειδή, φλαβονοειδή και α-πυρόνες.[54,55,56] Την τελευταία δεκαετία πολλοί ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους σε φυσικά προϊόντα με σκελετό α,β-ακόρεστων α-πυρονών, καθώς αποτελούν δέκτες Michael για κατάλοιπα αμινοξέων που υπάρχουν σε διάφορους υποδοχείς.[57] (**Σχήμα 17**)

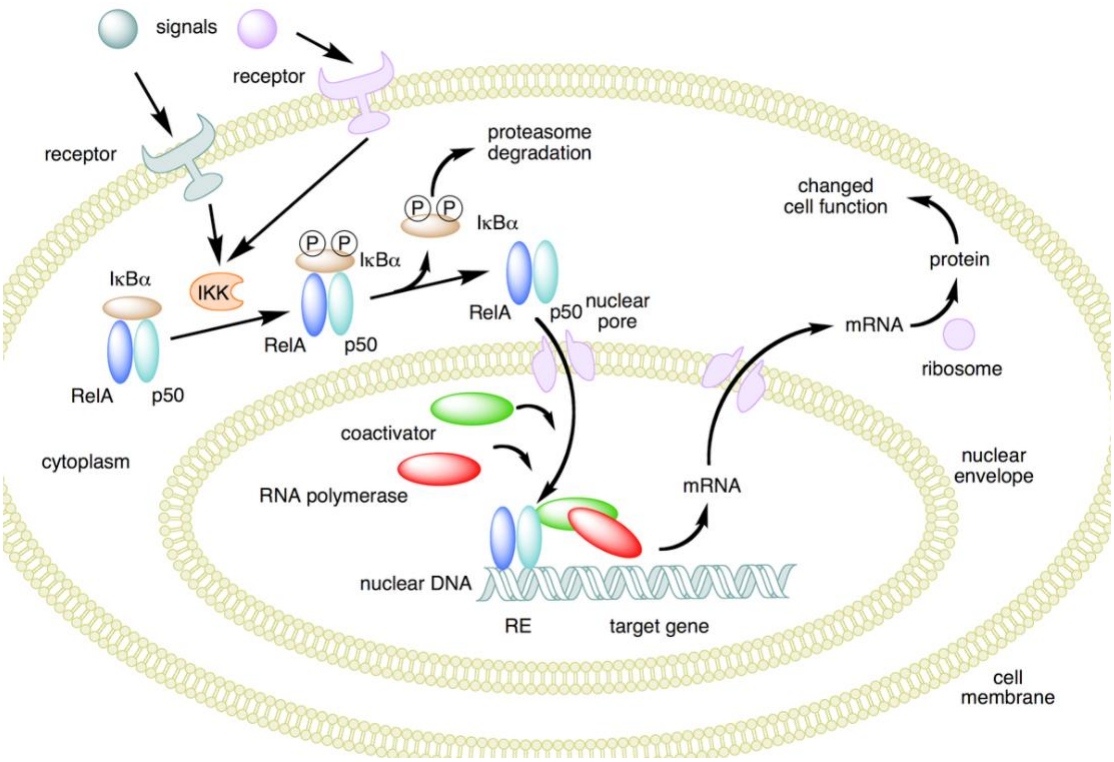


Σχήμα 17 : Οι α,β-ακόρεστες α-πυρόνες ως δέκτες Michael.

Η ίδια ομάδα παρατήρησε ότι το παραπάνω φυσικό προϊόν **53**, έχει την ικανότητα να αναστέλλει το μεταβολικό μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα NF-κB

Πυρηνικός παράγοντας NF-κB

Ο NF-κB είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε το 1986 στον πυρήνα των Β κυττάρων ως ένας παράγοντας που δεσμεύεται στον ενισχυτή της *κ* αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης.[58] Σήμερα, είναι γνωστό ότι εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών.[59] Στην ενεργό του μορφή ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε ανοσο- ή φλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται στην απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση.[60] Η πρωτεΐνη IkBα, δρα ως φυσιολογικός αναστολέας, και διατηρεί στην ανενεργό του μορφή τον πυρηνικό παράγοντα που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Για την ενεργοποίησή του, διάφορα εξωκυττάρια σήματα αρχικά ενεργοποιούν την κινάση του αναστόλεα (IKK), η οποία με τη σειρά της θα τον φωσφορυλιώσει. Το φωσφορυλιωμένο προϊόν, προσελκύει ουβικινόνες, οι οποίες θα αποδεσμεύσουν τον αναστολέα από τον πυρηνικό παράγοντα (ουβικιτινίωση). Ο ενεργός πλέον NF-κB, μπορεί να εισέλθει στο πυρήνα του κυττάρου, και να προσδεθεί στο DNA. (**Σχήμα 18**)

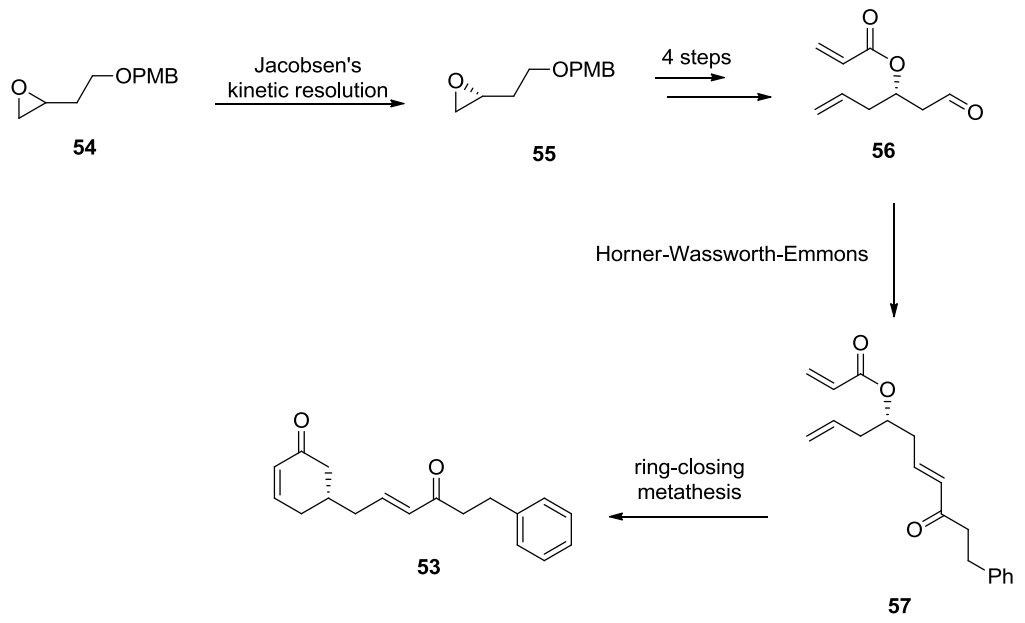


Σχήμα 18: Ενεργοποίηση μεταβολικού μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα NF-κB.

Σύνθεση της (*R*)-rugulactone από διάφορες ερευνητικές ομάδες

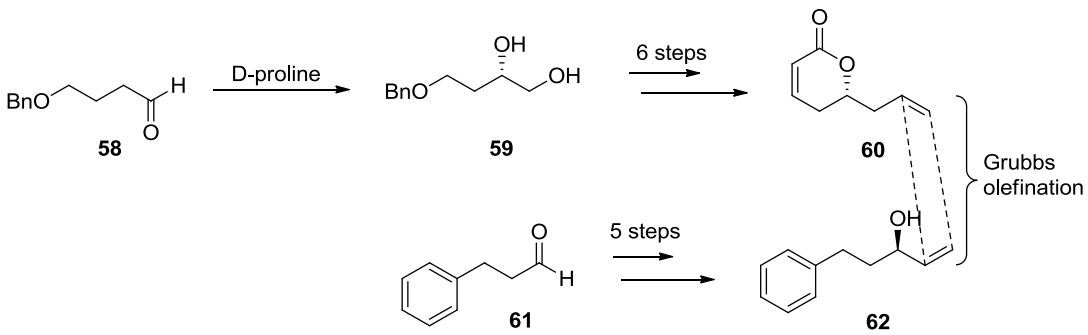
Δεδομένης της σπουδαιότητας σύνθεσης αναστολέων του παράγοντα NF-kB, πολλές ερευνητικές ομάδες προχώρησαν στην σύνθεση της rugulactone **53**, αφού αποτελεί ένα από τους πιο ισχυρούς αναστολείς. Η απομόνωση του φυσικού προϊόντος με εκχυλίσεις από το αντίστοιχο φυτό δεν είναι μια αποδοτική διαδικασία (7 mg προϊόντος από εκχύλιση 735 g ξηρών φύλλων), πράγμα που καθιστά ακόμα πιο αναγκαία την χημική σύνθεσή του.

Η πρώτη ολική χημική σύνθεση του **53** έγινε το ίδιο έτος με την απομόνωσή του, από τους Mohapatra, Yadav και την ερευνητική τους ομάδα.[61] Η σύνθεση αυτή περιλαμβάνει ως στάδια κλειδιά, μία αντίδραση κινητικού διαχωρισμού (Jacobsen) με χρήση ενός χειρόμορφου συμπλόκου Co^{III}, μια αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons και ένα κλείσιμο δακτυλίου με κλασική αντίδραση ολεφινοποίησης με καταλύτη Grubbs. (**Σχήμα 19**)



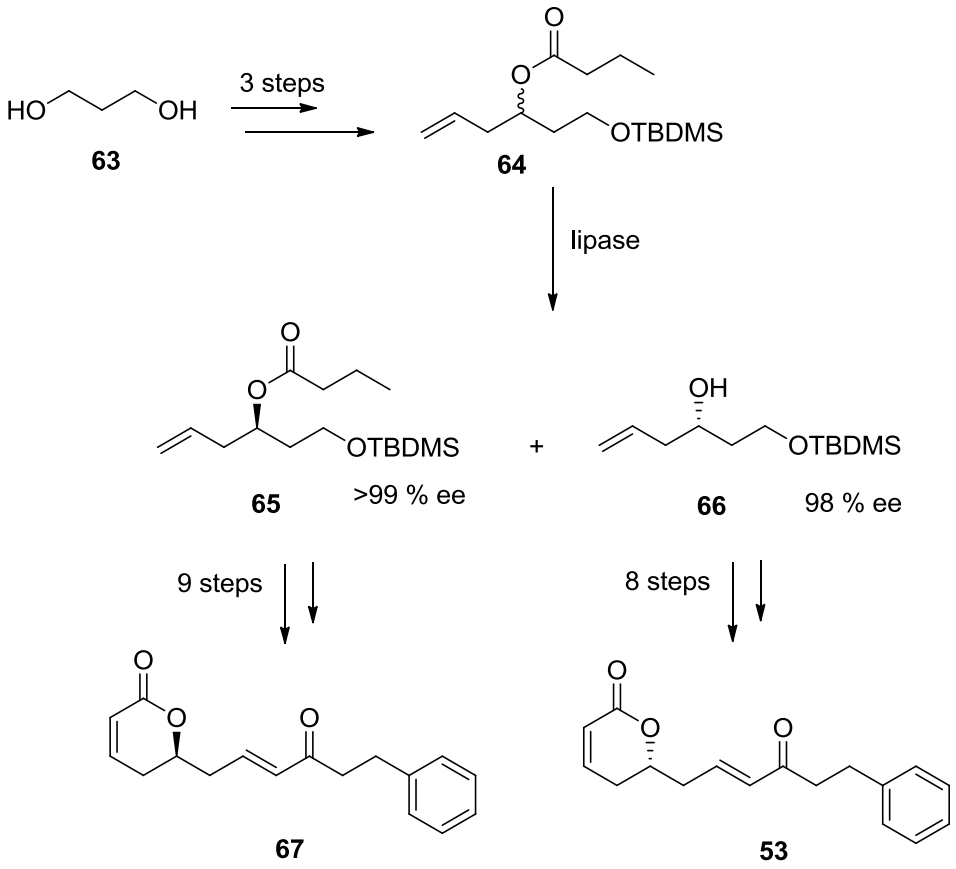
Σχήμα 19: Συνθετική πορεία από την ερευνητική ομάδα των Mohapatra και Yadav.

Μια διαφορετική προσέγγιση για την σύνθεση και των δύο εναντιομερών πραγματοποιήθηκε το 2010 από την ερευνητική ομάδα του Venkateswarlu.[62] Η συνθετική αυτή πορεία είναι πολυπλοκότερη και περιλαμβάνει περισσότερα στάδια από την προηγούμενη σύνθεση, ωστόσο στο τελικό στάδιο πραγματοποιείται μια αποδοτική αντίδραση ολεφινοποίησης με καταλύτη Grubbs. Πολλές ερευνητικές ομάδες στην συνέχεια θα χρησιμοποιήσουν την ίδια τελική αντίδραση για τον σχηματισμό του φυσικού προϊόντος **53**. (**Σχήμα 20**) Για την σύνθεση του επιμερούς της rugulactone πραγματοποιείται η ίδια πορεία, αντιστρέφοντας σε ένα επιπλέον βήμα το στερεογονικό κέντρο με μια αντίδραση Mitshunobu.



Σχήμα 20: Συνθετικη πορεία του Venkateswarlu. Αντίδραση ολεφινοποίησης προς σχηματισμο του **53**.

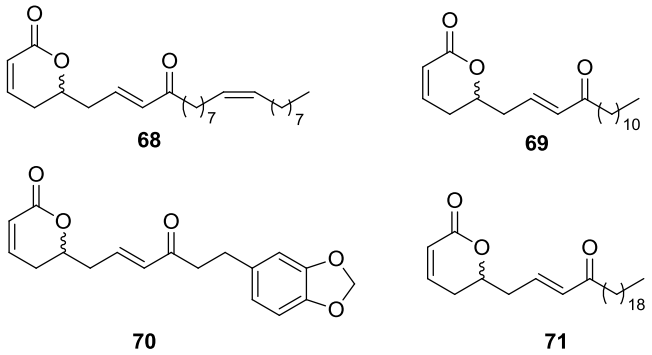
Την ίδια χρονιά πραγματοποιήθηκε και η πρώτη χημειοενζυμική σύνθεση και των δύο εναντιομερών της rugulactone **53** από τον Fadnavis και την ερευνητική του ομάδα.[63] Με χρήση μιας λιπάσης (Candida rugosa) στο στάδιο κλειδί και με κινητικό διαχωρισμό επιτεύχθηκε η απορακεμοποίηση του ενδιαμέσου **64**. (**Σχήμα 21**) Αν και είναι η πρώτη χημειοενζυμική σύνθεση που εμφανίστηκε στην βιβλιογραφία, η απόδοση των τελικών προϊόντων είναι πολύ μικρή λόγω του ενζυμικού κινητικού διαχωρισμού, που μπορεί να δώσει μέγιστη απόδοση στο βήμα αυτό 50 % για κάθε εναντιομερές, και των μετέπειτα πολλών σταδίων.



Σχήμα 21: Συνθετική πορεία πρώτης χημειοενζυμικής σύνθεσης.

Οι συνθέσεις αυτές θα αποτελέσουν έναυσμα για πολλές άλλες νέες συνθετικές πορείες,[64] ωστόσο καμία από αυτές δεν μπορεί να θεωρηθεί απλή ή αποτελεσματική, καθώς δεν υπάρχει οικονομία σταδίων, χρησιμοποιούνται ακριβοί χειρόμορφοι καταλύτες σε κάθε σύνθεση, ενώ σε καμία περίπτωση η απόδοση δεν ξεπέρασε το

20%. Μια αντίστοιχη απόπειρα σύνθεσης της *(R)-rugulactone* είχε γίνει και από την ερευνητική μας ομάδα, χωρίς ιδιαίτερη επιτυχία.[65] Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν δείξει πως πολλά παράγωγα της rugulactone, ανεξαρτήτου στερεοχημείας, εμφανίζουν δραστικότητα ίδια αλλά τις περισσότερες φορές μεγαλύτερη από τον ίδιο το δευτερογενή μεταβολίτη.[66] (**Σχήμα 22**)



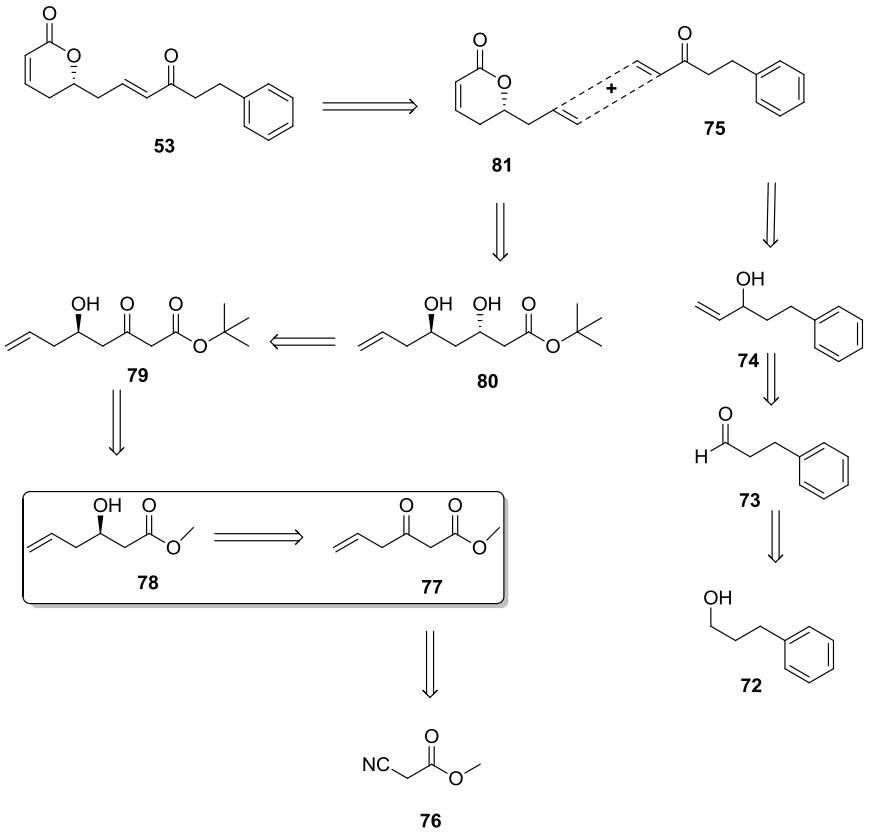
Σχήμα 22: Παράγωγα της rugulactone με μεγάλη δραστικότητα.

Όλες οι παραπάνω ενώσεις, είτε με (*R*)- είτε με *(S)*-στερεογονικό κέντρο, αποτελούν δέκτες Michael και μελετούνται ακόμα μέχρι και σήμερα.[67] Η συνθετική πορεία που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των παραγώγων είναι αυτή του Mohapatra και της ερευνητικής του ομάδας,[61] η οποία εκτός ότι δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική, περιέχει αρκετά στάδια σύνθεσης στα οποία χρησιμοποιούνται ακριβα αντιδραστήρια.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η προσπάθεια χημειοενζυμικής σύνθεσης του φυσικού προϊόντος **53** (*R*)-rugulactone με τη χρήση απομονωμένων κετοredουκτασών για τη εκλεκτική αναγωγή ενός β-κετοεστέρα, που είναι και η αντίδραση κλειδί της συνθετικής πορείας.

2,2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο στόχος μας ήταν η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone, **53**. Είναι γνωστό στη βιβλιογραφία,[62] όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πως η ένωση **53** μπορεί να σχηματιστεί εύκολα και αποδοτικά ύστερα από αντίδραση cross μετάθεσης, μεταξύ της ενόνης **75** και της ακόρεστης πυρόνης **81.** Το ενδιάμεσο **81** μπορεί να προέλθει από κυκλοποίηση και μετέπειτα αφυδάτωση του β,δ-διυδροξυ εστέρα **80**. Η ένωση **79** μπορεί να προκύψει από αντίδραση συμπύκνωσης Claisen του υδρόξυ εστέρα **78** με τον εμπορικά διαθέσιμο tert-βουτυλοξικό μεθυλεστέρα.

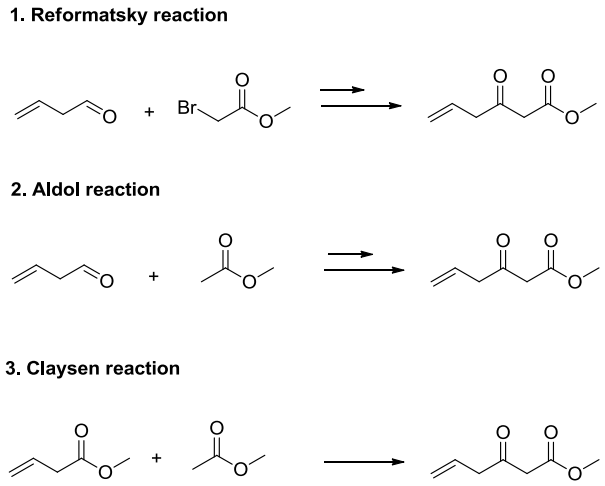


Σχήμα 23: Ρετροσυνθετική πορεία της (*R*)-rugulactone **53**.

Το στάδιο κλειδί της σύνθεσης είναι η ενζυμική αναγωγή του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλεστέρα **77**, ο οποίος θα μπορούσε να συντεθεί με αντίδραση Grignard από τον εμπορικά διαθέσιμο 2-κυανο-οξικό μεθυλεστέρα **76**. Η προτεινόμενη σύνθεση του

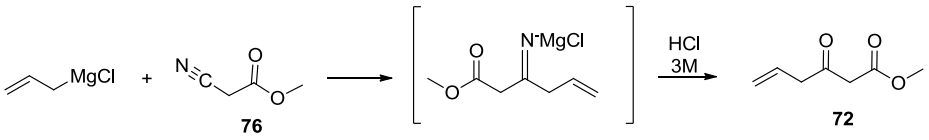
ενδιάμεσου **75** είναι αρκετά εύκολη, καθώς περιλαμβάνει απλές αντιδράσεις οξείδωσης και μια αντίδραση Grignard. Η παραπάνω συνθετική ανάλυση αποτελεί την προτεινόμενη ρετροσύνθεση του φυσικού προϊόντος **53**. (**Σχήμα 23**)

Αναλυτικότερα, ο 3-οξο-5-εξενοϊκός μεθυλεστέρας **77** δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος και βιβλιογραφικά δεν υπάρχει κάποια πρόσφατη σύνθεσή του. Κλασικές αντιδράσεις σύζευξης C-C για την σύνθεση κετο ή υδροξυ εστέρων, όπως αλδολική συμπύκνωση, αντίδραση Reformatsky και αντίδραση Claisen είτε δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν είτε έγιναν και απέτυχαν. Συγκεκριμένα, τόσο η αλδολική συμπύκνωση όσο και η Reformatsky χρειάζονται για να πραγματοποιηθούν ως αντιδρών μια αλδεΰδη, στη δική μας περίπτωση την 3-βουτενάλη. Το μόριο αυτό δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο, είναι εξαιρετικά πτητικό και προσπάθειες σύνθεσης τέτοιων μικρών αλδεϋδών χρειάζονται κατάλληλα συστήματα απόσταξης έτσι ώστε να απομονωθούν χωρίς να εξατμιστούν μετά το πέρας της αντίδρασης. (**Σχημα 24**)



Σχήμα 24: Τρόποι σύνθεσης του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλεστέρα.

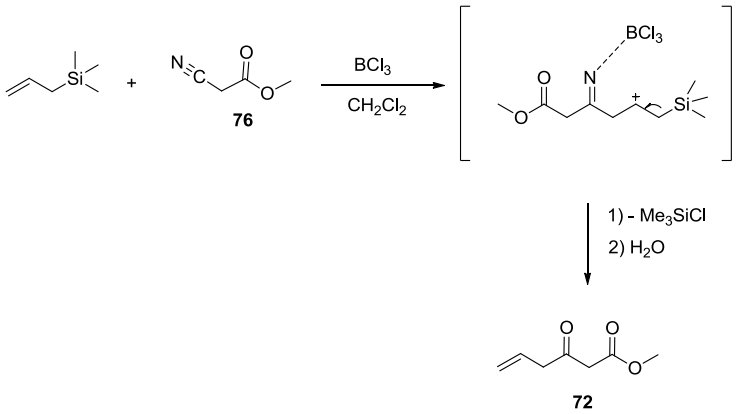
Από την αντίδραση Claisen συντέθηκε ως κύριο προϊόν, το προϊόν αυτοσυμπύκνωσης, ενώ δεν σχηματίστηκε καθόλου η επιθυμητή ένωση. Στη βιβλιογραφία, όσες ομάδες χρειάστηκαν να συνθέσουν τον εστέρα **77** χρησιμοποίησαν το πειραματικό του Anderson,[68] ο οποίος πραγματοποιεί μια αντίδραση τύπου Grignard. (**Σχημα 25**)



Σχήμα 25: Αντίδραση τύπου Grignard για την σύνθεση της ένωσης **72**.

Η απόδοση της αντίδρασης είναι 58% σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ωστόσο άλλες ερευνητικές ομάδες[69] χρησιμοποιώντας αυτή την πειραματική μέθοδο ανέφεραν απόδοση 26%. Το γεγονός αυτό δεν επηρέασε καμία από τις ερευνητικές ομάδες καθώς όλες οι αντιδράσεις που τους ενδιέφεραν πραγματοποιούνταν σε μεγάλη κλίμακα (π.χ. 37 g νιτριλίου). Πραγματοποιώντας αυτή την αντίδραση παρατηρήσαμε και εμείς μικρή απόδοση, οπότε για την βελτίωση της απόδοσης δοκιμάστηκαν και άλλες μεθόδοι.

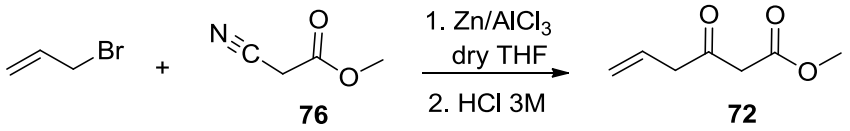
Μια άλλη συνθετική προσέγγιση για τον εστέρα **77** είναι εκείνη των Sugasawa και Hamana,[70] οι οποίοι πρόσθεσαν αλλυλο-τριμεθυλοσιλάνιο στον νίτριλο εστέρα **76** παρουσία ενός ισχυρού οξέος κατά Lewis, του τριχλωριούχου βορίου. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε επιτυχώς με απόδοση 56 %, ωστόσο δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα (>1 g), πράγμα που αναφέρεται και στην βιβλιογραφια.[69] Επιπρόσθετα η χρήση ενός τόσο διαβρωτικού αντιδραστηρίου καθιστά την πειραματική διαδικασία δύσκολη. (**Σχήμα 26**)



Σχήμα 26: Συνθετική προσέγγιση των Sugasawa και Hamana.

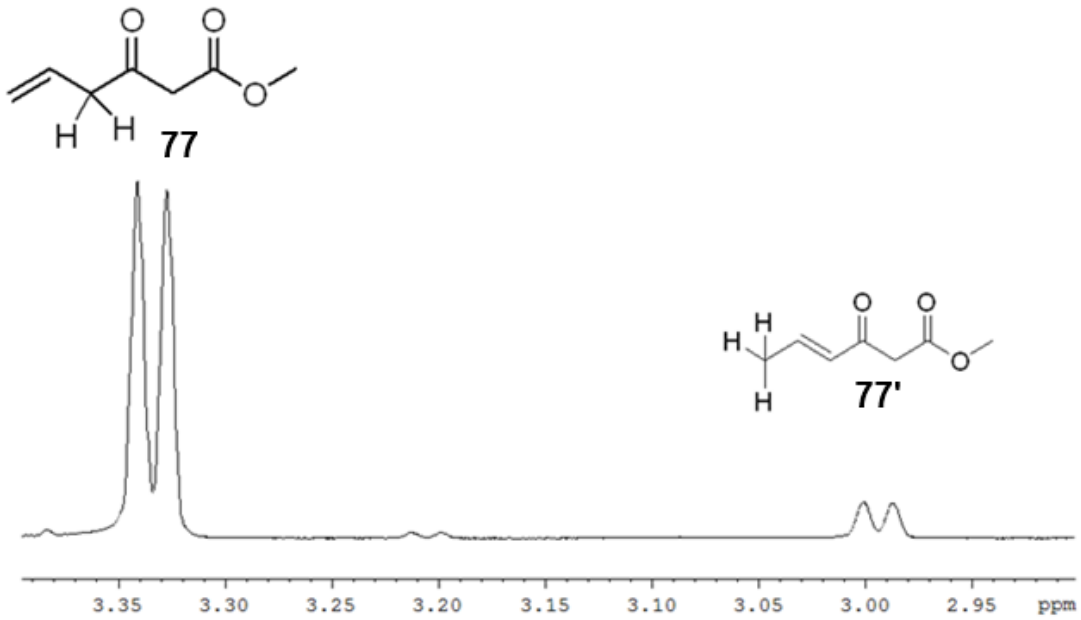
Το 1901, ο Blaise, ανέφερε για πρώτη φορά την σύνθεση β,γ–ακόρεστων κετονών από αντιδραση νιτριλίων με άλλυλο αλογονίδια, παρουσία ψευδαργύρου.[71]

Χρησιμοποιώντας παρόμοιο πειραματικό[72] πραγματοποιήσαμε επιτυχώς τη σύνθεση του **77** με απόδοση 52 %, πολύ καλύτερη από τις προηγούμενες προσπάθειες.



Σχήμα 27 : Σύνθεση του 3-οξο-5-εξενοϊκου μεθυλεστέρα 72.

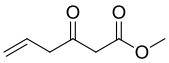
Ο εστέρας **72** είχε την τάση να ισομερίζεται, καθώς ο διπλός δεσμός μετακινείται κατά μία θέση. Η παρατήρηση αυτή έγινε αντιληπτή μέσω φασματοσκοπίας ^{1}H NMR (**Εικόνα 13**)



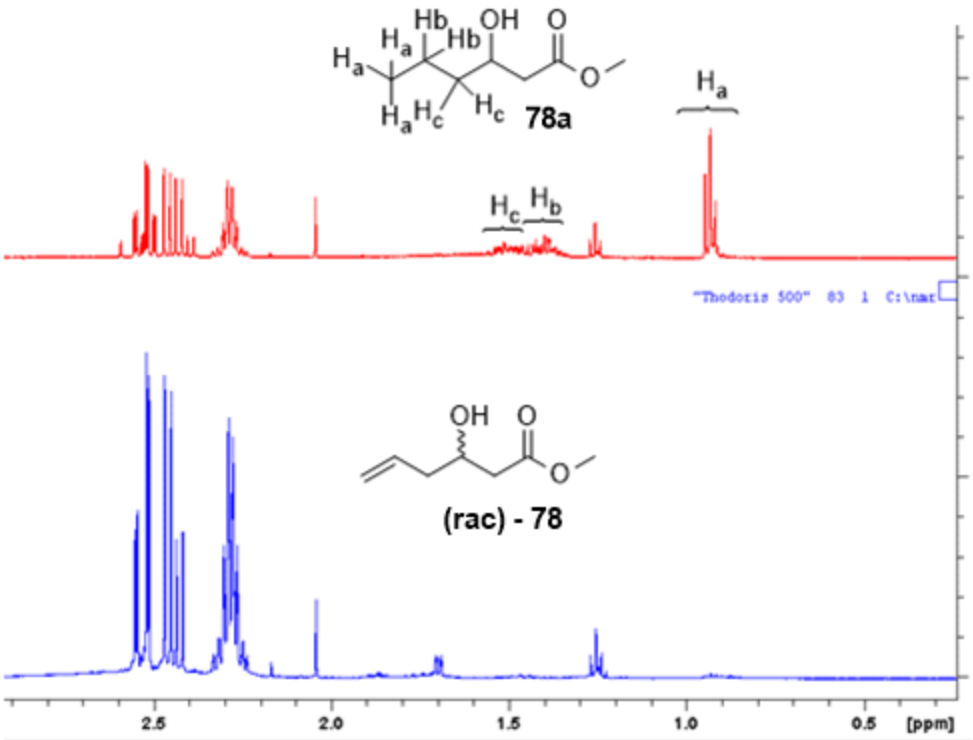
Εικόνα 13: Φάσμα ^{1}H NMR τον κετοεστέρα **77** και το ισομερές του **77΄**.

Στην συνέχεια, προχωρήσαμε σε έλεγχο σταθερότητας του υποστρώματος **77**, στις συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι δοκιμές. (**Πίνακας 5**)

Πίνακας 5: Έλεγχος σταθερότητας του υποστρώματος **77** σε διάφορες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης.

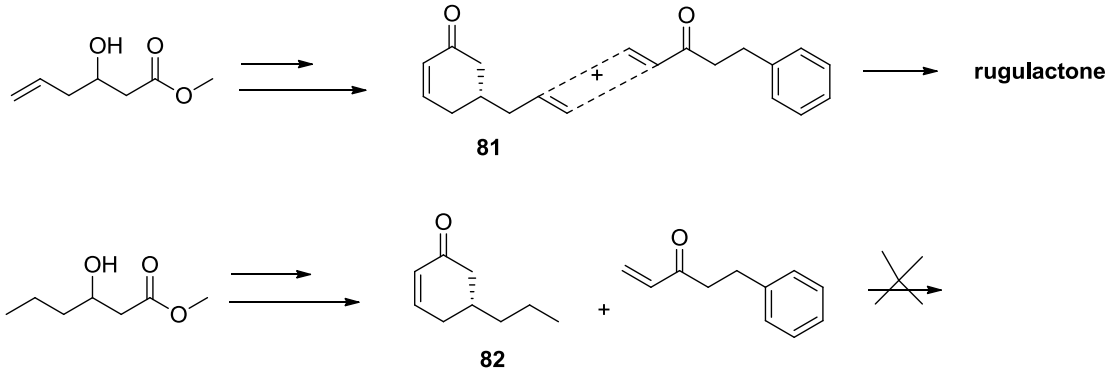
 **77**	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφωρικών 200mM	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl 150mM	Θερμοκρασία σε ^{o}C	pH	Αποτέλεσμα
1^{η} Δοκιμή	+	-	37	6,9	Ασταθές
2^{η} Δοκιμή	-	+	37	6,9	Ασταθές
3^{η} Δοκιμή	+	-	25	6,9	Ασταθές
4^{η} Δοκιμή	-	+	25	6,9	Ασταθές
5^{η} Δοκιμή	-	+	37	7,2	Ασταθές
6^{η} Δοκιμή	-	+	0-3	6,9	**Σταθερό**

Με βάση λοιπόν τα δεδομένα που είχαν συλλεχθεί και την εμπειρία μας στις ενζυμικές αντιδράσεις προηγούμενων ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων, προχωρήσαμε σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων με κατάλληλες κετοredουκτάσες που εμφανίζουν εκλεκτικότητα σε τέτοιου είδους υποστρώματα. Από τις 20 διαφορετικές απομονωμένες κετοredουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν, οι Kred 101, 121, B1F, A1D, 119 παρουσίασαν την μεγαλύτερη βιομετατροπή (> 99 %), όπως προσδιορίστηκαν από τα φάσματα ^{1}H NMR. Ωστόσο, όπως παρατηρήθηκε στα φάσματα ^{1}H NMR των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων υπάρχει ένα ποσοστό που κυμαίνεται απο 18 - 21 % του κορεσμένου υδρόξυ εστέρα **78a**. (**Εικόνα 14**)



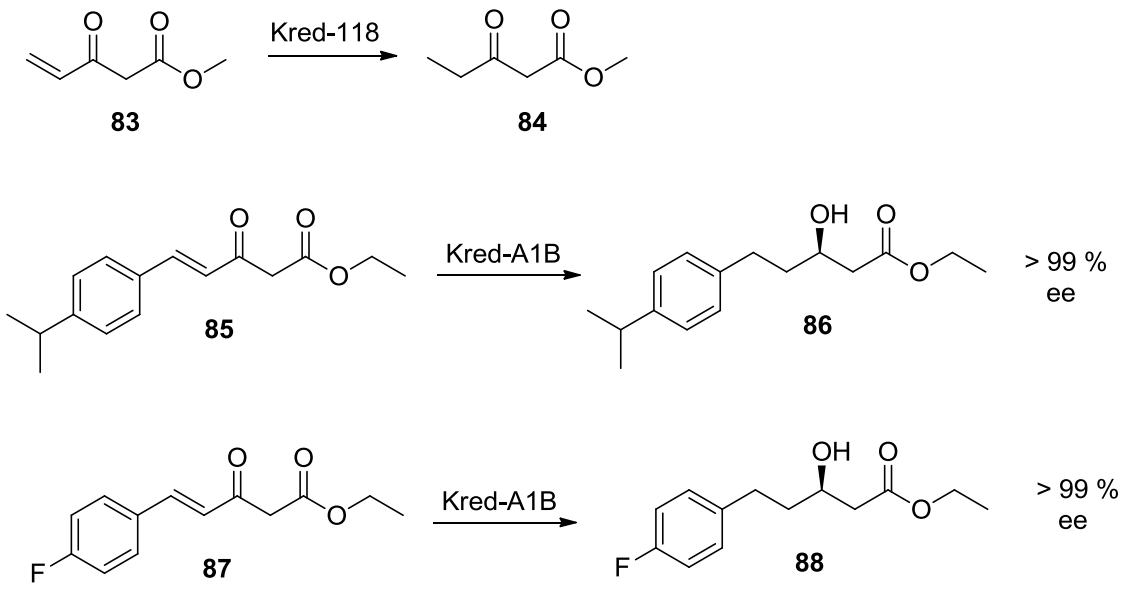
Εικόνα 14: Το μπλε φάσμα (κάτω) αντιστοιχεί στο προϊόν χημικής αναγωγής του εστέρα **78** (περιοχή 0.5 - 2,7 ppm). Το κόκκινο φάσμα (πάνω) αντιστοιχεί στο προϊόν ενζυμικής αναγωγής με την KRED-B1F, όπου φαίνεται η ύπαρξη του παραπροϊόντος **78a**.

Έγινε προσπάθεια διαχωρισμού του **78a** από το **78,** με χρωματογραφία στήλης και με προπαρασκευαστικό TLC χωρίς καμία από τις δύο μεθόδους να έχει ουσιαστικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε σε ενζυμική αντίδραση μεγαλύτερης κλίμακας (scale-up) που θα μας επέτρεπε να συνεχίζαμε την συνθετική πορεία με το κατάλληλο οπτικά καθαρό ενδιάμεσο. Σε περίπτωση που χρειαζόταν να συντεθεί η οπτικά καθαρή λακτόνη **81** από τον οπτικά καθαρό εστέρα **78**, το παραπροϊόν θα συνέβαλε στην δημιουργία της λακτόνης **82** (**Σχήμα 28**), ωστόσο δεν θα μπορούσε να αντιδράσει στο επόμενο βήμα με την ενόνη **75** σε μία αντίδραση ολεφινοποίησης με καταλύτη Grubbs λόγω απουσίας του διπλού δεσμού. Το γεγονός ότι μερικές κετοredουκτάσες μπορούν να καταλύουν και την αναγωγή διπλού δεσμού δεν υποδηλώνει απαραίτητα κάποιο διττό ρόλο στα ένζυμα. Πιθανότατα η δράση ene-ρεδουκτάσης στα ένζυμά μας να οφείλεται σε μερικά διατηρημένα τμήματα DNA που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες ene-ρεδουκτάσες σε μικρότερο ποσοστό από τις κετοredουκτάσες.



Σχήμα 28: Απουσία διπλού δεσμού, η λακτόνη **82** δεν θα αντιδράσει με την αντίστοιχη ενόνη.

Αυτή η δράση ορισμένων κετοredουκτασών, έχει παρατηρηθεί και σε παλαιότερες μελέτες κατάλυσης από την ερευνητική μας ομάδα. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη διπλού δεσμού σε α,β-θέση ως προς το καρβονύλιο, δημιουργεί κατάλληλες προϋποθέσεις για αναγωγή. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται μερικά υποστρώματα από προηγούμενες εργασίες μας,[73] όπου ανάχθηκε ενζυμικά και ο διπλός δεσμός εκτός από την αναγωγή καρβονυλίου σε πολύ υψηλό ποσοστό. (**Σχήμα 29**)



Σχήμα 29: Αναγωγή διπλού δεσμού από κετοredουκτάσες.

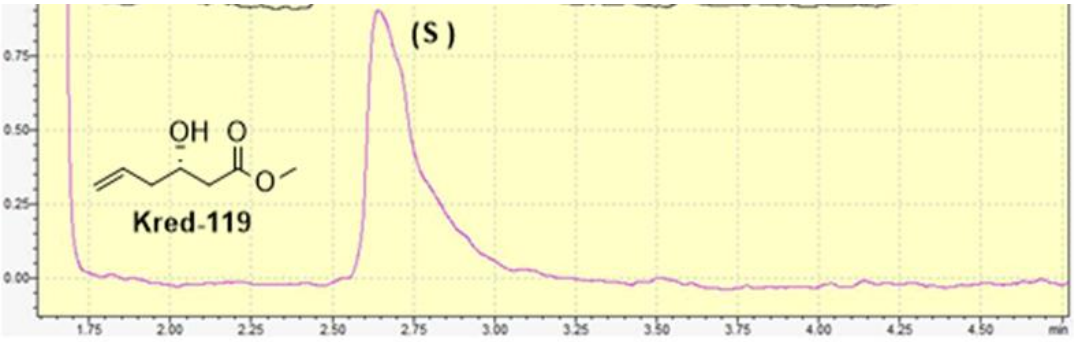
Στην προσπάθεια εντοπισμού ενός οξειδοαναγωγικού ενζύμου που δεν θα καταλύει και την αναγωγή διπλού δεσμού, πραγματοποιήθηκε και πείραμα ενζυμικής

αναγωγής με ολόκληρα κύτταρα E.coli στα οποία έχει υπερεκφραστεί η RasADH. Αν και οι δοκιμές για τη σταθερότητα του εστέρα **77** έδειξαν ότι σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 15 ^{o}C το υπόστρωμα είναι ασταθές, υποθέσαμε πως υπάρχει περίπτωση η ένωση να εισέρχεται γρήγορα μέσα στο κύτταρο, να πραγματοποιείται η κατάλυση, χωρίς ενδεχόμενη καταστροφή του υποστρώματος. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε, με μετατροπή > 99 %, ωστόσο, προς έκπληξη μας, παρατηρήθηκε και εδώ ένα ποσοστό της τάξης του 13 %, σε προϊόν διπλής αναγωγής.

Γενικά, το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης ανασυνδυασμένων κυττάρων είναι η υπερέκφραση της αφυδρογονάσης που εξαλείφει σε πολύ μεγάλο βαθμό την δράση ενδογενών αφυδρογονασών που δρουν είτε ανταγωνιστικά είτε συμπληρωματικά και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ειδικότητας και της δραστικότητας χωρίς να απαιτείται καθαρισμός του ενζύμου.[74] Παρ' όλα αυτά δεν αποκλείεται η δημιουργία κάποιου παραπροϊόντος, όπως στην περίπτωσή μας.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι μια αλκοολική αφυδρογονάση (RasADH) που εμφανίζει εκλεκτικότητα για ογκώδη υποστρώματα μπορεί και καταλύει αποδοτικά υποστρώματα πολύ μικρότερου μεγέθους. Η παρατήρηση αυτή έχει αναφερθεί πρόσφατα στην βιβλιογραφία.[40]

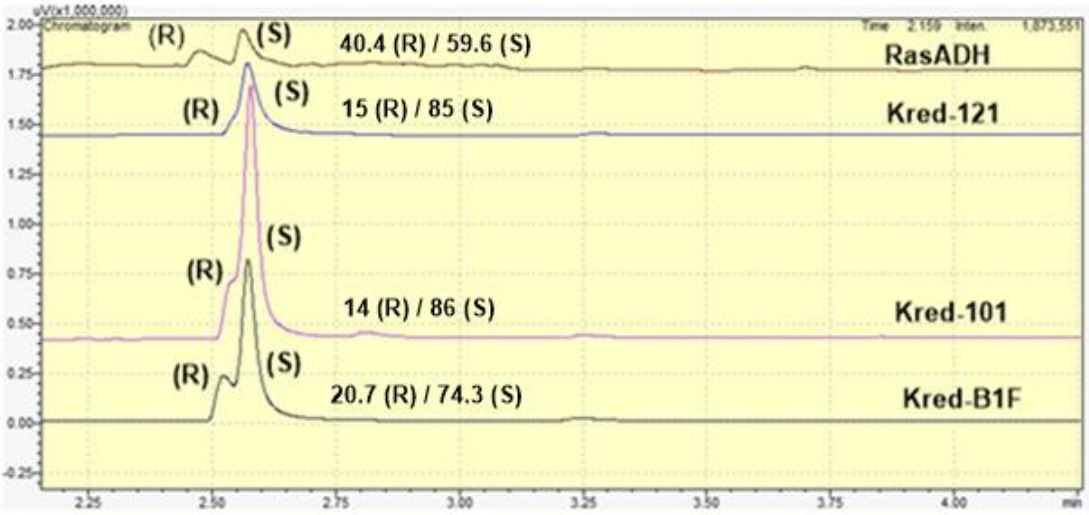
Απ' όλα τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν, μόνο η Kred-119 εμφανίζει εναντιοεκλεκτικότητα (ee > 99 %), ποσοστό το οποίο προσδιορίστηκε από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη στήλη. (**Εικόνα 15**)



Εικόνα 15: Προϊόν ενζυμικής αναγωγής με την Kred-119.

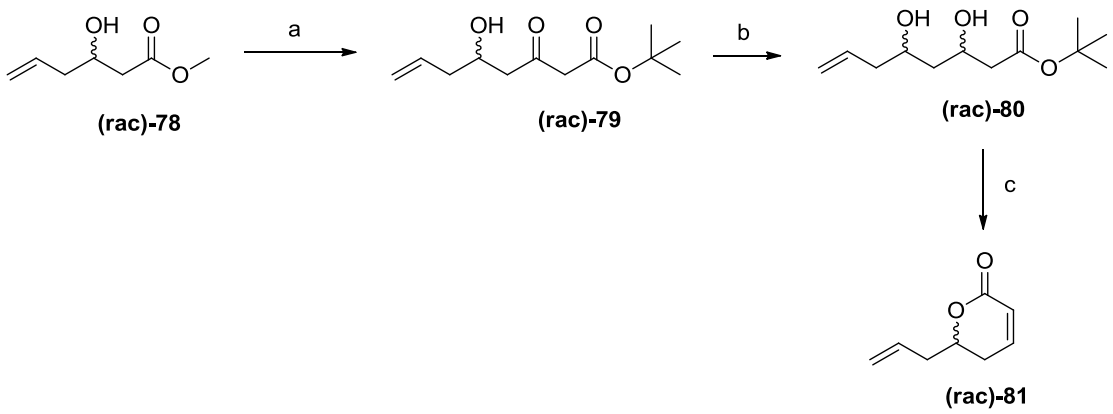
Η σχετική και απόλυτη στερεοδομή βρέθηκε με παραγοντοποίηση του χειρόμορφου προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιώντας MPA-εστέρες. Το παραπροϊόν της ενζυμικής αναγωγής δεν αποτελεί εμπόδιο στην εύρεση της στερεοχημείας του στερεογονικού κέντρου, καθώς μετά την σύνθεση των (*R*)- και (*S*)-MPA εστέρα παρατηρήσαμε στο φάσμα ^{1}H NMR ότι δεν συμπίπτει καμία

κορυφή του προϊόντος με κάποια από τις κορυφές παραπροϊόντος. Τα χρωματογραφήματα των υπόλοιπων ενζυμικών αντιδράσεων παρουσιάζονται όλα μαζί στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 16**). Σε όλες τις επιτυχείς ενζυμικές αναγωγές η στερεοαπεικόνιση του προϊόντος είναι (*S*), δηλαδή η αντίστροφη του επιθυμητού για την ολική σύνθεση της (*R*)-rugulactone. Ωστόσο, οπώς προανεφέρθηκε, ενώσεις όπως η rugalactone και παραγωγά της μελετούνται γιατι αποτελούν δέκτες Michael, χωρίς να διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο η στερεοαπεικόνιση του στερεογονικού κέντρου του άνθρακα της πυρόνης.



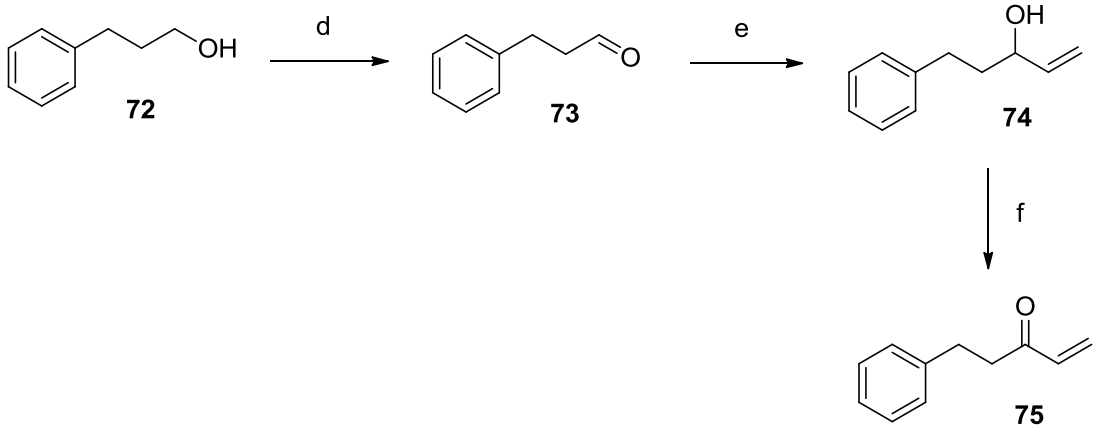
Εικόνα 16: Χρωματογραφήματα των προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **72**. Είναι εμφανής η χαμηλή εναντιοεκλεκτικότητα που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα ένζυμα.

Έχοντας ωστόσο προσδιορίσει λοιπόν το καταλληλότερο ένζυμο για την στερεοεκλεκτική αναγωγή του ενδιαμέσου κλειδί για την σύνθεση του επιμερούς της rugulactone ακολούθησε η χημική σύνθεση των υπόλοιπων ενώσεων. Πραγματοποιήθηκε αντίδραση Claisen μεταξύ του ρακεμικού υδρόξυ εστέρα **78** και του tert-βουτυλοξικού μεθυλεστέρα, και μετέπειτα χημική αναγωγή ώστε να προκύψει ο αντίστοιχος ρακεμικός διυδρόξυ εστέρας **80**. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως η ένωση **(rac)-79** δεν απομονώθηκε αλλά ανάχθηκε κατευθείαν στην ίδια φιάλη, καθώς είναι πιο εύκολος και αποδοτικός ο διαχωρισμός του **(rac)-80** από την αρχική ένωση **(rac)-78**. Τέλος, με χρήση p-TSOH, έλαβε μέρος κυκλοποίηση με ταυτόχρονη αφυδάτωση προς σχηματισμό της ρακεμικής λακτόνης **81**. (**Σχήμα 30**)



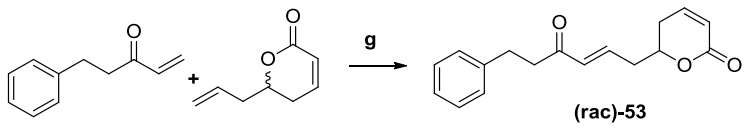
Σχήμα 30: Χημική σύνθεση της 6-αλλυλο-5,6-διυδρο-πυραν-2-όνης **83**. a) LDA, tert-βουτυλοξικός μεθυλεστέρας, ξηρό THF, -78 ^{0}C - -40 ^{0}C, **82 %** απόδοση, b) $NaBH_4$, ξηρή αιθανόλη, 0 ^{0}C – r.t, **96 %** απόδοση, c) p-TSOH, τουλουόλιο, reflux, **97 %** απόδοση.

Για τη σύνθεση της ενδιάμεσης 5-φαινυλο-πεντ-1-εν-3-όνης **75** ακολουθήθηκε μια εύκολη συνθετική πορεία (**Σχήμα 31**) αρχίζοντας από την εμπορικά διαθέσιμη 3-φαινυλο-προπαν-1-όλη **72**.



Σχήμα 31: Χημική σύνθεση της 5-φαινυλο-πεντ-1-εν-3-όνης **69**. d) TCCA/TEMPO, ξηρό THF, r.t, > **99 %** απόδοση, e) βινυλομαγνήσιο χλωρίδιο, ξηρό THF, 0 ^{0}C – r.t, **86 %** απόδοση, f) IBX, dry DMSO, r.t, **88 %** απόδοση.

Το τελευταίο στάδιο για του τελικού ρακεμικού προϊόντος **53**, αποτελεί μια αντίδραση cross μετάθεσης με καταλύτη Grubbs 2^{ης} γενιάς. Η συνολική απόδοση όλων των βημάτων του συνθετικού χημειοενζυμικού σχήματος είναι 18 % (**Σχήμα 32**). Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, καμία σύνθεση από αυτές που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία δεν έχει ξεπεράσει το 19.94 %.



Σχήμα 32: Χημική σύνθεση της ρακεμικής rugulactone **53**. g) καταλύτης Grubb's δεύτερης γενιάς (5 mol %), ξηρό CH_2Cl_2, reflux, 74 % απόδοση

Συμπεράσματα

Ο αρχικός στόχος αυτής της εργασίας, ήταν η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R)*-rugulactone. Ωστόσο καμία ενζυμική αναγωγή, στο στάδιο κλειδί, δεν έδωσε το επιθυμητό εναντιομερές. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε σε ενζυμική αντίδραση μεγαλύτερης κλίμακας (scale-up) που θα μας επέτρεπε να συνεχίσουμε την συνθετική πορεία με το κατάλληλο οπτικά καθαρό ενδιάμεσο.

Προσδιορίστηκε οτι η Kred-119 είναι η καταλληλότερη κετορεδουκτάση η οποία καταλύει την αναγωγή του πρόδρομου μορίου **77** στερεοεκλεκτικά οδηγώντας αποκλειστικά στο (*S*)-εναντιομερές. Εφόσον λοιπόν πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση σε μεγαλύτερη κλίμακα, θα είναι δυνατή η σύνθεση του επιμερούς της rugulactone, δηλαδή η (*S*)- rugulactone. Το «παραπροϊόν» της αντίδρασης, δηλαδή το προϊόν της διπλής αναγωγής τόσο του διπλού δεσμού C=C όσο και του επιθυμητού καρβονυλίου, δεν θα αποτελεί εμπόδιο στην συνθετική μας πορεία όπως προαναφέρθηκε, παρά μόνο θα συντελέσει στη μείωση της απόδοσης.

Συγκριτικά με τις άλλες δημοσιευμένες μεθόδους στη βιβλιογραφία, η δική μας συνθετική πορεία χαρακτηρίζεται από οικονομία σταδίων (9 στάδια συνολικά έναντι 10 έως 16 των άλλων), χρήση απλών και φθηνών αντιδραστηρίων, εύκολη πειραματική διαδικασία και υψηλή συνολική απόδοση 18 %. Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή του παρόντος κεφαλαίου, δεδομένου ότι έχουν βρεθεί παράγωγα της rugulactone με αντίστοιχη ενδιαφέρουσα βιολογική δραστικότητα, ανεξάρτητα από την στερεοχημεία του στερεογονικού κέντρου, με την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε είναι δυνατή η σύνθεση τους σε λίγα βήματα. Ακόμη, επιτεύχθηκε μια βελτιστοποιημένη σύνθεση του βασικού συνθετικού ενδιαμέσου **77** χρησιμοποιώντας την αντίδραση Barbier για τη σύζευξη C-C. Η αντίδραση αυτή ενδείκνυται για την

σύνθεση μικρών ενώσεων όπου κλασικές αντιδράσεις όπως π.χ αλδολική και Reformatsky, αποτυγχάνουν.

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι και η μη αναμενόμενη ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **77** από την RasADH. Πειράματα που έγιναν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 15 ^{o}C, έδειξαν οτι το υπόστρωμα **77** είναι ασταθές στις συνθήκες αυτές. Ωστόσο, σε πείραμα ενζυμικής αναγωγής με ολόκληρα κύτταρα RasADH σε θερμοκρασία 30 ^{o}C, η βιομετατροπή πραγματοποιήθηκε χωρίς το υπόστρωμα **77** να καταστραφεί. Μια ενδεχομένως πιθανή εξήγηση είναι ότι το υπόστρωμα εισέρχεται πολύ γρήγορα στα ανασυνδυασμένα κύτταρα πριν προλάβει να διασπαστεί λόγω υψηλής θερμοκρασίας οπότε η δραστική RasADH καταλύει την αναγωγή του.

2,3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

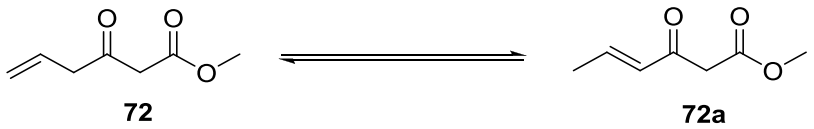
Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδροφουράνιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες της εταιρίας Merck, Silica gel 60 F254 και ως διαλύτης ανάπτυξης Hex:EtOAc σε αναλογία v/v 4/1, 2/1 και 1/1.

Οι κετορεδουκτάσες, το συνένζυμο NADPH και η αφυδρογονάση της γλυκόζης ήταν της εταιρίας Codexis και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Όργανα

Τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR ελήφθησαν με το φασματόμετρο 300 MHz ή 500 MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) σε διαλύτη $CDCl_3$. Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο της Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated β-κυκλοδεξτρίνη) 30m x 0.25mm x 0.25μm.

Σύνθεση ενώσεων



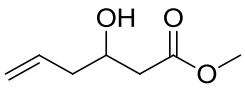
3-οξοεξ-πεντενοϊκός μεθυλεστέρας

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, $AlCl_3$ (160 mg, 1.2 mmol) προστέθηκε σε διάλυμα THF (12 mL) το οποίο περιείχε, σκόνη ψευδαργύρου (780 mg, 12 mmol), 2-κυανοξικό μεθυλεστέρα (267 μl, 3 mmol), κροτυλ βρωμίδιο (390 μL, 4.5 mmol) στους 0 ^{o}C και έμεινε υπό ανάδευση για 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκε υδατικό διάλυμα HCl 3M (5 mL) και το μίγμα διηθήθηκε μέσω μιας μικρής κολώνα που

περιέχει silica gel. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε στο ρότορα και το καθαρό προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.ether/EtOAc, 30/1 v/v). Απόδοση 52 %

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): ratio of isomers 72:72a , 87:13, *δ* 5.87–5.95 (m, $1H_{72}$), 5.80-5.83 (m, $1H_{72a}$), 5.22-5.25 (m,$1H_{72}$), 5.16-5.20 (m, $1H_{72a}$), 3.74 (s, $3H_{72}$), 3.72(s, $3H_{72a}$), 3.50 (s, $2H_{72}$), 3.30 (d, *J* = 7.0 Hz, $2H_{72}$), 2.97 (d, *J* = 7.0 Hz, $2H_{72a}$).

^{13}C NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 200.5, 167.4, 129.5, 119.8, 52.4, 48.3, 47.7.



80

3-υδροξυεξ-5-ενοϊκός μεθυλεστέρας

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει αιθανόλη (5 mL) προστέθηκε $NaBH_4$ (10 mg, 0.26 mmole) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 ^{o}C. Στη θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο 3-οξοεξ-πεντενοϊκός μεθυλεστέρας **72** (111 mg, 0.78 mmol) διαλυμένος σε αιθανόλη (3 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες στους 0 ^{o}C. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε NH_4Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό για την απομάκρυνση της αιθανόλης. Κατόπιν προστέθηκαν 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.ether/EtOAc, 20/1 v/v). . Απόδοση 90%

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): *δ* 5.78–5.86 (m, 1H), 5.13-5.16 (m, 1H), 5.11-5.12 (m, 1H), 4.06-4.12 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.53 (dd, J_1 = 16.6 Hz, *J* = 3.45 Hz, 1H), 2.44 (dd, J_1 = 16.6 Hz, *J* = 9 Hz, 1H), 2.23-2.33 (m, 2H).

^{13}CNMR (500MHz, $CDCl_3$): *δ* 173.2, 133.9, 118.2, 67.3, 51.8, 40.9, 40.4.

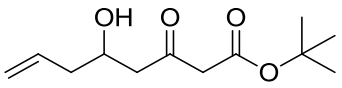
<u>Ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **72**</u>

72

(S)-3-υδροξυεξ-5-ενοϊκός μεθυλεστέρας

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 150 mM, pH = 6.9) προστέθηκε ο εστέρας **72** (25 mM), η κετορεδουκτάση (2 mg/mL), NADPH (2,5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Το διάλυμα ανακινείται στους 37 ^{o}C για 3 h. Στην συνέχεια η αντίδραση εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, συμπυκνώθηκε και το προϊόν ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR.

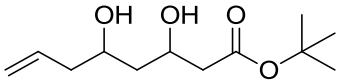
^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): δ 5.78–5.86 (m, 1H), 5.14-5.16 (m, 1H), 5.12-5.125 (m, 1H), 4.07-4.12 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.53 (dd, J_1 = 16.6 Hz, J = 3.45 Hz, 1H), 2.44 (dd, J_1 = 16.6 Hz, J = 9 Hz, 1H), 2.25-2.32 (m, 2H).



81

5-υδροξυ-3-οξοκτ-7-ενοϊκός τριτ- βουτυλεστέρας

Αντίδραση Claisen: Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ξηρή διισοπροπυλαμίνη (660 μL, 4.72 mmol) διαλύθηκε σε ξηρό THF (10 mL). Το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C και προστέθηκε στάγδην BuLi 1.6 M σε εξάνιο (3.0 mL, 4.72 mmol. Ακολούθησε ανάδευση για 15 λεπτά στους 0 °C και ψύξη στους -78 °C, οπότε προστέθηκε διάλυμα του οξικού τριτ- βουτυλεστέρα (507 μL, 3.78 mmol) σε ξηρό THF (2 mL) προστέθηκε και το μίγμα αναδεύτηκε για 20 min στους -78 °C. Τέλος, προστέθηκε ο 3-υδροξυεξ-5-ενοϊκός μεθυλεστέρας (340 mg, 2.36 mmol) σε 3 mL ξηρού THF, προστέθηκαν στάγδην. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ελέγχθηκε με TLC, κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (20 mL) προστέθηκε. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2 × 15 mL) και οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις εκπλύθηκαν με κορεσμένο χλωριούχο νάτριο (Brine) (20 mL), ξηράνθηκαν με άνυδρο $MgSO_4$ και συμπυκνώθηκε στο ρότορα. Ο καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με χρωματογραφία στήλης (Petr.ether/EtOAc, 30/1 v/v). Απόδοση 82%



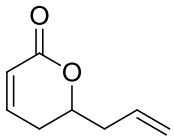
82

3,5-διυδρόξυ-οκτ-7-ενοϊκός τριτ- βουτυλεστέρας

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει μεθανόλη (5 mL) προστέθηκε $NaBH_4$ (45 mg, 0.87 mmole) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 ^oC. Στη θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο 5-υδροξυ-3-οξοκτ-7-ενοϊκός τριτ- βουτυλεστέρας **81** (595 mg, 2,6 mmol) διαλυμένος σε μεθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 8 ώρες στους 0 ^oC. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε NH_4Cl (8 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό για την απομάκρυνση της αιθανόλης. Κατόπιν προστέθηκαν 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.ether/EtOAc, 15/1 v/v). . Απόδοση 97%

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 5.78-5.86 (m, 1H), 5.07-5.14 (m, 2H), 4.20-4.42 (m, 1H), 3.90-4.15 (m, 1H), 2.36-2.63 (m, 2H), 2.20-2.36 (m, 2H), 1.52-1.70 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

^{13}CNMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 172.4, 172.08, 134.6, 134.5, 118, 117.8, 81.5, 71.1, 69, 67.5, 65.7, 43.2, 42.5, 42.09, 42, 41.5, 41.4, 28.



83

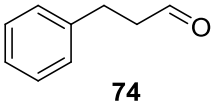
6-αλλυλ-5,6-διυδρο-2-πυρανόνη

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρή δίλαιμη φιάλη, ο 3,5-διυδροξυ-οκτ-7-ενοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **82** (100 mg, 0.46 mmole) διαλύθηκε σε τολουόλιο (8 mL). Έπειτα προστέθηκε p-TsOH (45 mg, 0.21 mmole), αυξήθηκε η θερμοκρασία και τοποθετήθηκε ψυκτήρας για συνθήκες reflux. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 5 h και

ακολούθησαν εκχυλίσεις της οργανικής με Na_2CO_3 (2x7 ml). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό (Petr.ether/EtOAc, 10/1 v/v). . Απόδοση 97%

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): *δ* 6.86-6.90 (m, 1H), 6.02 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.79-5.88 (m, 1H), 5.15-5.19 (m, 2H), 4.46-4.51 (m, 1H), 2.53-2.59 (m, 1H). 2.44-2.50 (m, 1H), 2.33-2.36 (m, 2H)

^{13}CNMR (500MHz, $CDCl_3$): *δ* 164.3, 145, 132.2, 121.3, 118.8, 77, 39, 28.6.



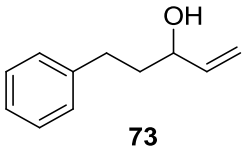
74

3-φαινυλοπροπανάλη

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη και σε ξηρό CH_2Cl_2 (12 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, διαλύθηκε η 3-φαινυλο-1-προπανόλη (700 mg, 5.14 mmole) και τριχλωρο ισοκυανουρικό οξύ (1,3 g, 5.65 mmole) στους 0 ^oC. Στην συνέχεια, προστέθηκε καταλυτική ποσότητα TEMPO. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 5 min και ακολουθεί φιλτράρισμα από λεπτή στρώση celite και έκπλυση της οργανικής φάσης με Na_2CO_3. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Απόδοση >99%

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): *δ* 9.85 (t, *J* = 1.35 Hz, 1H), 7.31-7.34 (m, 3H), 7.22-7.25 (m, 2H), 2.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.82 (m, 2H).

^{13}CNMR (500MHz, $CDCl_3$): *δ* 201.5, 140.3, 128.6, 128.3, 126.3, 45.3, 28.1.



73

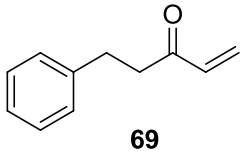
3-φαινυλπεντ-1-εν-3-όλη

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρή δίλαιμη φιάλη, διαλύθηκε η 3-φαινυλοπροπανάλη **74 (**100 mg, 0.74 mmoles) σε ξηρό THF (8 mL). Έπειτα προστέθηκε διάλυμα μαγνήσιο βίνυλο χλωρίδιο 1 M (1.5 mL, 1.4 mmole) και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h. Για την απομόνωση του προϊόντος **73**, προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα NaCl και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με οξικό

αιθυλεστέρα (3x15 mL). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.ether/EtOAc, 20/1 v/v). . Απόδοση 86 %

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): *δ* 7.27-7.30 (m, 2H), 7.17-7.216 (m, 3H), 5.9 (ddd, J_1 = 17.2 Hz, J_2 = 10.4 Hz, J_3 = 6.2 Hz, 1H), 5.23-5.27 (m, 1H), 5.12-5.15 (m, 1H), 4.11-4.14 (m, 1H), 2.66-2.78 (m, 2H), 1.80-1.91 (m, 2H)

^{13}CNMR (300MHz, $CDCl_3$): *δ* 141.8, 140.9, 128.46, 128.40, 125.8, 115, 72.5, 38.5, 31.6.



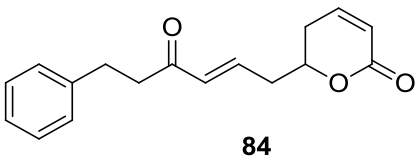
69

3-φαινυλοπεντ-1-εν-3-όνη

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη και σε ξηρό DMSO (10 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, διαλύθηκε ποσότητα IBX (1.4 g, 5.14 mmole). Στην συνέχεια, προστέθηκε στάγδην η 3-φαινυλοπεντ-1-εν-3-όλη **73** (0.5 mL, 3.67 mmole). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 6 ώρες και έπειτα προστέθηκε νερό όπου γίνεται εμφανής η κατακάθιση ιζήματος (IBA). Το διάλυμα φιλτράρεται από celite και εκπλύνεται με CH_2Cl_2. Ακολουθεί έκπλυση της οργανικής φάσης με Na_2CO_3 και Brine. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό (Petr.ether/EtOAc, 25/1 v/v). . Απόδοση 88%

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si; δ ppm): *δ* 7.28-7.30 (m, 2H), 7.19-7.21 (m, 3H), 6.36 (dd, J_1 = 17.8 Hz, J_2 = 10.6 Hz, 1H),), 6.22 (dd, J_1 = 17.8 Hz, J_2 = 0.8 Hz, 1H), 5.83 (dd, J_1 = 10.6 Hz, J_2 = 0.8 Hz, 1H), 2.90-2.98 (m, 4H).

^{13}CNMR (500MHz, $CDCl_3$): *δ* 199.8, 141, 136.5, 128.48, 128.33, 128.27, 126.4, 41.2, 29.8.



84

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκαν οι ενώσεις 5-φαινυλοπεντ-1-εν-3-όνης **69** (174.4 mg, 1.09mmol,) και 6-αλλυλο-5, 6-διυδρο-

πυραν-2-όνης **83** (50 mg, 0.36mmol) σε ξηρό CH_2Cl_2 (10 mL). Ακολούθησε απαέρωση του μίγματος και κατά τη διαρκεια αυτή προστέθηκε ο καταλύτης Grubb's $2^{ης}$ γενιάς (15 mg, 0.018 mmol). Μετά το τέλος της απαέρωσης το μίγμα θερμάνθηκε στους 40 ^oC και αναδεύτηκε για 12 ώρες. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.ether/EtOAc, 4/1 v/v). . Απόδοση 76%

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.26-7.29 (m, 2H), 7.17-7.20 (m, 3H), 6.86-6.90 (m, 1H), 6.77-6.83 (m, 1H), 6.19 (d, J = 15.9 Hz), 6.04 (dt, J_1 = 9.8 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 1H), 4.52-4.57 (m, 1H), 2.88-2.96 (m, 4H), 2.58-2.70 (m, 2H), 2.32-2.34 (m, 2H).

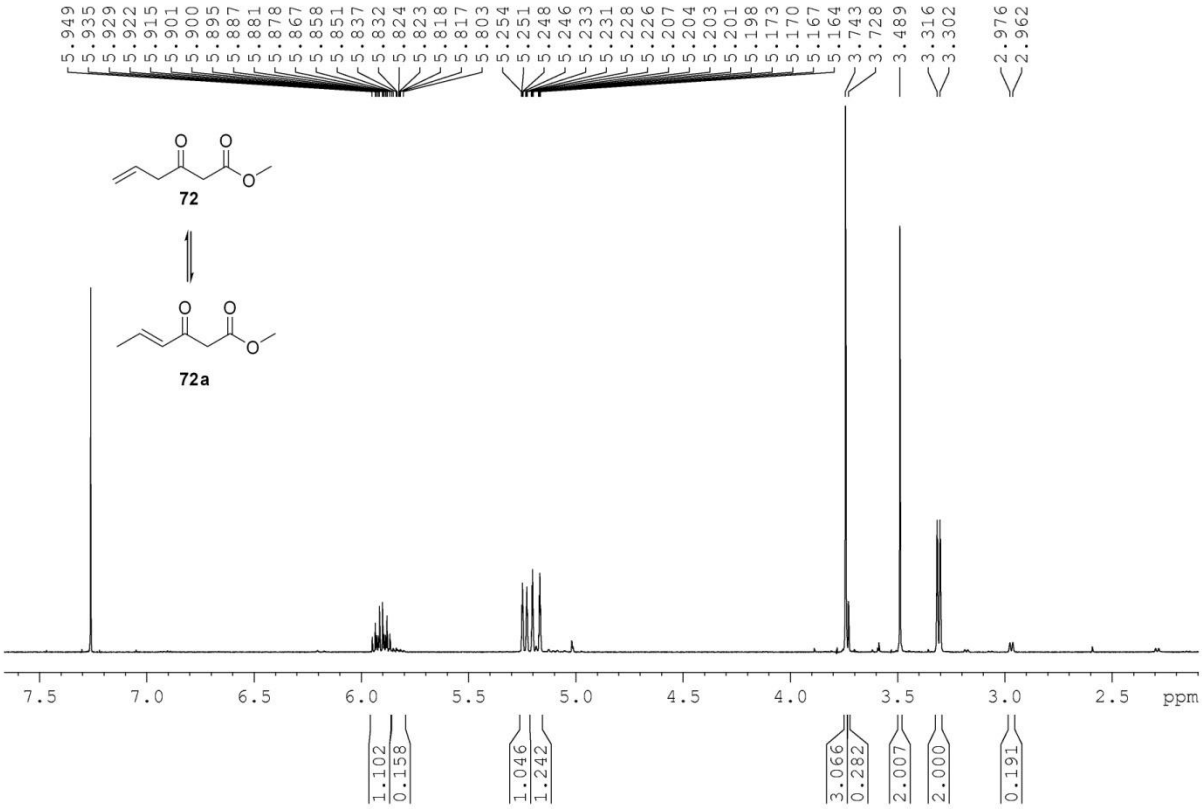
^{13}CNMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 199, 163.7, 144.6, 141, 140, 133.5, 128.5, 128.4, 126.1, 121.5, 76, 41.7, 37.5, 29.9, 28.9.

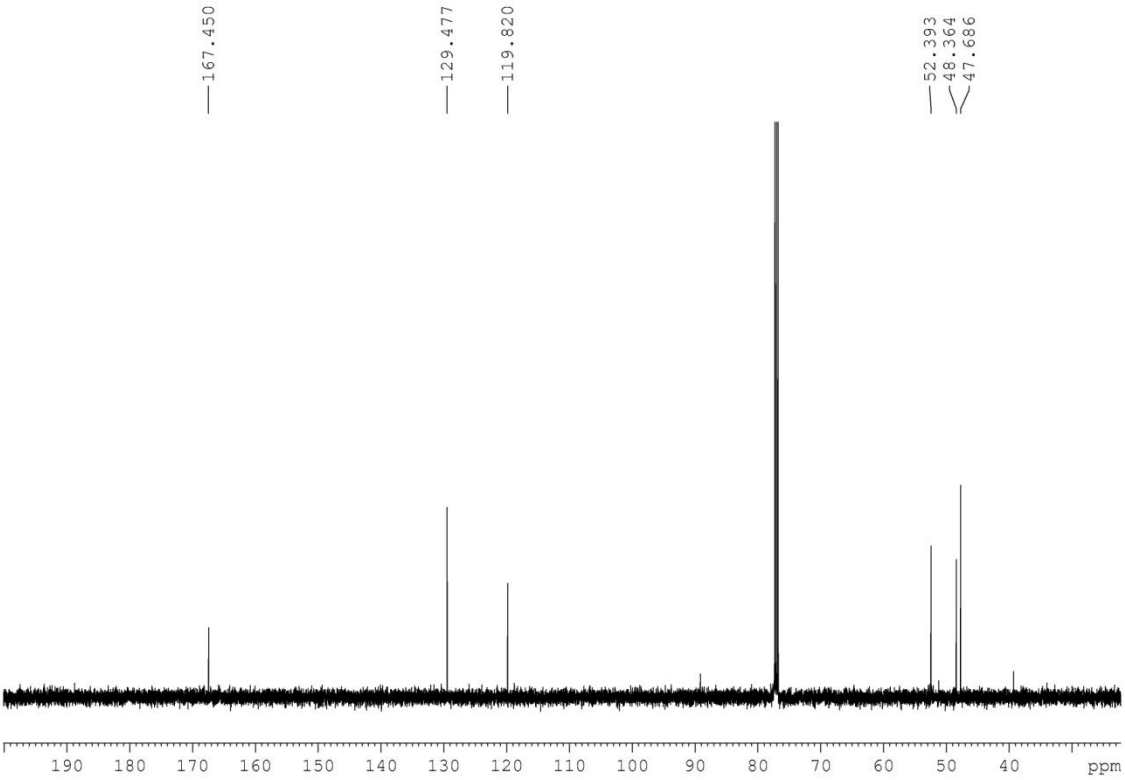
<u>Γενική μέθοδος σύνθεσης των (*R*)- MPA και (*S*)- MPA εστέρων</u>

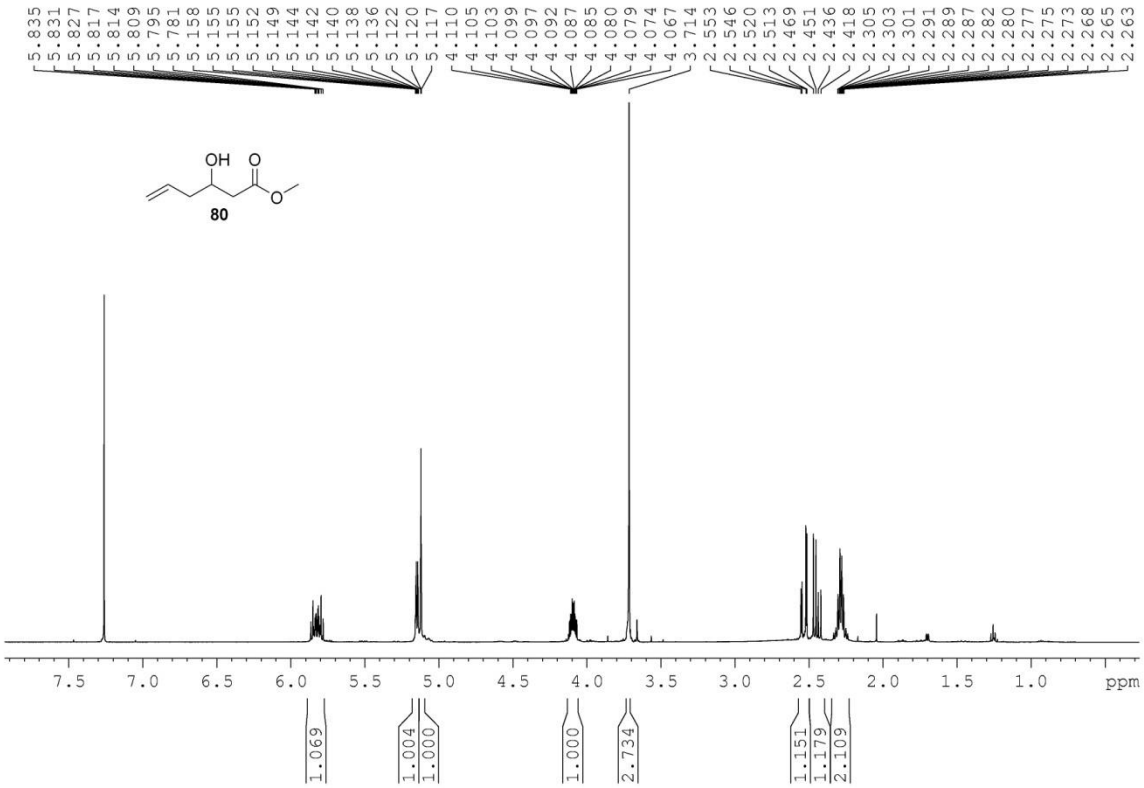
Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1mmole), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmole, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmole, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης.

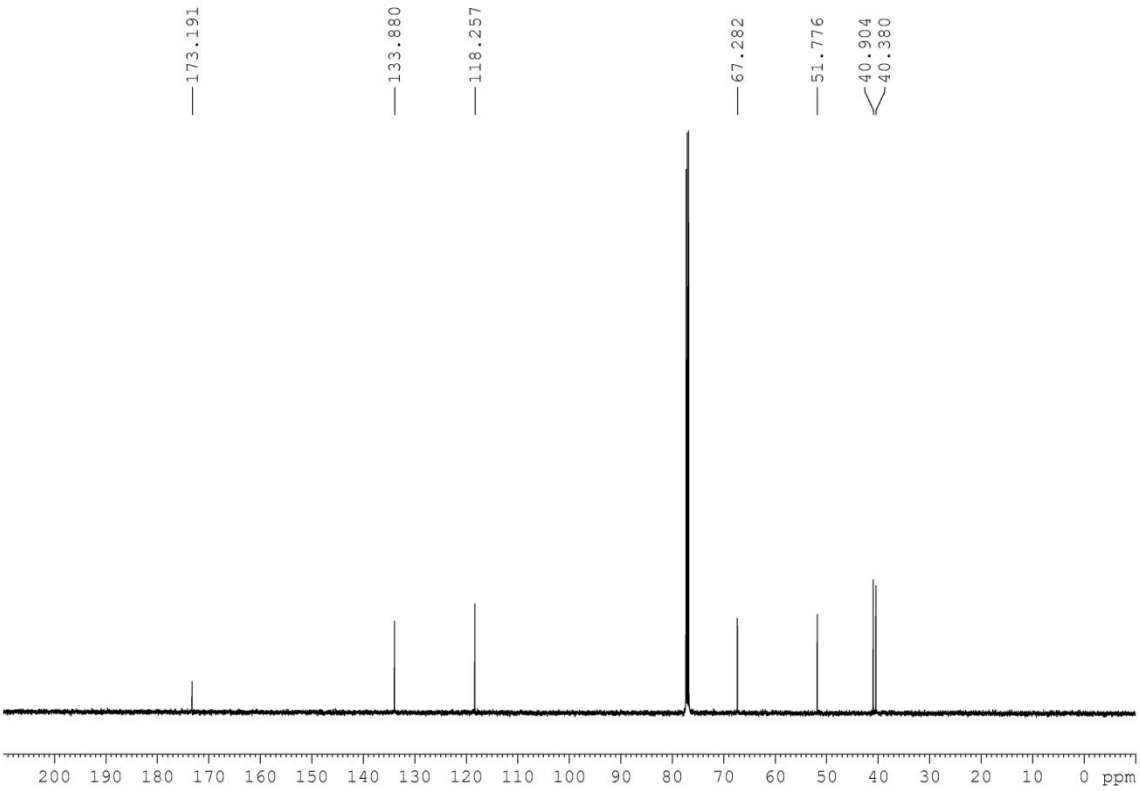
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

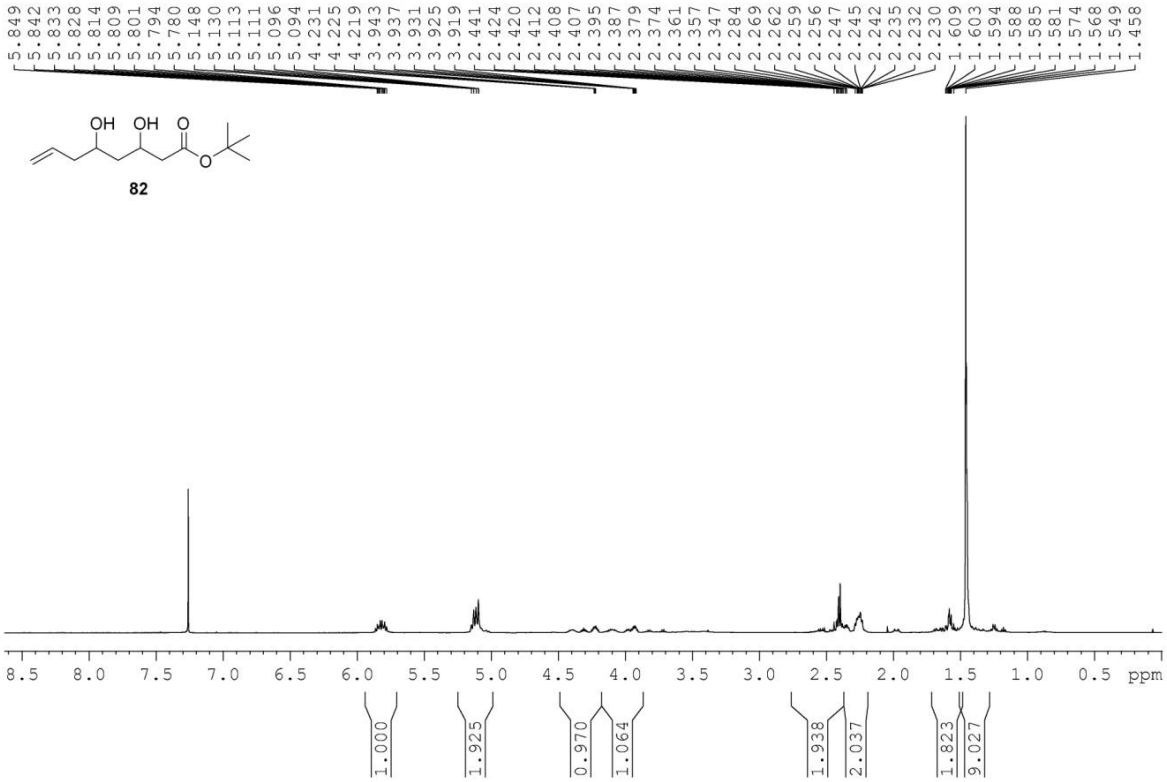
ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}HNMR ΚΑΙ ^{13}CNMR

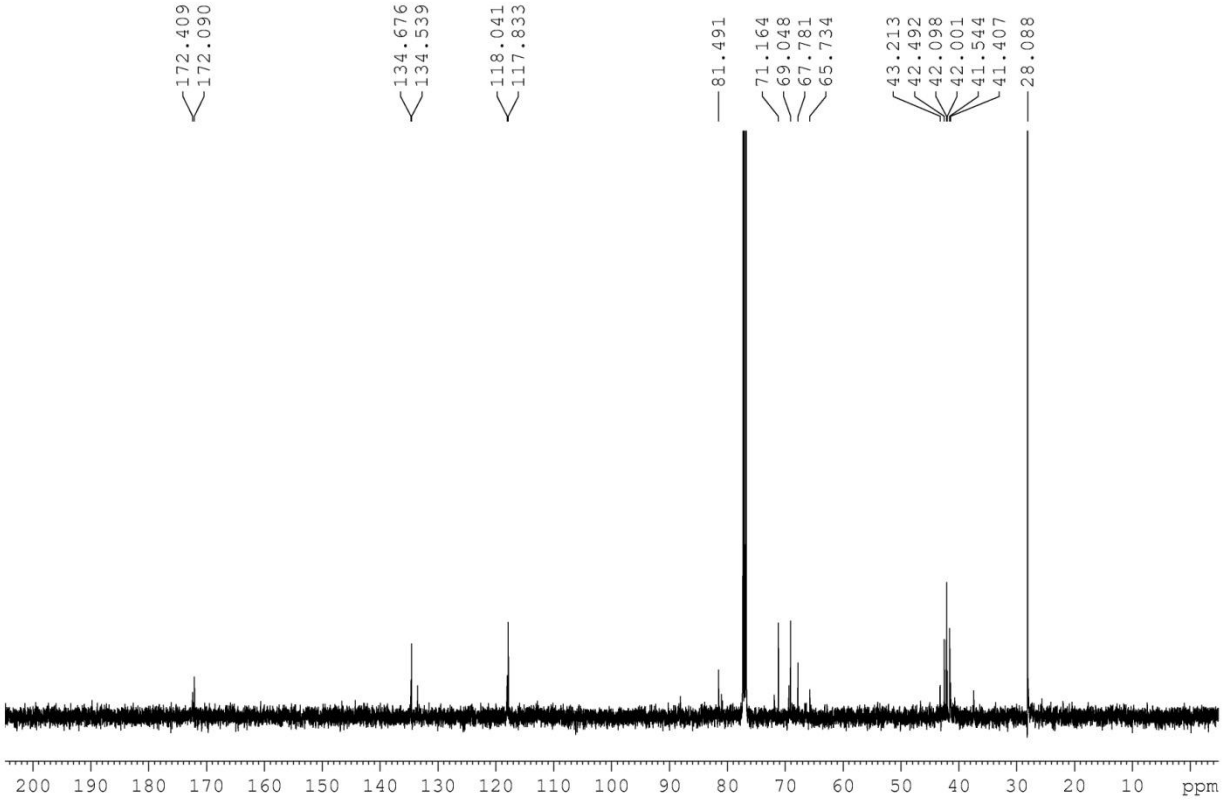

5.949
5.935
5.929
5.922
5.915
5.901
5.900
5.895
5.887
5.881
5.878
5.867
5.858
5.851
5.837
5.832
5.824
5.823
5.818
5.817
5.803
5.254
5.251
5.248
5.246
5.233
5.231
5.228
5.226
5.207
5.204
5.203
5.201
5.198
5.173
5.170
5.167
5.164
3.743
3.728
3.489
3.316
3.302
2.976
2.962
72
72a
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm
1.102
0.158
1.046
1.242
3.066
0.282
2.007
2.000
0.191

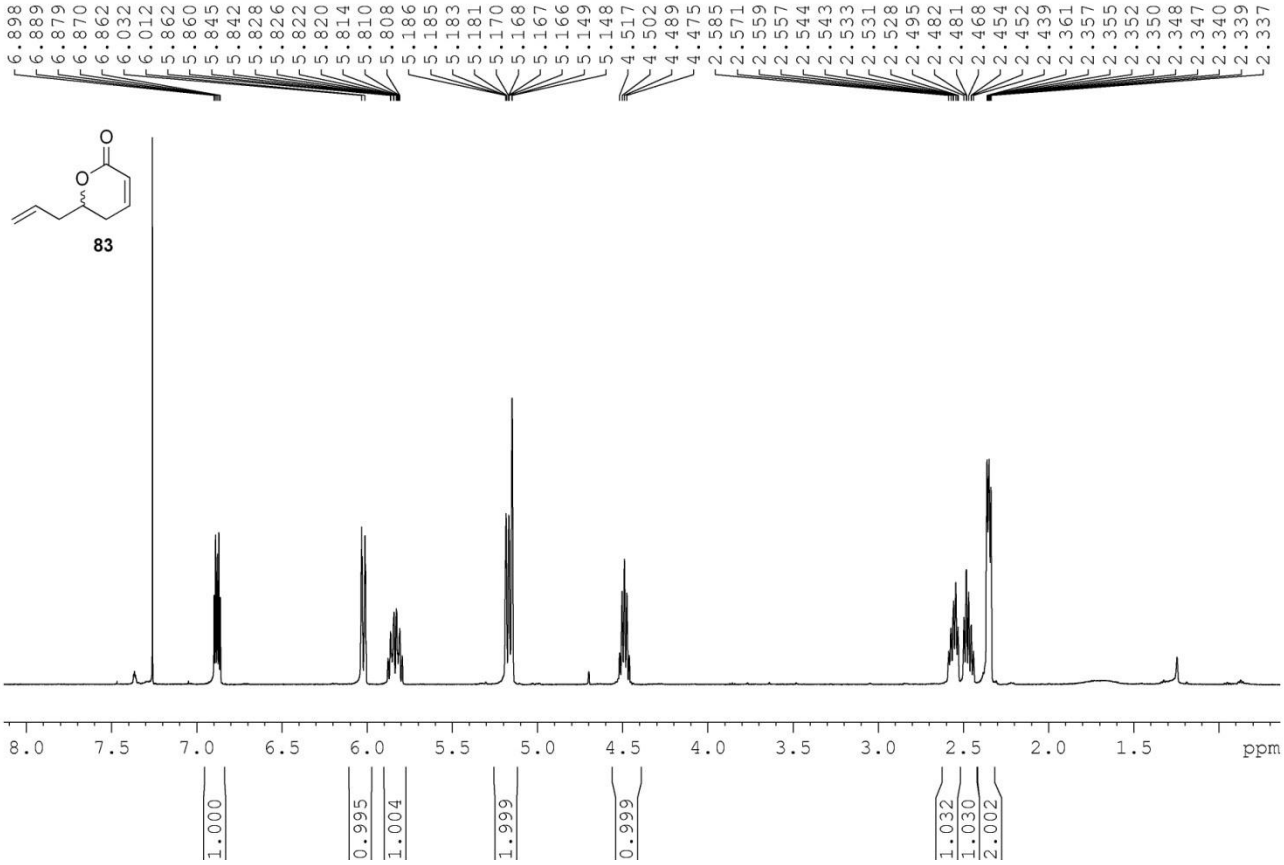

167.450
129.477
119.820
52.393
48.364
47.686
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm

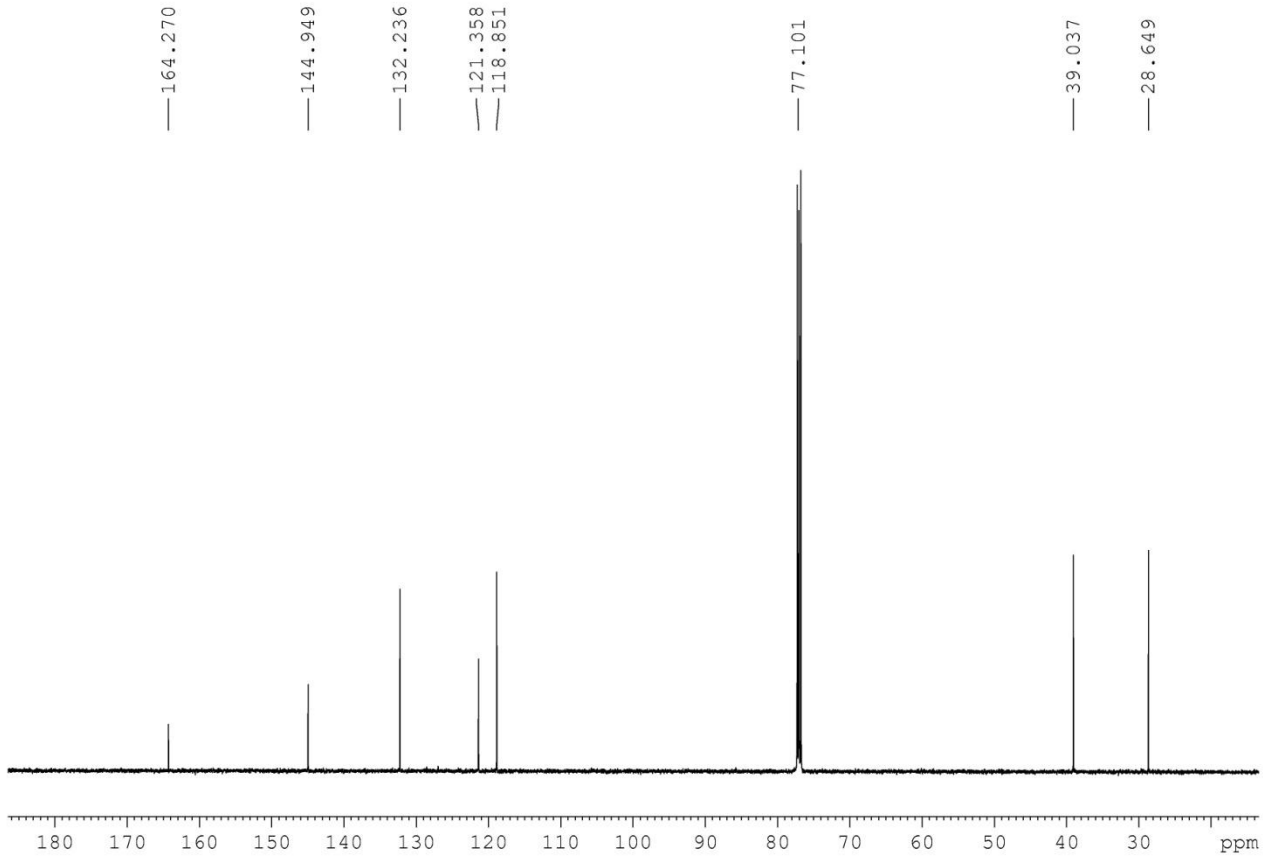

5.835
5.831
5.827
5.817
5.814
5.809
5.795
5.781
5.158
5.155
5.155
5.152
5.149
5.144
5.142
5.140
5.138
5.136
5.122
5.120
5.117
4.110
4.105
4.103
4.099
4.097
4.092
4.087
4.085
4.080
4.079
4.074
4.067
3.714
2.553
2.546
2.520
2.513
2.469
2.451
2.436
2.418
2.305
2.303
2.301
2.291
2.289
2.287
2.282
2.280
2.277
2.275
2.273
2.268
2.265
2.263
OH
O
O
80
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
1.069
1.004
1.000
1.000
2.734
1.151
1.179
2.109

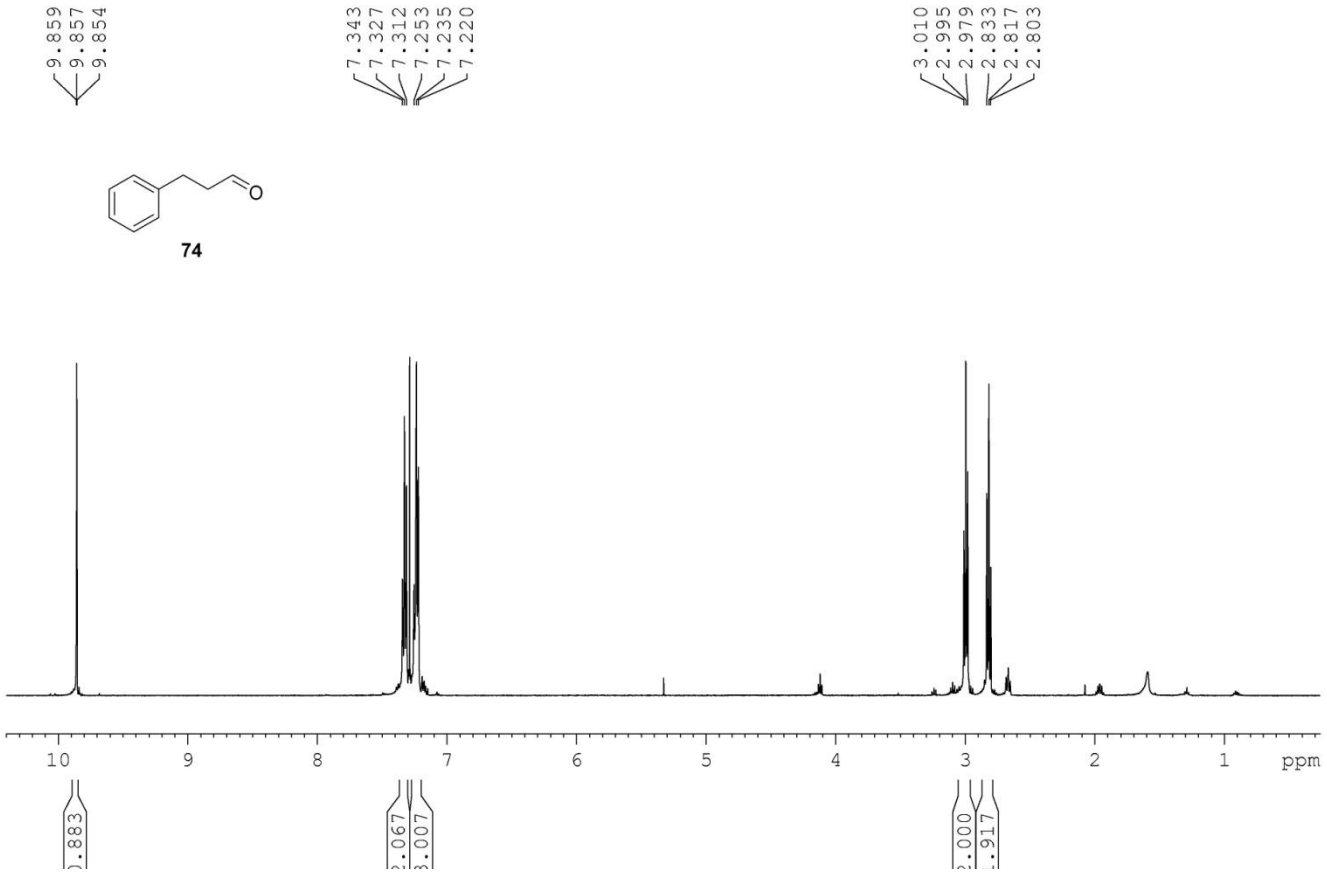

173.191
133.880
118.257
67.282
51.776
40.904
40.380
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

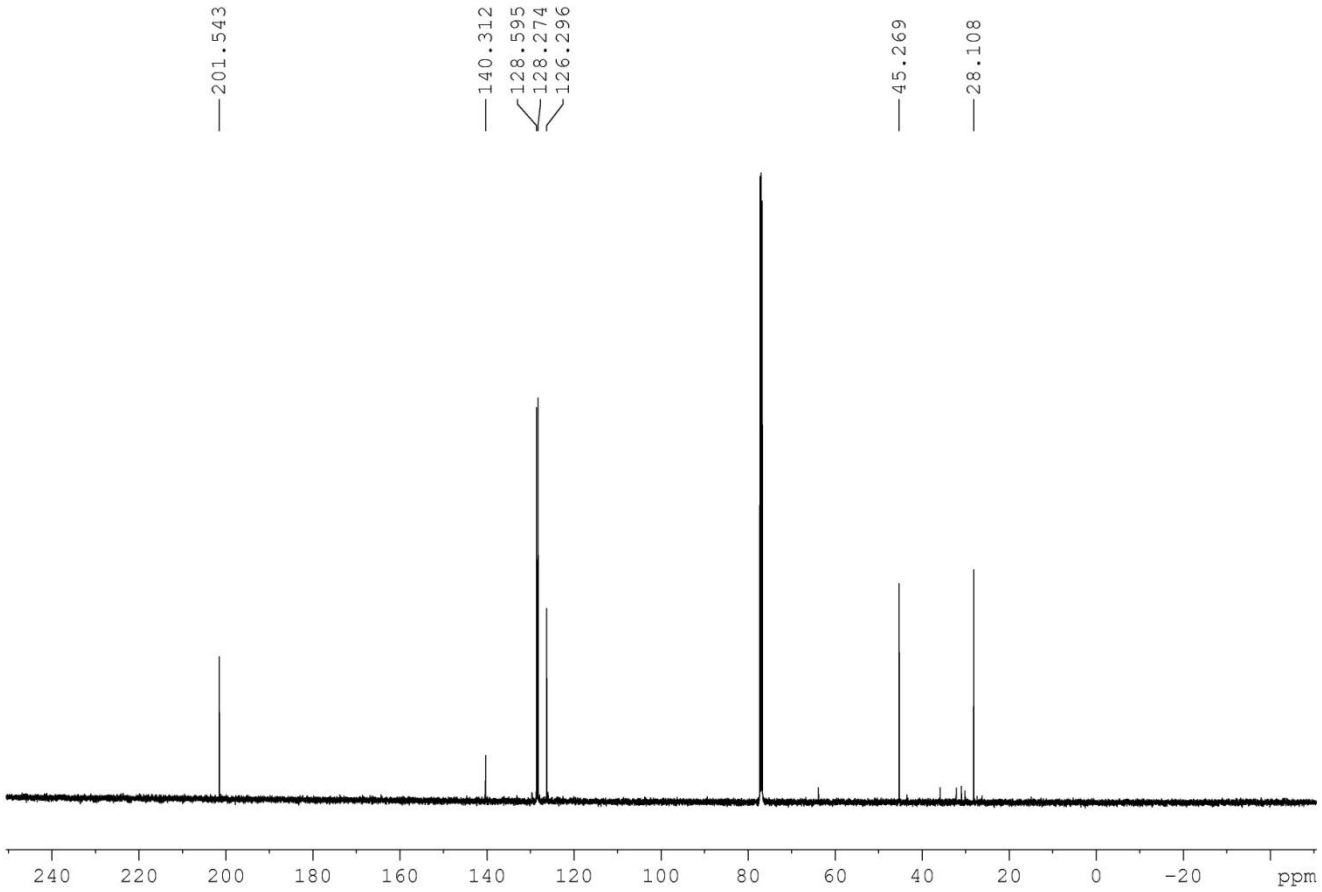

5.849 5.842 5.833 5.828 5.814 5.809 5.801 5.794 5.780 5.148 5.130 5.113 5.111 5.096 5.094 4.231 4.225 4.219 3.943 3.937 3.931 3.925 3.919 2.441 2.424 2.420 2.412 2.408 2.407 2.395 2.387 2.379 2.374 2.361 2.357 2.347 2.284 2.269 2.262 2.259 2.256 2.247 2.245 2.242 2.235 2.232 2.230 1.609 1.603 1.594 1.588 1.585 1.581 1.574 1.568 1.549 1.458
OH OH O
O
82
8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
1.000
1.925
0.970
1.064
1.938
2.037
1.823
9.027

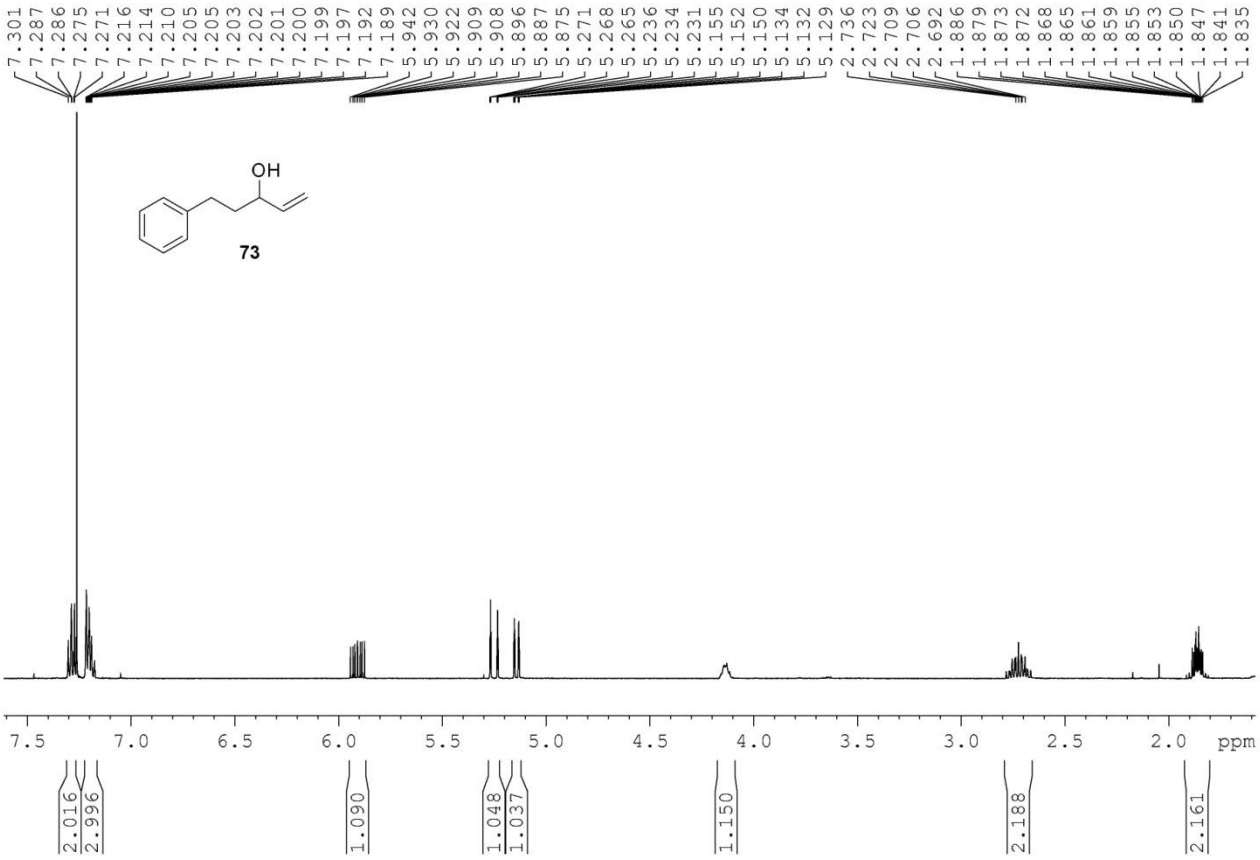

172.409
172.090
134.676
134.539
118.041
117.833
81.491
71.164
69.048
67.781
65.734
43.213
42.492
42.098
42.001
41.544
41.407
28.088
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

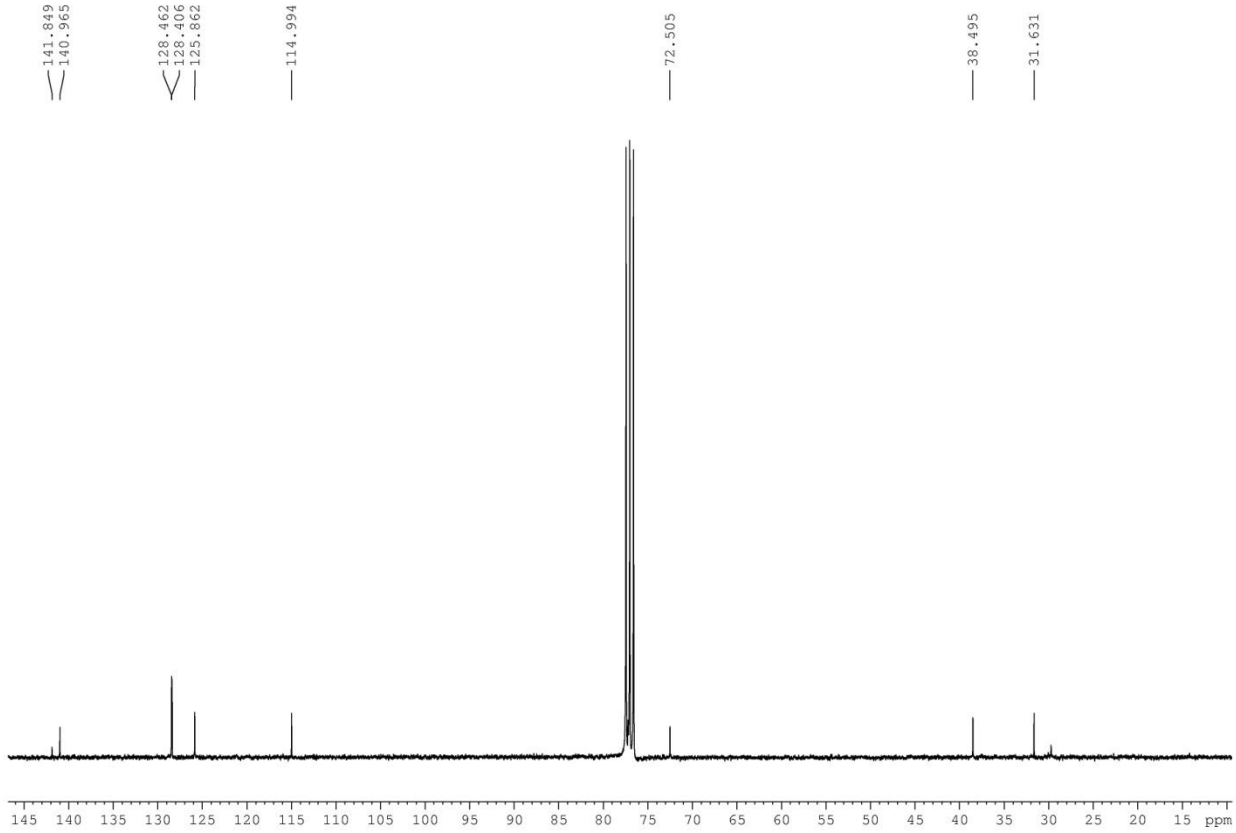

6.898
6.889
6.879
6.870
6.862
6.032
6.012
5.862
5.860
5.845
5.842
5.828
5.826
5.822
5.820
5.814
5.810
5.808
5.186
5.185
5.183
5.181
5.170
5.168
5.167
5.166
5.149
5.148
4.517
4.502
4.489
4.475
2.585
2.571
2.559
2.557
2.544
2.543
2.533
2.531
2.528
2.495
2.482
2.481
2.468
2.454
2.452
2.439
2.361
2.357
2.355
2.352
2.350
2.348
2.347
2.340
2.339
2.337
83
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm
1.000
0.995
1.004
1.999
0.999
1.032
1.030
2.002

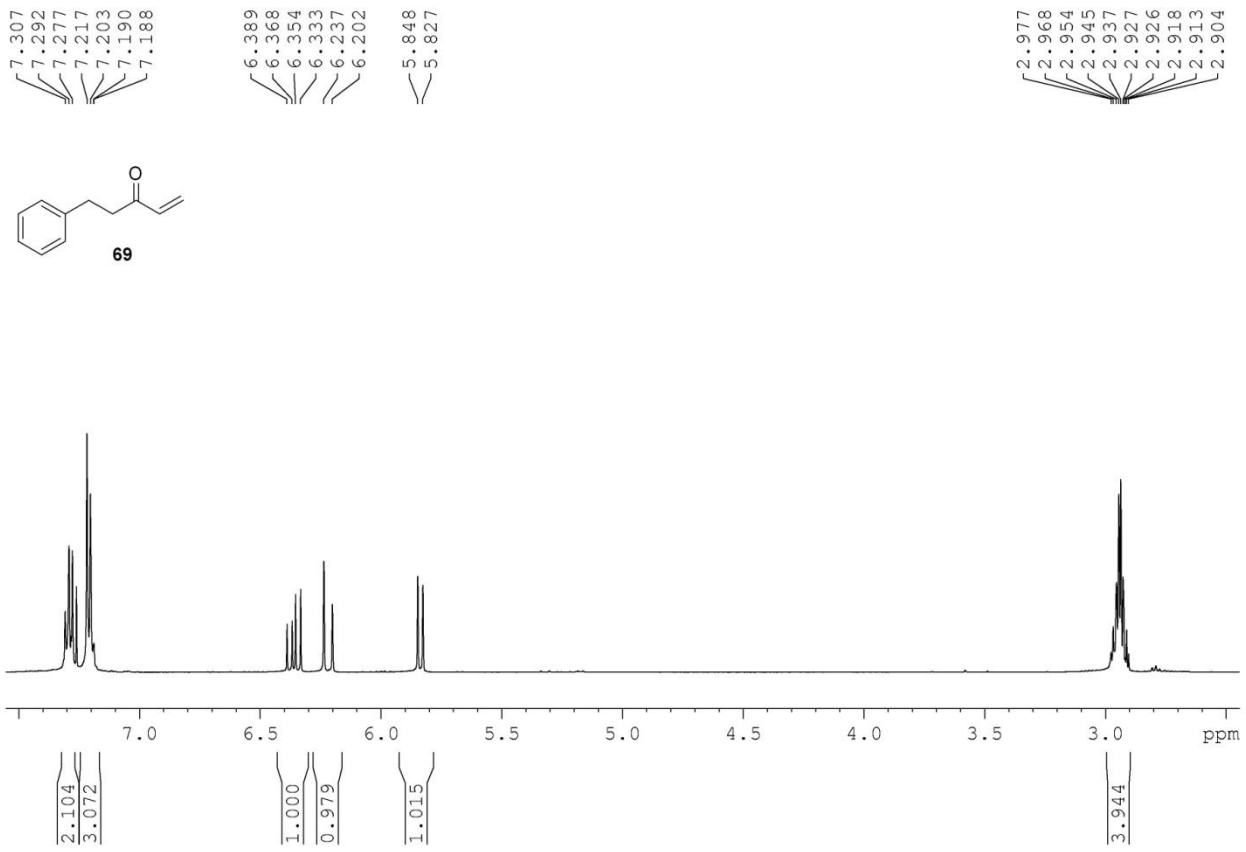

164.270
144.949
132.236
121.358
118.851
77.101
39.037
28.649
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
ppm

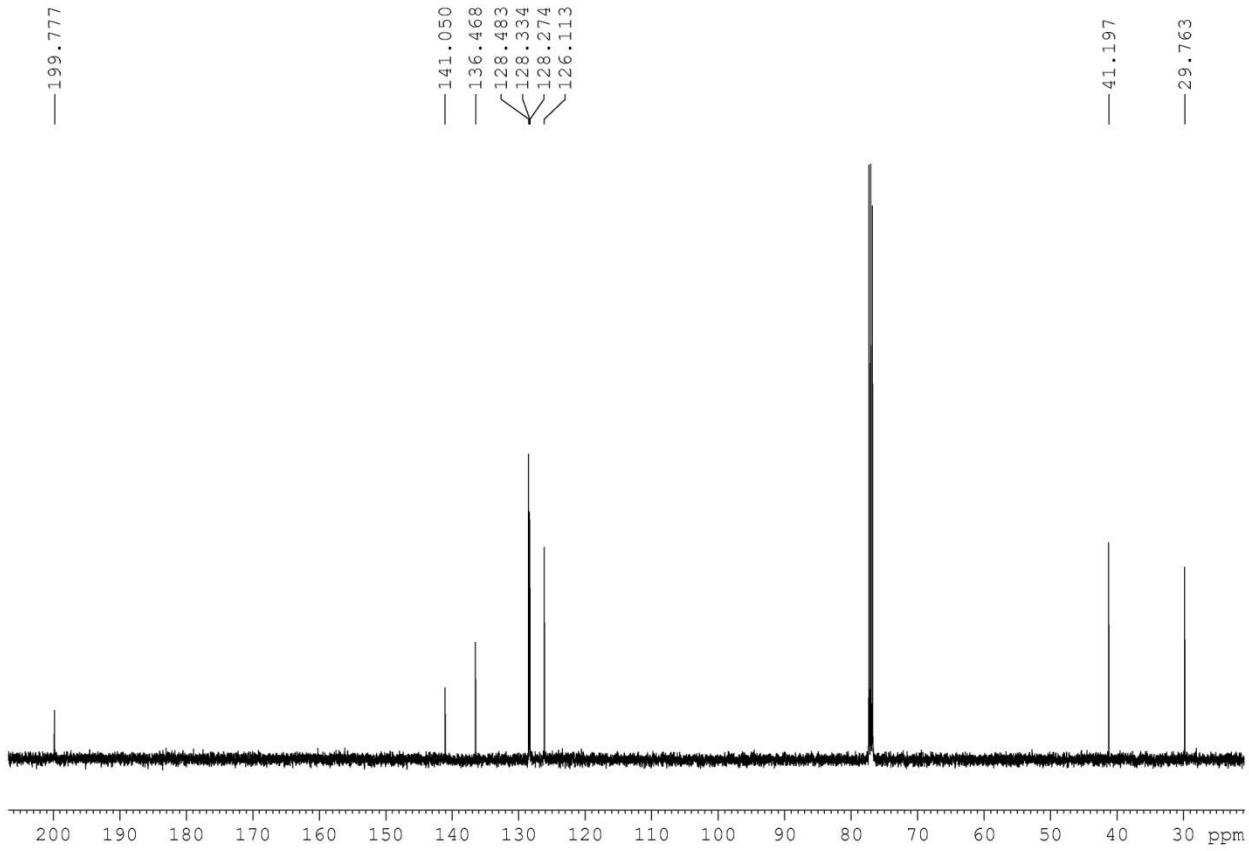

9.859
9.857
9.854
7.343
7.327
7.312
7.253
7.235
7.220
3.010
2.995
2.979
2.833
2.817
2.803
O
74
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

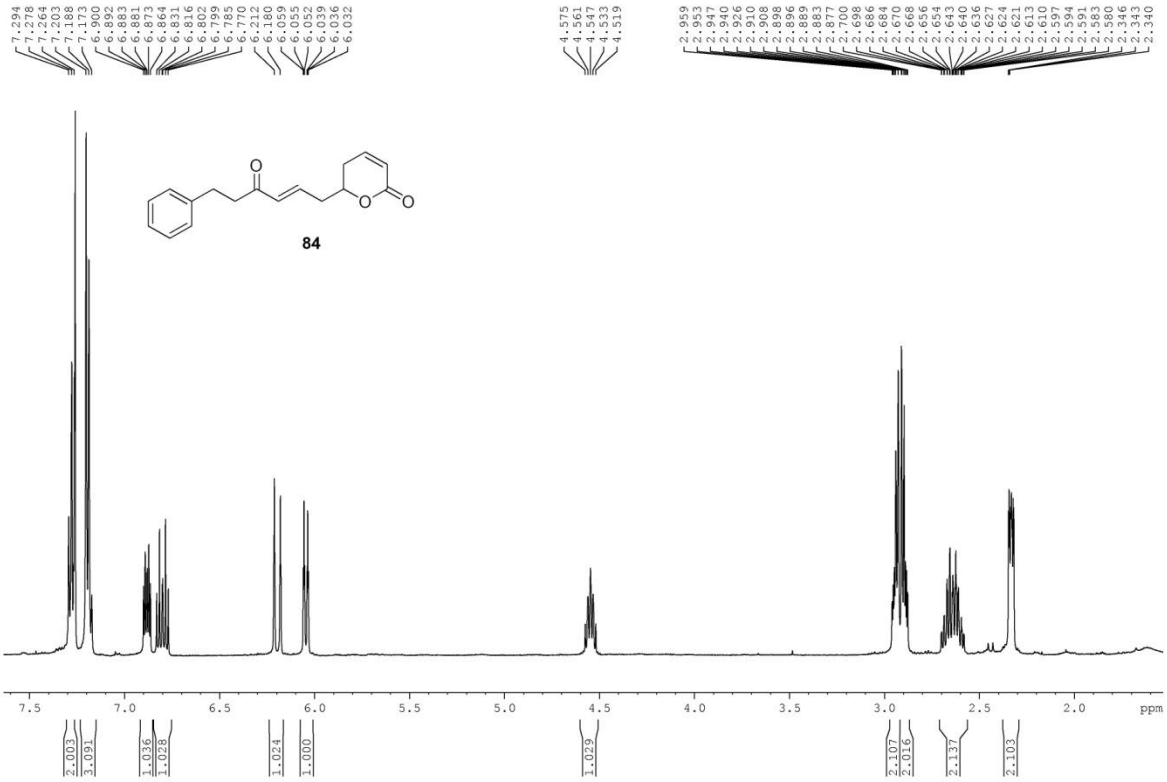

201.543
140.312
128.595
128.274
126.296
45.269
28.108
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
ppm

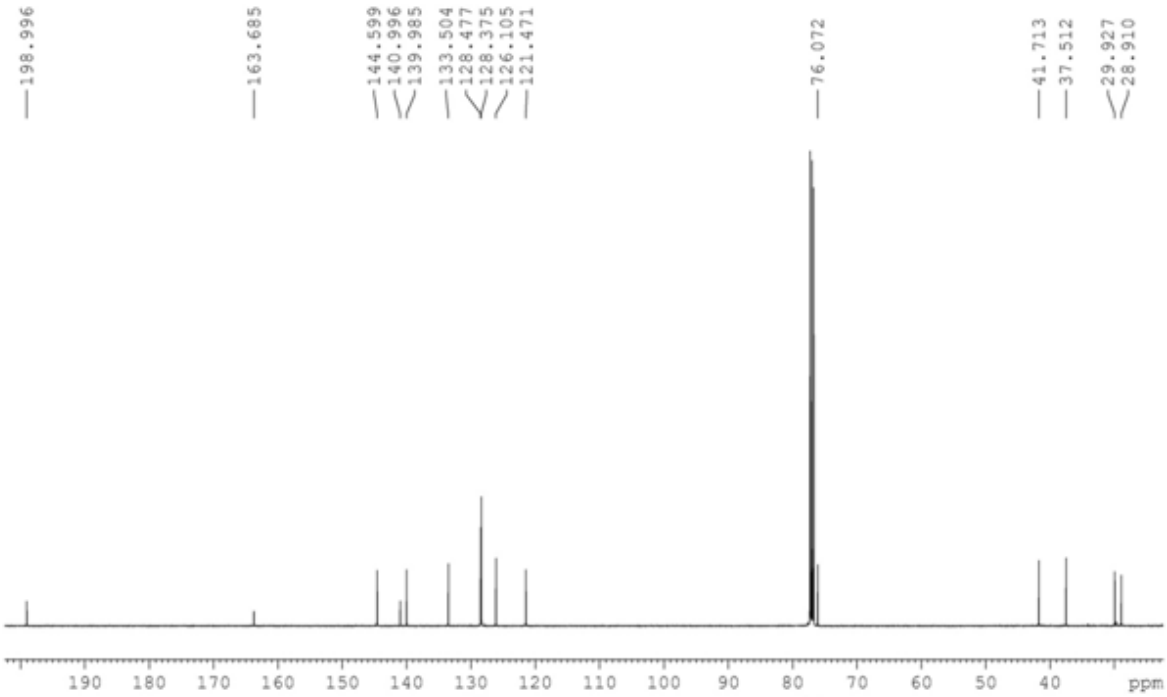

7.301
7.287
7.286
7.275
7.271
7.216
7.214
7.210
7.205
7.205
7.203
7.202
7.201
7.200
7.199
7.197
7.192
7.189
5.942
5.930
5.922
5.909
5.908
5.896
5.887
5.875
5.271
5.268
5.265
5.236
5.234
5.231
5.155
5.152
5.150
5.134
5.132
5.129
2.736
2.723
2.709
2.706
2.692
1.886
1.879
1.873
1.872
1.868
1.865
1.861
1.859
1.855
1.853
1.850
1.847
1.841
1.835
OH
73
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
ppm
2.016
2.996
1.090
1.048
1.037
1.150
2.188
2.161

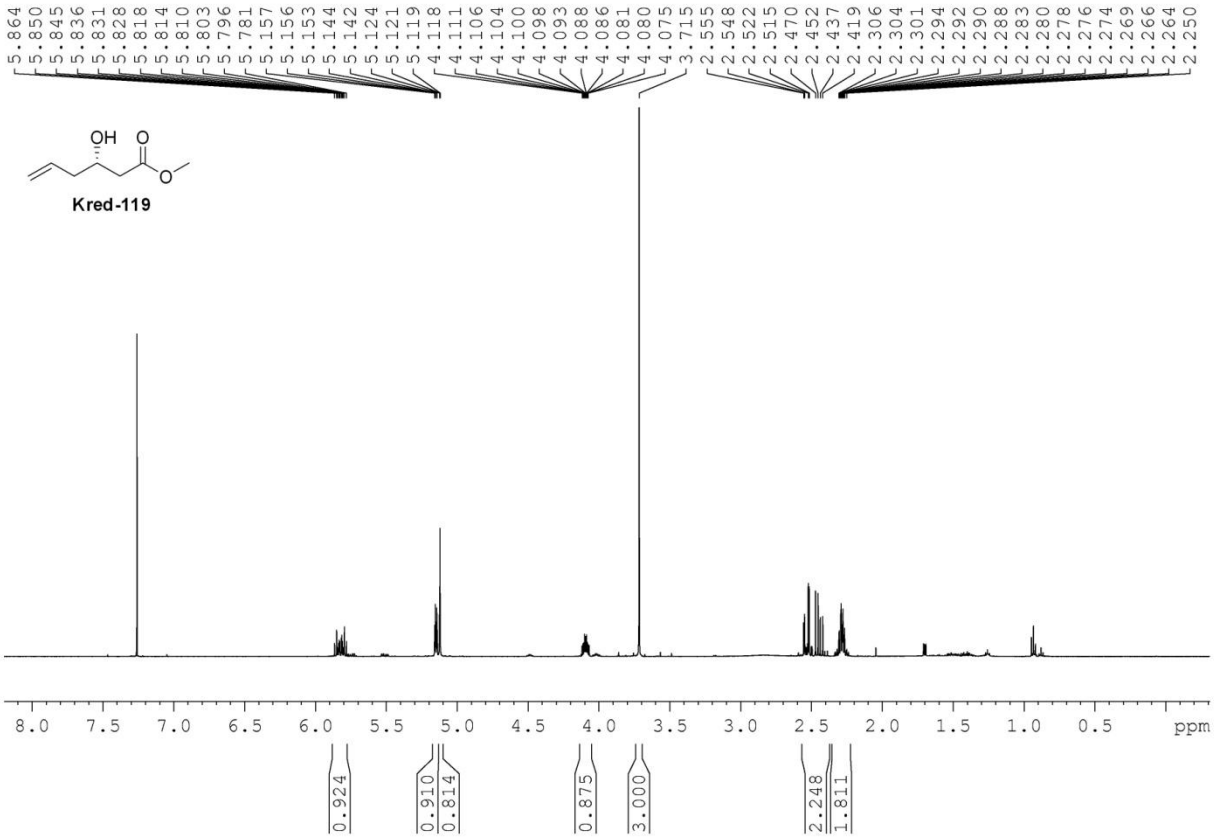

141.849
140.965
128.462
128.406
125.862
114.994
72.505
38.495
31.631
145
140
135
130
125
120
115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
ppm

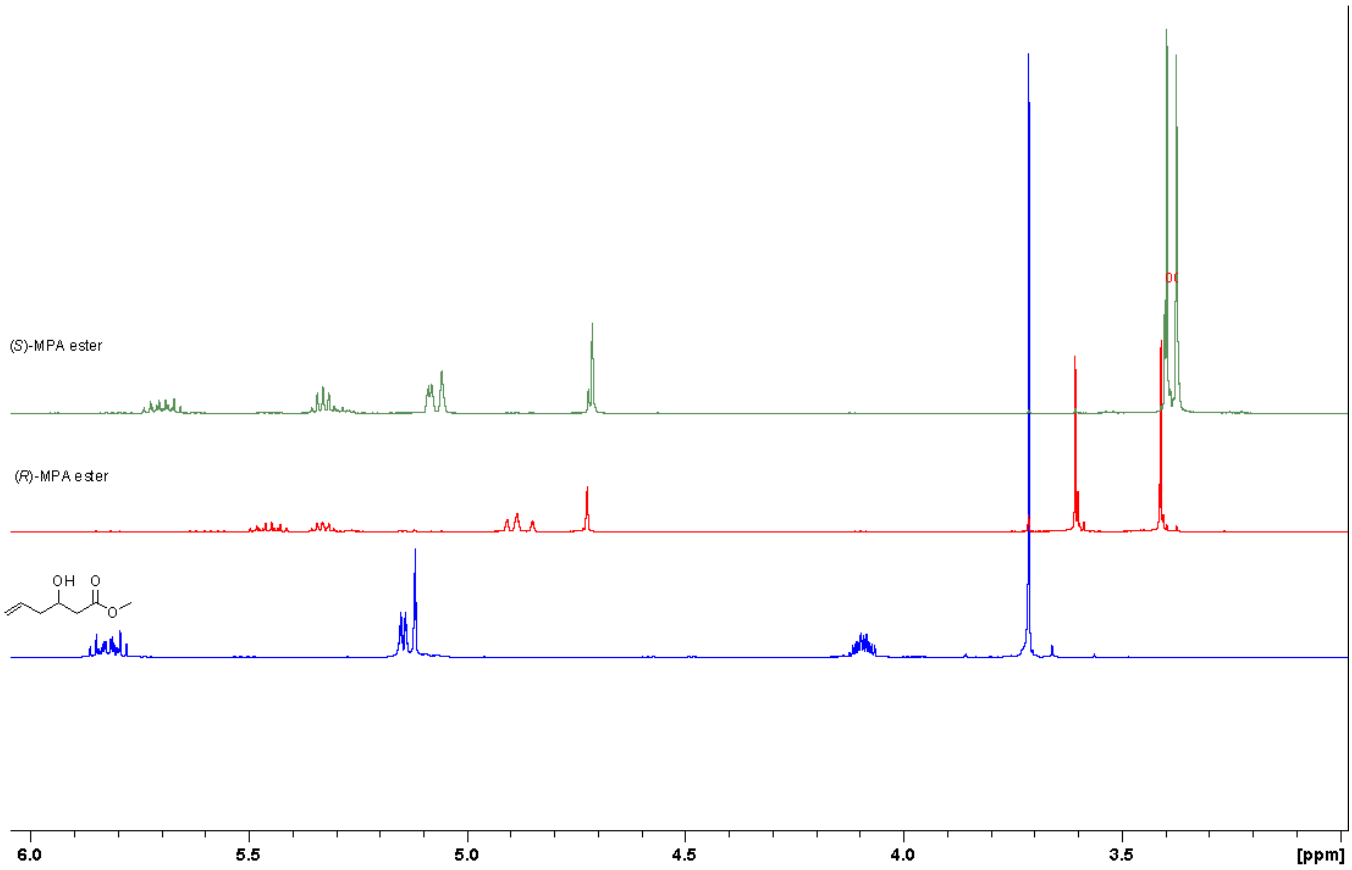

7.307
7.292
7.277
7.217
7.203
7.190
7.188
6.389
6.368
6.354
6.333
6.237
6.202
5.848
5.827
2.977
2.968
2.954
2.945
2.937
2.927
2.926
2.918
2.913
2.904
O
69
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
ppm
2.104
3.072
1.000
0.979
1.015
3.944


199.777
141.050
136.468
128.483
128.334
128.274
126.113
41.197
29.763
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
ppm


84
7.294
7.278
7.264
7.203
7.188
7.173
6.900
6.892
6.883
6.881
6.873
6.864
6.831
6.816
6.802
6.799
6.785
6.770
6.212
6.180
6.059
6.055
6.052
6.039
6.036
6.032
4.575
4.561
4.547
4.533
4.519
2.959
2.953
2.947
2.940
2.926
2.910
2.908
2.898
2.896
2.889
2.883
2.877
2.700
2.698
2.686
2.684
2.670
2.668
2.656
2.654
2.643
2.640
2.636
2.627
2.624
2.621
2.613
2.610
2.597
2.594
2.591
2.583
2.580
2.346
2.343
2.340
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
ppm
2.003
3.091
1.036
1.028
1.024
1.000
1.029
2.107
2.016
2.137
2.103


198.996
163.685
144.599
140.996
139.985
133.504
128.477
128.375
126.105
121.471
76.072
41.713
37.512
29.927
28.910
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm


5.864 5.850 5.845 5.836 5.831 5.828 5.818 5.814 5.810 5.803 5.796 5.781 5.157 5.156 5.153 5.144 5.142 5.124 5.121 5.119 4.118 4.111 4.106 4.104 4.100 4.098 4.093 4.088 4.086 4.081 4.080 4.075 3.715 2.555 2.548 2.522 2.515 2.470 2.452 2.437 2.419 2.306 2.304 2.301 2.294 2.292 2.290 2.288 2.283 2.280 2.278 2.276 2.274 2.269 2.266 2.264 2.250
OH O
O
Kred-119
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
0.924
0.910
0.814
0.875
3.000
2.248
1.811


(S)-MPA ester
(R)-MPA ester
OH O
O
6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 [ppm]

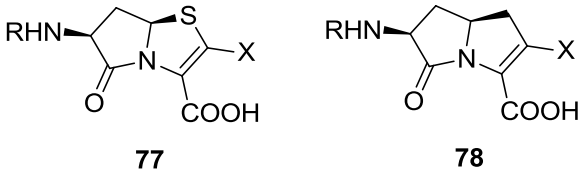
ΚΕΦΑΛΑΙΟ

3

3.1 Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγες για την σύνθεση χειρόμορφων γ-λακταμών

Οι γ-λακταμικοί δακτύλιοι, γνωστοί και ως γ-βουτυρολακτάμες, αποτελούν δομικές μονάδες για διάφορα φυσικά και μη προϊόντα, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που μπορεί να εμφανίζουν βιολογική δραστικότητα. Οι γ-λακτάμες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας, λόγω της ανθεκτικότητας που έχουν αρχίσει να εμφανίζουν τα βακτήρια έναντι των κλασσικών β-λακταμικών αντιβιοτικών. Γνωρίζοντας πως η δραστικότητα των λακταμών οφείλεται στον ενεργοποιημένο αμιδικό δεσμό, πολλές ερευνητικές ομάδες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στις γ-λακτάμες.

Το 1986 ο Baldwin και ερευνητές από την φαρμακευτική εταιρεία Eli Lilly, ανέφεραν, για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία, την σύνθεση δικυκλικών γ–λακταμών που παρουσίαζαν δράση παρόμοια με εκείνη των πενικιλινούχων αντιβιοτικών.[75-77] Σύμφωνα με τον πρώτο, η ένωση **77** εμφανίζει βιολογική δραστικότητα, λόγω του απεντοπισμού του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου της λακτάμης, στο ολεφινικό π σύστημα, μια παρατήρηση η οποία επιβεβαιώθηκε και από την δεύτερη ερευνητική ομάδα ύστερα από μελέτη της ένωσης **78** . (**Εικόνα 17**)

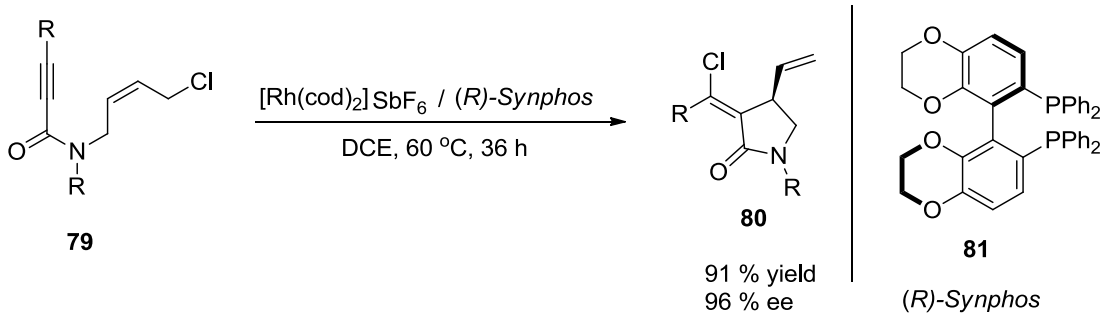


Εικόνα 17: Οι πρώτες γ-λακτάμες που έδειξαν να έχουν βιολογική δραστικότητα. (όπου X = CO_2Ph , CN)

Εξαιτίας της χαμηλής αλλά ωστόσο ανιχνεύσιμης βιολογικής δραστικότητάς τους, οι δύο αυτές ενώσεις δεν συντέθηκαν ποτέ σε βιομηχανική κλίμακα. Ενέπνευσαν όμως πολλούς χημικούς στη συνέχεια για τη σύνθεση γ-λακταμικών αντιβιοτικών, αντικαρκινικών και αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.[78]

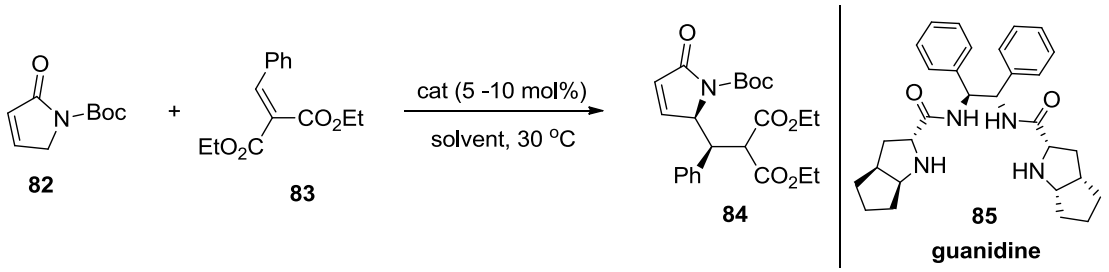
Οι πιο ευρέως διαδεδομένες μεθοδολογίες για την σύνθεση γ-λακταμών περιλαμβάνουν κυκλοποιήσεις,[79] όπου σχηματίζεται ο αμιδικός δεσμός, N-αλκυλιώσεις[80] και συζεύξεις C-C.[81] Τα τελευταία χρόνια, αντιδράσεις σχηματισμού δακτυλίου (3+2)[82] και (4+1),[83] έχουν συμβάλλει σε πιο αποδοτικούς τρόπους σύνθεσης του λακταμικού σκελετού. Σε αντίθεση με τους προηγούμενους τρόπους

σύνθεσης, οι μεθοδολογίες για οπτικά καθαρές γ-λακτάμες είναι λιγότερες και υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης νέων εναντιοεκλεκτικών συνθετικών οδών.[84] Η χρήση χειρόμορφων καταλυτών Rh αποτελεί ένα κλασσικό τρόπο ασύμμετρης σύνθεσης τέτοιων ενώσεων.[85] (**Σχήμα 33**)



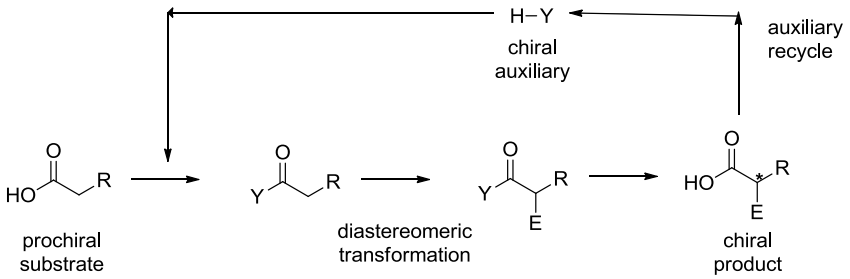
Σχήμα 33: Εκλεκτική κυκλοποίηση επαγώμενη από το κατιονικό σύμπλοκο Rh-Synphos.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση χειρόμορφων καταλυτών δεν περιορίζεται σε απλές στερεοεκλεκτικές αναγωγές και κυκλοποιήσεις αλλά και σε κατευθυνόμενες ασύμμετρες αντιδράσεις. Το 2012 ο Feng και η ερευνητική του ομάδα σύνθεσαν α,β-ακόρεστες γ-βουτυρολακτάμες με αντιδράση Michael χρησιμοποιώντας οπτικά ενεργές συμμετρικές γουανιδίνες ως καταλύτη.[86] (**Σχήμα 34**)



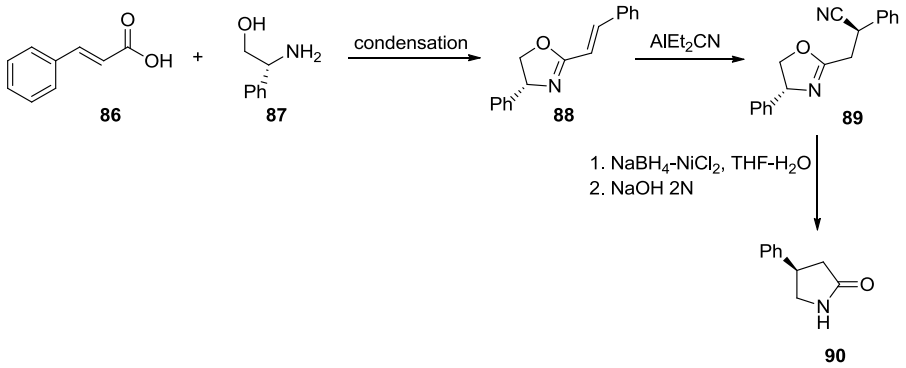
Σχήμα 34: Κατευθυνόμενη αντίδραση Michael προς σχηματισμό οπτικά ενεργών λακταμών.

Ακόμη έναν τρόπο σύνθεσης αποτελεί η χρήση χειρόμορφων βοηθητικών αντιδραστηρίων (chiral auxiliary reagents). Οι ενώσεις αυτές, αντιδρούν με την αρχική ουσία δίνοντας μια συγκεκριμένη στερεοχημεία. Σε κάποιο σταδιο της συνθετικής πορείας, τα χειρόμορφα αντιδραστήρια αποχωρούν, ανακυκλώνονται και παίρνουν μέρος στον επόμενο κύκλο αντίδρασης.[87] (**Σχήμα 35**)



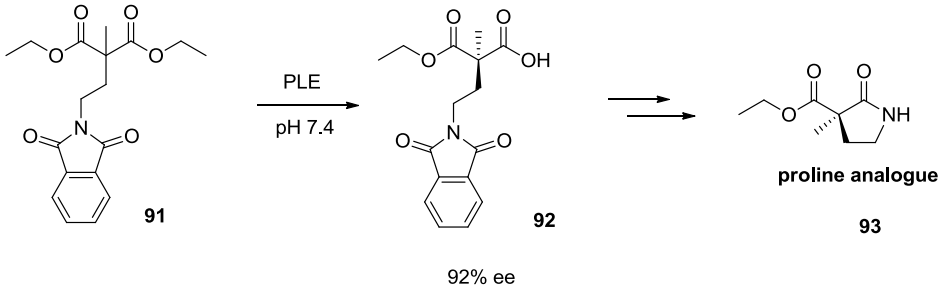
Σχήμα 35: Γενικό σχήμα για την εφαρμογή βοηθητικού αντιδραστηρίου στην ασύμμετρη σύνθεση.

Η (*R*)-φαινυλογλυκινόλη **87** αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο χειρόμορφο βοηθητικό αντιδραστήριο, το οποίο σε αντίδραση συμπύκνωσης με το κιναμικό οξύ **86**, δίνει την οξαζολίνη **88.** Μετά από δύο συνθετικά βήματα και την αποχώρηση του βοηθητικού αντιδραστηρίου από την ενωση **89**, παράγεται η οπτικά καθαρή λακτάμη **90.**[88] (**Σχήμα 36**)



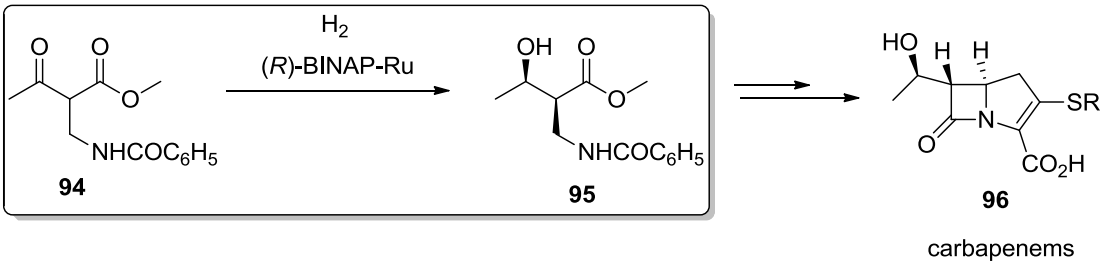
Σχήμα 36: Σύνθεση χειρόμορφων λακταμών με οπτικώς ενεργά βοηθητικά αντιδραστήρια.

Τέλος, δεδομένου ότι τα ένζυμα αποτελούν χειρόμορφους καταλύτες, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν πολλές λιπάσες[89] για την σύνθεση οπτικά ενεργών γ-λακταμών. (**Σχήμα 37**)



Σχήμα 37: Λιπάσες για την χειρόμορφη συνθεση ανάλογων προλίνης.[98]

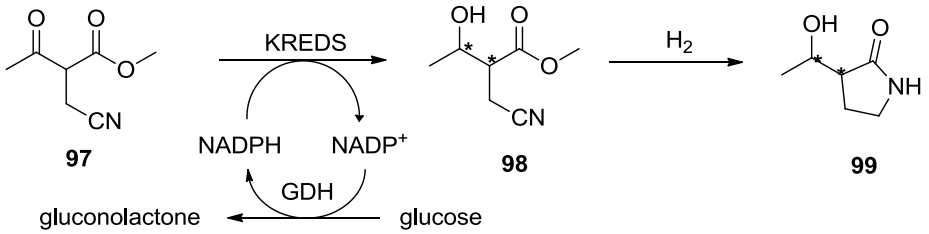
Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη της ενζυμικής αναγωγής α-νιτριλο β-κετο εστέρων με την χρήση διαφορετικών απομονωμένων κετοredουκτασών. Τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής, αποτελούν υψηλής προστιθέμενης αξίας ενδιάμεσα για την σύνθεση γ-λακταμών και έχουν συντεθεί χημικώς στο παρελθόν από φαρμακευτικές εταιρίες για την σύνθεση καρβοπενέμων.[91] (**Σχήμα 38**)



Σχήμα 38: Βιομηχανική εφαρμογή υδρογόνωσης α-υποκατεστημένων κετο εστέρων, καταλυόμενη από BINAP – Ru, για την ασύμμετρη σύνθεση καρβεπενεμικών αντιβιοτικών.

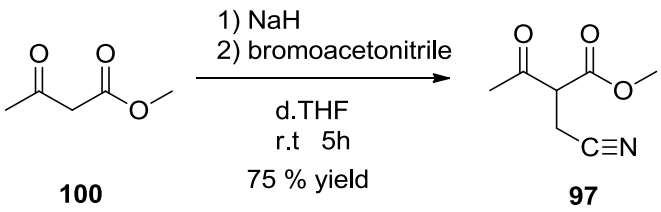
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αρχικός μας στόχος ήταν η μελέτη της εναντιο- και διαστερεοεκλεκτικότητας της ενζυμικά καταλυόμενης αναγωγής του νιτριλο κετο εστέρα **97**, ο οποίος αποτελεί ένα πιθανό υπόστρωμα, για αλκοολικές αφυδρογονάσες, και δεν έχει στο παρελθόν ποτέ μελετηθεί. Εάν τα αποτελέσματα της βιοαναγωγής ήταν ενθαρρυντικά, υποθέσαμε πως θα μπορούσαμε να προχωρήσουμε και στην κυκλοποίηση του χειρόμορφου υδρόξυ προϊόντος **98** προς σχηματισμό της χειρόμορφης υδρόξυ γ-λακτάμης **99.** (**Σχήμα 39**)



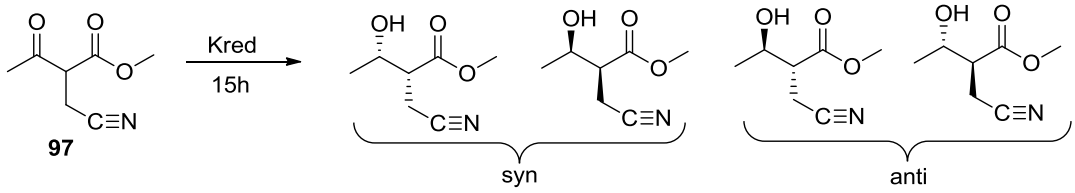
Σχήμα 39: Συνθετική πορεία για την σύνθεση οπτικά ενεργής γ-λακτάμης.

Το υπόστρωμα **97** , μπορεί να συντεθεί με μια απλή πυρηνόφιλη υποκατάσταση S_N2, μεταξύ του 3-οξοβουτανικού μεθυλεστέρα **100** και του βρωμοακετονιτριλίου**.**



Σχήμα 40: Σύνθεση του υποστρώματος **97**.

Η νέα ένωση **97**, όπως και όλα τα πιθανά υποστρώματα, τέθηκε σε έλεγχο σταθερότητας στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 37 ^{o}C για 15 h). Αφού επιβεβαιώθηκε η σταθερότητά της, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ενζυμικών αναγωγών με μια σειρά από εμπορικά διαθέσιμες απομονωμένες NADPH- εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα



Πίνακας 6: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **97** με κετοredουκτάσες. Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στην σειρά εμφάνισης των στερεοϊσομερών στην αέρια χρωματογραφία μεχειρόμορφη στήλη.

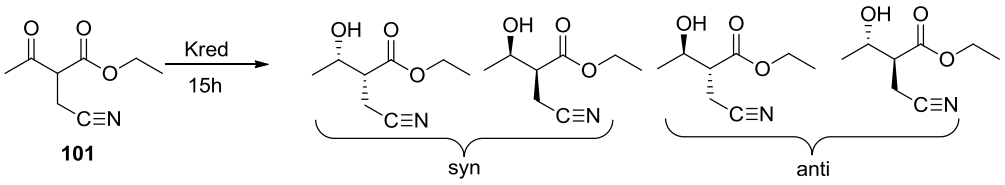
KRED	Απόδοση (%)	A[α] (%)	B[α] (%)	C[α] (%)	D[α] (%)	de (%)
102	>99	32.5	65.5	0.2	1.2	**96**
119	>99	0.5	1.5	33	65	**96**
123	>99	3	20	14	61	-
101	>99	20.5	67	3	9.5	75
112	>99	18	56	6	20	-
107	>99	10	40	8	52	-
108	>99	0.5	2.5	21	76	89
A1C	>99	36	64	-	-	**>99**
A1D	>99	23	76	-	-	**>99**
A1B/132	>99	18	82	-	-	**>99**
118	>99	0.5	1.5	40	58	94

[α]Ο υπολογισμός της διαστερεοεκλεκτικότητας έγινε μετά από εστεροποίηση των υδρόξυ προϊόντων με οξικό ανυδρίτη και σύγκριση με ρακεμικό μίγμα εστεροποιημένης υδρόξυ ένωσης. Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

Η σχετική στερεοδομή, καθώς και ο διαστερεομερικός λόγος των προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών προσδιορίστηκαν αρχικά με βάση τα φάσματα ^{1}H NMR σύμφωνα με τον εμπειρικό κανόνα για τις α-υποκατεστημένες β-υδρόξυ καρβόνυλο ενώσεις, στις οποίες το καρβυνολικό υδρογόνο των anti ισομερών εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο των syn.[92] Ο διαστερεομερικός λόγος υπολογίστηκε από ανάλυση του φάσματος αέριας χρωματογραφίας με χειρόμορφη κολώνα και διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ταύτιση στην τιμή του λόγου μεταξύ των δυο τεχνικών, με μικρή αναμενόμενη απόκλιση στα όρια του σφάλματος. Με βάση αυτά τα δεδομένα λοιπόν, τα A,B είναι τα syn διαστερεομερή, που είναι μεταξύ τους εναντιομερή και τα C,D είναι τα anti διαστερεομερή, τα οποία είναι επίσης μεταξύ τους εναντιομερή, χωρίς να είναι όμως γνωστή η απόλυτη στερεοδομή τους.

Σε όλες τις βιοκαταλυτικές μετατροπές υπήρξε εξαιρετική απόδοση (> 99 %) και σε πολλές περιπτώσεις πολύ υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα. Τα ένζυμα 102, A1C, A1B-132 και A1D κατέλυσαν την αναγωγή με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα με προτίμηση στα syn προϊόντα, σε αντίθεση με τις ενζυμικές αναγωγές με τις KRED 119 και 118 που έδωσαν, σχεδόν αποκλειστικά, ως προϊοντα τις αντίστοιχες anti ενώσεις. Ωστόσο σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ικανοποιητική εναντιοεκλεκτικότητα πράγμα που μας ώθησε να τροποποιήσουμε το υπόστρωμα (substrate modification).

Το νέο υπόστρωμα **101** συντέθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως το προηγούμενο, ξεκινώντας όμως από τον 3-οξοβουτανικό αιθυλεστέρα. Πολλές φορές στο παρελθόν, έχει παρατηρηθεί από την ερευνητική μας ομάδα πως η μεταβολή του μεγέθους της εστερικής ομάδας τους υποστρώματος είτε η προσθήκη ενός μεθυλίου εκατέρωθεν του προχειρόμορφου κέντρου, μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην δραστικότητα ενός ενζύμου αλλά και στην εκλεκτικότητα.

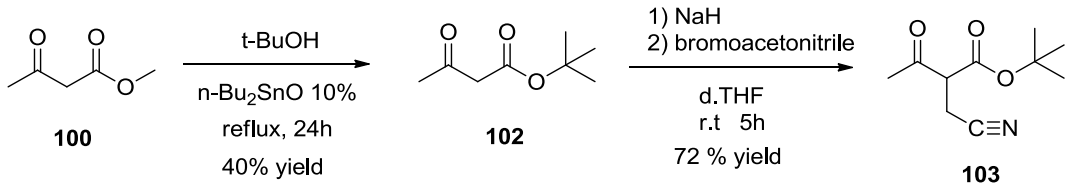


Πίνακας 7 : Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **97** με κετορεδουκτάσες. Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στην σειρά εμφάνισης των στερεοϊσομερών στην αέρια χρωματογραφία μεχειρόμορφη στήλη.

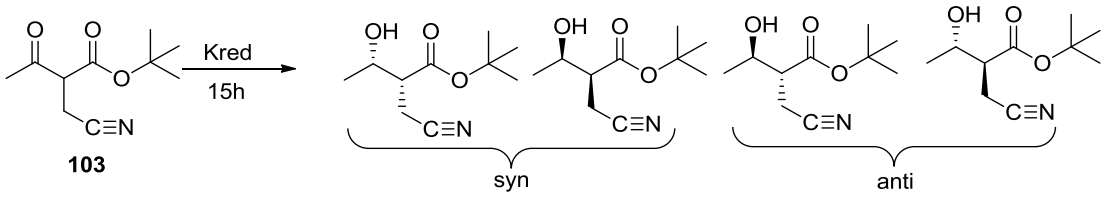
KRED	Απόδοση (%)	A[α] (%)	B[α] (%)	C[α] (%)	D[α] (%)	de (%)
102	>99	46	54	-	-	**>99**
119	>99	1	5	27	67	88
123	>99	4	10	25	61	72
101	>99	13	41	10.5	35.5	-
112	>99	16	30	34	20	-
107	>99	5	14	23	58	-
108	>99	3	12	30	55	-
A1C	>99	27.5	65	1.5	6	85
A1D	>99	34	58.5	2.5	5	85
A1B/132	>99	29	62	1.5	7.5	82
118	>99	1	5	35	59	88

[α]Ο υπολογισμός της διαστερεοεκλεκτικότητας έγινε μετά από εστεροποίηση των υδρόξυ προϊόντων με οξικό ανυδρίτη και σύγκριση με ρακεμικό μίγμα εστεροποιημένης υδρόξυ ένωσης. Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, οι αποδόσεις των βιοαναγωγών ήταν εξαιρετικές και με το υπόστρωμα **101**, ωστόσο μόνο στην περίπτωση της ενζυμικής αναγωγής με την KRED 102 παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της διαστερεοεκλεκτικότητας. Τα αποτελέσματα των υπόλοιπων βιοαναγωγών κινήθηκαν στα ίδια ή ελαφρώς μειωμένα ποσοστά διαστερεοεκλεκτικότητας, ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη εναντιοεκλεκτικότητα. Τελευταία προσπάθεια αποτέλεσε η τροποποίηση του υποστρώματος **97**, προς τον αντίστοιχο tert-βουτυλεστέρα **102** με μετεστεροποίηση. Στην συνέχεια με εύκολη αντίδραση με βρωμοακετονιτρίλιο μέσω μιας αντίδραση S_N2, σχηματίζεται το υπόστρωμα **103**. (**Σχήμα 41**).



Σχήμα 41: Σύνθεση του υποστρώματος **103**.



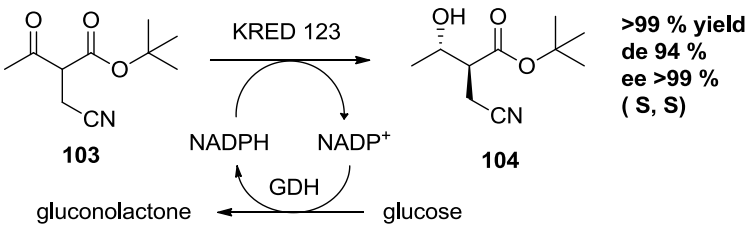
Πίνακας 8 :Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **103** με κετοredουκτάσες. Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στην σειρά εμφάνισης των στερεοϊσομερών στην αέρια χρωματογραφία μεχειρόμορφη στήλη.

KRED	Απόδοση (%)	A^{α} (%)	B^{α} (%)	C^{α} (%)	D^{α} (%)	de (%)	ee (%)
102	>99	67	28	1	4	90	-
119	>99	2.5	7	22	68.5	81	-
123	**>99**	**-**	**3**	**-**	**97**	**94**	**>99%**
101	>99	1	3	33	63	92	-
112	>99	1.5	5	40.5	53	87	-
107	>99	7.5	24.5	17.5	50.5	-	-
108	>99	2	9	28.5	60.5	78	-
A1C	>99	18	46	9	27	-	-

A1D	>99	17	41	12	30	-	-
A1B/132	>99	15	39	18	28	-	-
118	>99	3	8	33	56	78	-

[α]Ο υπολογισμός της διαστερεοεκλεκτικότητας έγινε μετά από εστεροποίηση των υδρόξυ προϊόντων με οξικό ανυδρίτη και σύγκριση με ρακεμικό μίγμα εστεροποιημένης υδρόξυ ένωσης. Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματ του Πίνακα 8, υπάρχει μια ομάδα ενζύμων (KRED A1C, A1D, A1B-132, 119) η οποία εμφανίζει λιγότερη έως ελάχιστη εκλεκτικότητα, όταν η εστερική ομάδα του προς μελέτη υποστρώματος τροποποιήθηκε στον πιο ογκώδη τριτ-βουτυλεστέρα. Μεταξύ όμως των όλων των θετικών ενζύμων που εντοπίστηκαν για τη συγκεκριμένη αναγωγή, η KRED 123 αποδείχτηκε εξαιρετικά στερεοεκλεκτικός καταλύτης και το προϊόν **104** σχηματίστηκε με εξαιρετική διαστερεο- και εναντιοεκλεκτικότητα (de 94%, ee >99%). (**Σχήμα 42**)



Σχήμα 42: Ενζυμική αναγωγή του εστέρα **103** με το την KRED 123. Η απόλυτη στερεοδομή προσδιορίστηκε με χρήση MPA-εστέρων και φασματοσκοπίας ^{1}HNMR.

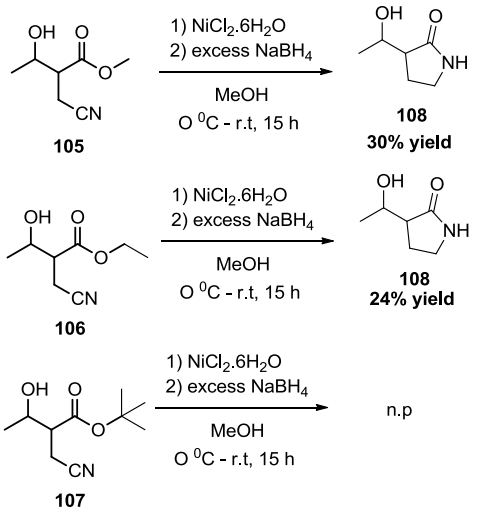
Σύνθεση γ-λακταμών

Δεδομένης της σπουδαιότητα των παραπάνω θετικών αποτελεσμάτων από τις ενζυμικές αναγωγές, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στην προσπάθεια κυκλοποίησης των οπτικά ενεργών υδρόξυ προϊόντων για την διαστερεο- και εναντιοεκλεκτική σύνθεση γ-λακταμών. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με αναγωγή του νιτριλίου σε αμίνη. Υποθέσαμε ότι θα ευνοούνταν η ενδομοριακή προσβολή της αμίνης στο καρβονύλιο του εστέρα σχηματίζοντας την αντίστοιχη λακτάμη. Είναι γνωστό στην βιβλιογραφία, πως η αναγωγή νιτριλίων είναι μια διαδικασία που μπορεί να δημιουργήσει πολλά παραπροϊόντα, και κυρίως προϊόντα διμερισμού μέσω διαμοριακής προσβολής της αμίνης σε ιμίνες που παράγονται κατά την αντίδραση αναγωγής.[93]

Η υδρογόνωση σε υψηλές πιέσεις 50-100 atm και θερμοκρασία 100 ^{o}C με χρήση καταλύτη νικελίου Raney (RaNi) αποτελεί μια κλασσική και αποδοτική διαδικασία αναγωγής νιτριλίων στην βιομηχανία,[94] ενώ εργαστηριακά προτιμούνται πιο ήπιες και τις περισσότερες φορές λιγότερο αποδοτικές πειραματικές διαδικασίες με χρήση καταλυτών Pd[95] και Pt.[96]

Όλες οι δοκιμές που πραγματοποιήσαμε με καταλύτες Pd και Pt απέτυχαν να κυκλοποιήσουν τις υδρόξυ νιτριλοενώσεις, γεγονός που οφείλεται αποκλειστικά στην αδυναμία εφαρμογής της σωστής πίεσης στα πειράματα. Η μέγιστη πίεση που μπορούσε να επιτευχθεί με την υπάρχοντα υποδομή με καταλύτη Pd/C ήταν μέχρι 4 bar.

Μια εναλλακτική λύση ήταν η χρήση βοροϋδριδίου του νατρίου ($NaBH_4$) ως αναγωγικό μέσο, το οποίο σε συνδυασμό με καταλύτη Ni ή Co ($NiCl_2$, $CoCl_2$) δημιουργεί μεταλλοβορικές ενώσεις οι οποίες κατευθύνουν την χημειοεκλεκτική αναγωγή διπλών και τριπλών δεσμών.[97] Η μέθοδος αυτή δεν είναι τόσο αποδοτική όσο η υδρογόνωση κυρίως λόγω της ύπαρξης προϊόντων διμερισμού αλλά και της δύσκολης απομόνωσης του προϊόντος από τα βορίδια νικελίου. Οι ανόργανες αυτές ενώσεις είναι διαλυτές σε οργανικούς και μη διαλύτες με χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Το 2000 η ερευνητική ομάδα του Caddick, ανέφερε την κατεργασία των βορίδιων του νικελίου με διαιθυλενοτριαμίνη[98] για την ευκολότερη απομόνωση των παραγόμενων αμινών. Έτσι, επιλέξαμε να εφαρμόσουμε αυτό το πειραματικό αρχικά στους ρακεμικούς α-νιτριλο-β-υδρόξυ εστέρες όπως φαίνεται στο παρακάτω **Σχήμα 43.**

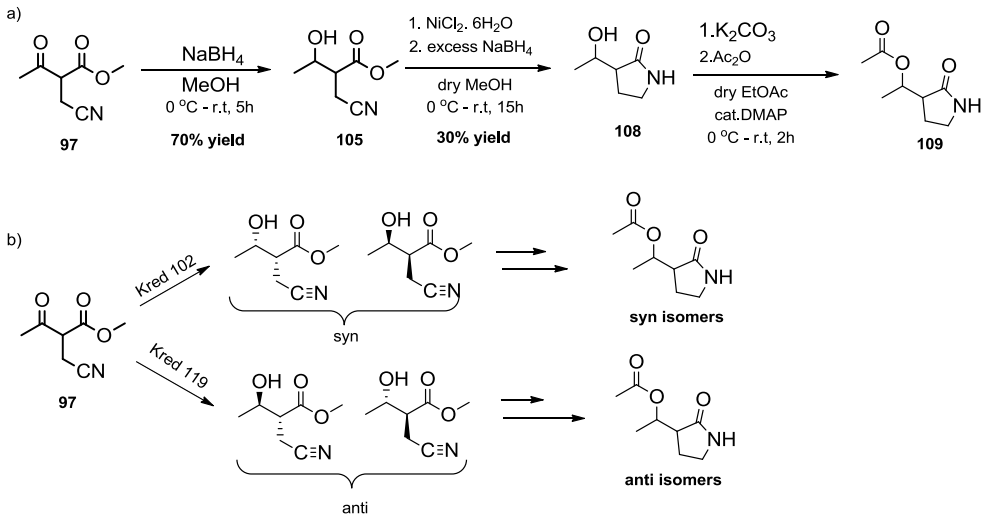


Σχήμα 43: Αντιδράσεις αναγωγής νιτριλίου για τις ενώσεις **105**,**106**,**107**.

Για πρώτη φόρα, επιτύχαμε την σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος, ωστόσο η απόδοση ήταν αρκετά χαμηλή, κυρίως λόγω των προϊόντων διμερισμού. Από τα αποτελέσματα είναι εμφανές πως στην περίπτωση του μεθυλεστερα **105** η απόδοση είναι λίγο πιο υψήλη από ότι στον αιθυλεστέρα **106**, λόγω καλύτερης αποχωρούσας ομάδας κατά την αυθόρμητη κυκλοποίηση, σε αντίθεση με τον εστέρα **107** όπου η ογκώδης tert-βούτυλο ομάδα καθιστά αδύνατη την αυθόρμητη λακταμοποίηση.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι κατά τον καθαρισμό της γ-λακτάμης με χρωματογραφία στήλης, πραγματοποιήθηκε επιμερισμός της ένωσης από το πληρωτικό υλικό της στήλης (silica), με αποτέλεσμα να μετατραπεί αποκλειστικά στα *anti* ισομερή.

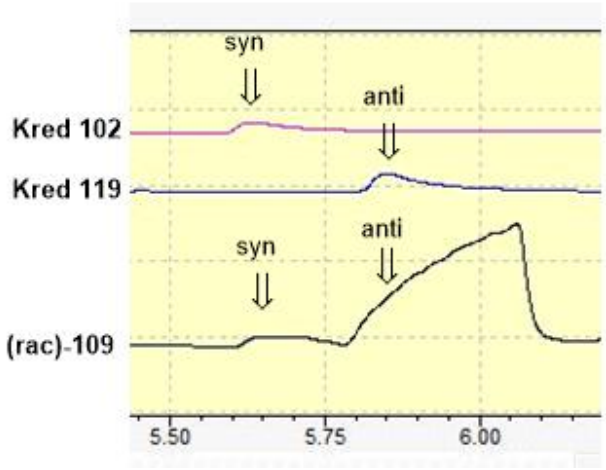
Επόμενος στόχος, αφού είχαμε επιτύχει την ρακεμική σύνθεση, ήταν η διαστερεοεκλεκτική σύνθεση γ-λακταμών και όχι η εναντιοεκλεκτική σύνθεση, αφού ο οπτικά καθαρός α-νιτριλο β-υδροξυ tert-βουτυλεστέρας **104** (99% ee) ήταν αδύνατο να κυκλοποιηθεί αυθόρμητα. Έχοντας υπόψη ποια ένζυμα καταλύουν το υπόστρωμα **97** με υψηλή *anti* και *syn* διαστερεοεκλεκτικότητα, προχωρήσαμε στην λακταμοποίηση των αντίστοιχων υδρόξυ ενζυμικών προϊόντων και στην περαιτέρω παραγοντοποίησή τους, για την καλύτερη διάκριση των διαστερεομερών στον αέριο χρωματογράφο, που φέρει χειρόμορφη στήλη. (**Σχήμα 44**)



Σχήμα 44: a) Ρακεμική σύνθεση της ακετυλιωμένης λακτάμης **109**. b) Η αντίστοιχη διαστερεοεκλεκτική σύνθεση.

Στην Εικόνα 18 φαίνεται η αεριοχρωματογραφική ανάλυση των λακταμικών προϊόντων τόσο αυτών που προέρχονται από τις ενζυμικές αναγωγές με KRED 102 και KRED 119 αντίστοιχα, όσο και από τη χημική σύνθεση. Φαίνεται καθαρά ότι τα

προϊόντα κυκλοποίησης διατηρούν την διαστερεοεκλεκτικότητα που είχαν μετά την ενζυμική αναγωγή. Δηλαδή, από την αναγωγή με την KRED 102 σχηματίζεται syn λακτάμη και με την KRED 119 anti.



Εικόνα 78: Σύγκριση φασμάτων αέριας χρωματογραφίας. Η anti κορυφή του ρακεμικού μίγματος είναι πιο ευρεία, λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας του δείγματος σε αντίθεση με τις ενζυμικές αντιδράσεις.

Συμπεράσματα

Στη παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μια απλή διαδικασία χημειοενζυμικής σύνθεσης υψηλής αξίας ενδιαμέσων. Οι α-νιτριλο-β-κετο εστέρες για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, έδειξαν να αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για ενζυμικές αναγωγές με κετοredουκτάσες δίνοντας προϊόντα με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα και σε μερικές περιπτώσεις και εναντιοεκλεκτικότητα. Συγκεκριμένα, η απόδοση σχεδόν όλων των ενζυμικών αντιδράσεων ήταν >99%, γεγονός που δείχνει την υψηλή δραστικότητα που εμφανίζουν οι βιοκαταλύτες για τέτοιου τύπου υποστρωμάτα. Μεταξύ όλων των θετικών ενζύμων που εντοπίστηκαν για τις παραπάνω βιοαναγωγές, μια ομαδα ενζύμων που περιλαμβάνει τις KRED 119,108,123,118, παρουσιάζει σταθερή προτίμηση στα *anti* προϊόντα, ανεξαρτήτου υποστρώματος με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα (89-99%), και μια άλλη στα *syn* αντίστοιχα (KRED A1C,A1D,102 κ.α). Στην περίπτωση της ενζυμικής αναγωγής με την KRED 123 υπάρχει και εκπληκτική εναντιοεκλεκτικότητα (>99%). Τα μόρια αυτά μπορούν να υδρογονωθούν, μια διαδικασία που πραγματοποιείτε ήδη στην βιομηχανία για την σύνθεση καρβαπενεμών όπως προαναφέρθηκε,[91] και να ολοκληρωθεί έτσι μια χημειοενζυμική σύνθεση δυο σταδίων οπτικά καθαρών υδρόξυ γ-βουτυρολακταμών, μια εύκολη μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί σε δ- και ε-λακτάμες. Ακόμη εξίσου σημαντική παρατήρηση, είναι οι διαφορές που μπορούν να

προκύψουν στην δραστικότητα αλλά κυρίως την εκλεκτικότητα ενός ενζύμου κατά την τροποποίηση ενός υποστρώματος καθώς πολλές φορές η ύπαρξη ενός και μόνο επιπλέον άνθρακα μπορεί να οδηγήσει όχι μονο σε μία χαμηλή εκλεκτικότητα αλλά και στην μηδενική δραστικότητα του ενζύμου.

3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδροφουράνιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet.

Οι κετορεδουκτάσες, το συνένζυμο NADPH και η αφυδρογονάση της γλυκόζης ήταν της εταιρίας Codexis και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

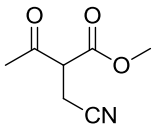
Όργανα

Τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR ελήφθησαν με το φασματόμετρο 300 MHz ή 500 MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) σε διαλύτη $CDCl_3$. Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο της Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated β-κυκλοδεξτρίνη) 30m x 0.25mm x 0.25μm.

Γενικές συνθετικές μέθοδοι.

Γενική αντίδραση νιτριλίωσης για την σύνθεση των υποστρωμάτων **97**, **101**, και **103**.

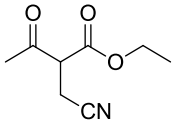
Αντίδραση Νιτριλίωσης: Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκε αργά NaH (1.5 mmol) σε διάλυμα β-κετο εστέρα (1 mmol) σε THF (5 mL), σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 1 h ανάδευσης, προστέθηκε στάγδην το βρωμοακετονιτρίλιο (1.2 mmol) διαλυμένο σε THF (5 mL) και η αντίδραση ελέγχεται με TLC. Για την απομόνωση του προϊόντος, προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα NaCl και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα (3x15 mL). Μετά την ξήρανση και την συμπύκνωση της οργανικής φάσης το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 5/1).



97

2-κυανομεθυλ-3-οξοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας

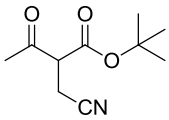
^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.9 (t, J = 7.25 Hz, 1H) 3.82 (s, 3H), 2.82-2.92 (m, 2H) 2.4 (s, 3H)
^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 198.5, 166.9, 117.2, 55, 53.4, 29.5, 15.6.
(Απόδοση 75%)



101

2-κυανομεθυλ-3-οξοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.28 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.85 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 2.84 (d, J = 1.24 Hz, 1H), 2.82 (d, J = 1.53 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 3H).
^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 198.7, 166.4, 117.3, 62.7, 55.2, 29.4, 15.5, 14.
(Απόδοση 71%)



103

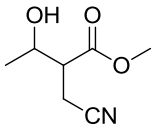
2-κυανομεθυλ-3-οξοβουτανοϊκός tert-βουτυλεστέρας

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.76 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.77-2.78 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.5 (s, 9H).
^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 199.2, 165.4, 117.5, 84.1, 56.2, 29.3, 27.8, 15.5.
(Απόδοση 72%)

Γενική αντίδραση αναγωγής των κέτο εστέρων προς σχηματισμό των αντίστοιχων υδρόξυ ενώσεων 105, 106 και 107.

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου $NaBH_4$ (0.098 mmol) προστέθηκε σε άνυδρη αιθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 ^{o}C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην η ακόρεστη καρβόνυλο ένωση (0.3 mmol) διαλυμένη

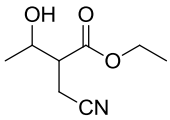
σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους 0 ^{o}C και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε αργά στους 0 ^{o}C κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 2/1).



105

2-κυανομεθυλ-3-υδροξυβουτανοϊκός μεθυλεστέρας

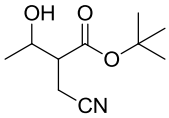
^{1}H NMR (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.08-4.21 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.67-2.86 (m, 3H), 1.28 (d, J = 6.55 Hz, 3H).
^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$) diatsereomeric ratio anti:syn δ: 172 (syn), 171.7 (anti), 118.1 (syn), 117.7 (anti), 67.22 (syn), 67 (anti), 52.6 (anti), 52.57 (syn), 48.5 (anti), 48.2 (syn), 20.6 (anti-syn), 16,5 (syn), 15.1 (anti).
(Απόδοση 70%)



106

2-κυανομεθυλ-3-υδροξυβουτανοϊκός αιθυλεστέρας

^{1}H NMR (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.25 (q, J = 7 Hz, 2H), 4.07-4.20 (m, 1H), 2.70-2.82 (m, 3H), 1.27-1.33 (m, 6H).
^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 171.37 (anti-syn), 117.75 (anti), 67.3 (anti) , 67.0 (syn), 61.75 (anti-syn), 48.5 (syn), 48.0 (anti), 20.8 (syn), 20.7 (anti), 16.6 (anti), 15.6 (syn), 14.1 (anti-syn).
(Απόδοση 65%)



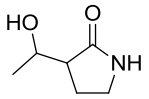
107

2-κυανομεθυλ-3-υδροξυβουτανοϊκός tert-βουτυλεστέρας

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): ratio of diastereoisomers anti:syn 86:14, δ 4.11 (m, $1H_{syn}$), 4.05 (m, $1H_{anti}$), 2.62-2.74 (m, $3H_{anti-syn}$), 1.5 (s, $9H_{anti-syn}$), 1.27 (d, J = 6.4 Hz, $3H_{anti-syn}$).
^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 170.8,117.9, 83.1, 67.4, 48.6, 28, 20.7, 16.7.
(Απόδοση 80%)

Γενική αντίδραση αναγωγής των α-νιτριλο-β-υδροξυεστέρων προς σχηματισμό της αντίστοιχης λακτάμης 108.

Σε δίλαιμη προξηραμένη φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστέθηκε σε διάλυμα ξηρής MeOH (15 mL) και νιτριλίου (2.0 mmol), ο καταλύτης $NiCl_2.6H_2O$ (0.2 mmol) στους 0 ^oC. Έπειτα προστέθηκε περίσσεια $NaBH_4$ (14.0 mmol) σε μικρές δόσεις και σε διάστημα 1 h. Η αντίδραση είναι έντονα εξώθερμη και αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και περαιτέρω ανάδευση για 15-24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκε διαιθυλενοτριαμίνη (2.0 mmol) για την εξουδέτερωση των νικελικών βοριδίων που βρίσκονται υπό την μορφή μαύρου ιζήματος στην αντίδραση. Το μωβ διάλυμα που προκύπτει συμπυκνώνεται και ακολουθούν εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 15 mL) και $NaHCO_3$ (2 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης ($CHCl_3$/EtOAc, v/v, 1/1).



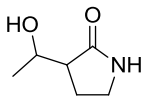
108

1-υδροξυαιθυλ-3-πυρρολιδιν-2-όνη

^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): ratio of diastereoisomers anti:syn 79:21, δ 6.2 (s.br, $1H_{anti}$), 6.1 (s.br, $1H_{syn}$), 5.05 (s.br. $1H_{anti-syn}$), 4.28-4.30 (m, $1H_{syn}$), 3.81-3.87 (m, $1H_{anti}$), 3.31-3.40 (m, $2H_{anti-syn}$), 2.52-2.56 (m, $1H_{syn}$), 2.28-2.34 (m, $1H_{anti}$), 2.17-2.23 (m, $1H_{anti}$), 2.12-2.16 (m, $1H_{syn}$). 1.72-1.80 (m, $1H_{anti-syn}$), 1.228 (d, J = 6.5 Hz, $3H_{syn}$), 1.19 (d, J = 6.2 Hz, $3H_{anti}$).
^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 180.6, 69.5, 46.3, 40.2, 24.6, 20.9 (Στο φάσμα αυτό λόγω επιμερισμού της παραπάνω ενώσης στο $CHCl_3$ φαίνονται μονο τα anti ισομερή)

Απόδοση από αναγωγή του **97 :** 30%

Απόδοση από αναγωγή του **101 :** 24%



108

1-υδροξυαιθυλο-3-πυρρολιδιν-2-όνη

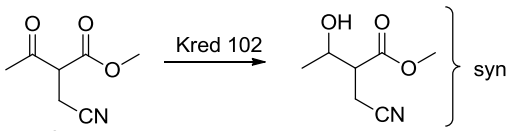
(*anti* ισομερή μετά από επιμερισμό στην όξινη silica)

^{1}H NMR (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): anti isomers δ 6.34 (s.br., 1H), 3.79-3.89 (m, 1H), 3.31-3.36 (m, 2H), 2.15-2.35 (m, 2H) , 1.72-1.83 (m, 1H), 1.19 (d, J = 6.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 180.6, 69.5, 46.3, 40.2, 24.6, 20.9.

Γενικό πειραματικό ενζυμικών αναγωγών με τις κετορεδουκτάσες

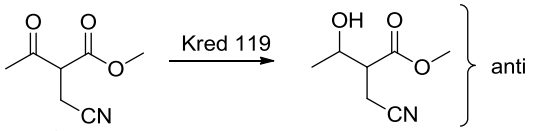
5mgr υποστρώματος διαλύθηκαν σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.9 και προστέθηκαν 18 mg γλυκόζης, 2 mg κετορεδουκτάσης, 2 mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) και 2 mg αναγωγικού NADPH. Τα προϊόντα απομονώθηκαν με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και δεν καθαρίστηκαν περαιτέρω. (Απόδοση >99%)



97

^{1}H NMR (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): syn isomers δ 4.17-4.22 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.67-2.81 (m, 3H), 1.28 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

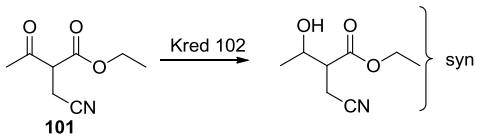
^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 172, 118.1, 67, 52.6, 48.5, 20.9, 15.1.



97

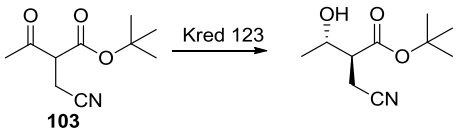
^{1}H NMR (500 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): anti isomers δ 4.09-4.15 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.80-2.84 (m, 1H), 2.74-2.76 (m, 2H), 1.28 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 171.8, 117.7, 67.2, 52.57, 48.0, 20.76, 16.6.



^{1}H NMR (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): syn isomers δ 4.25 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.15-4.20 (m, 1H), 2.67-2.82 (m, 3H), 1.24-1.34 (m,6H).

^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 171.6, 118.2, 67. 61.8, 48.5, 20.8, 15.1, 14.1.



^{1}H NMR (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.03-4.07 (m, 1H), 2.65-2.72 (m, 3H), 1.5 (s, 9H), 1.28 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 170.8,117.9, 83.1, 67.4, 48.6, 28, 20.7, 16.8.

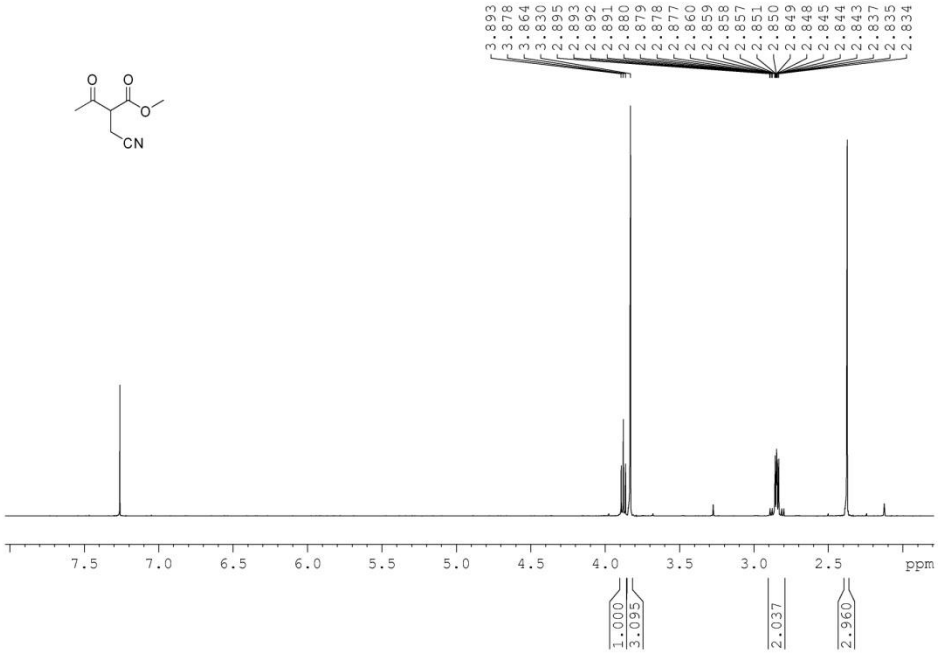
<u>Γενική μέθοδος σύνθεσης των (*R*)- MPA και (*S*)- MPA εστέρων</u>

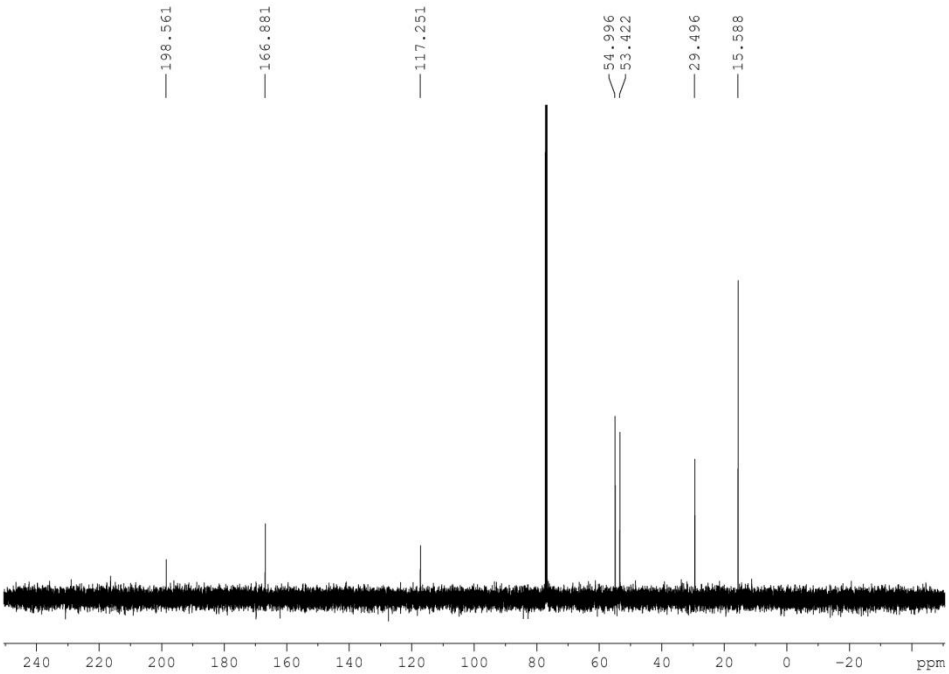
Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1 mmole), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmole, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmole, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης.

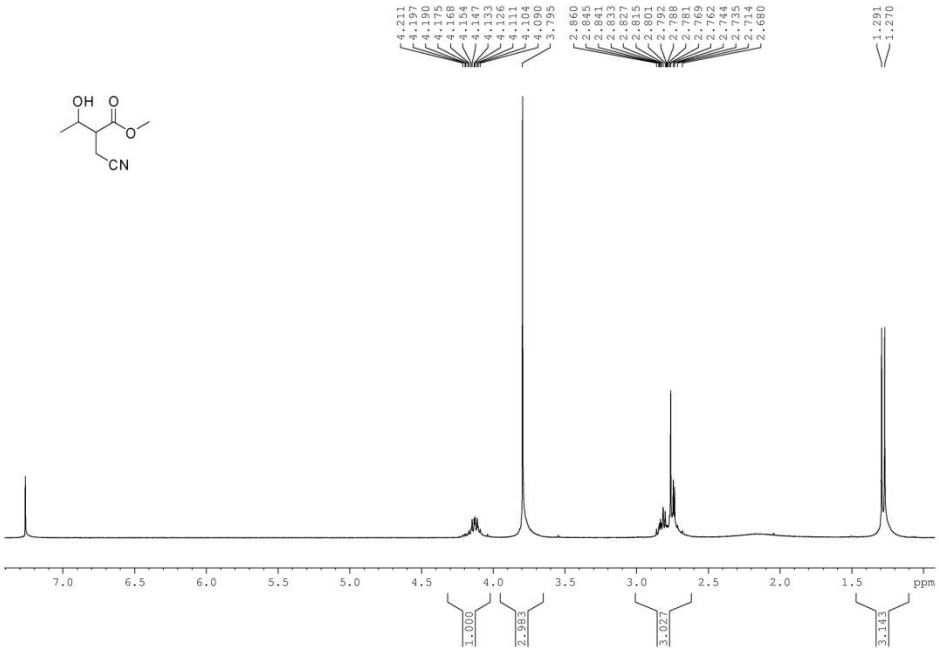
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

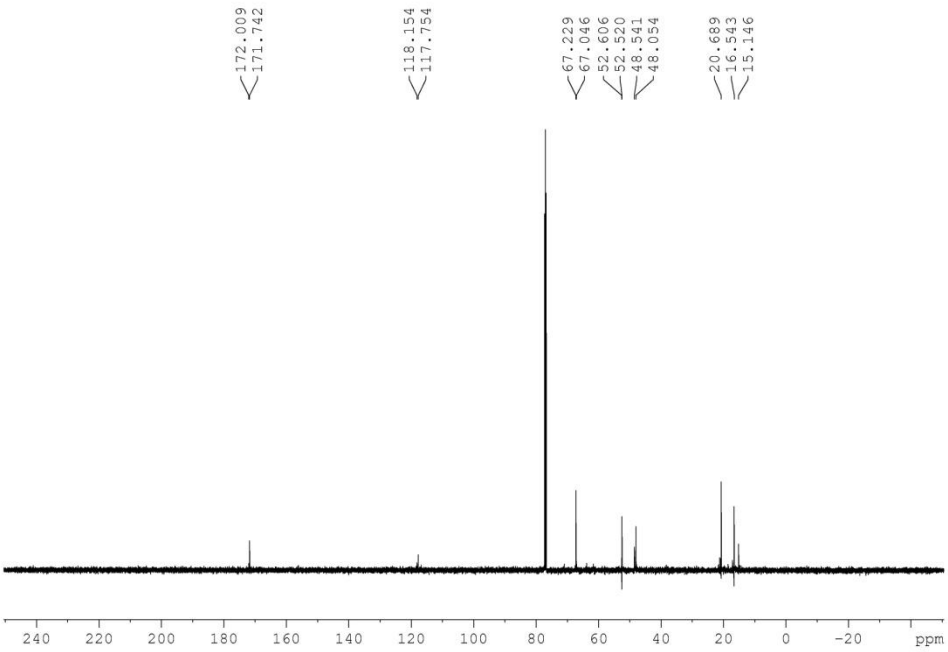
ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}HNMR, ^{13}CNMR

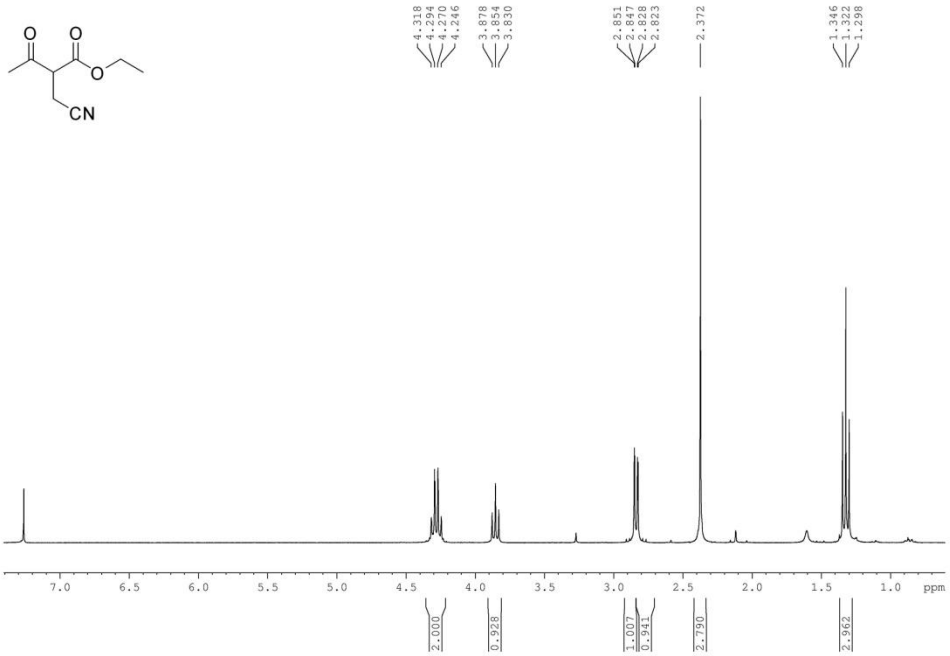
ΚΑΙ GC

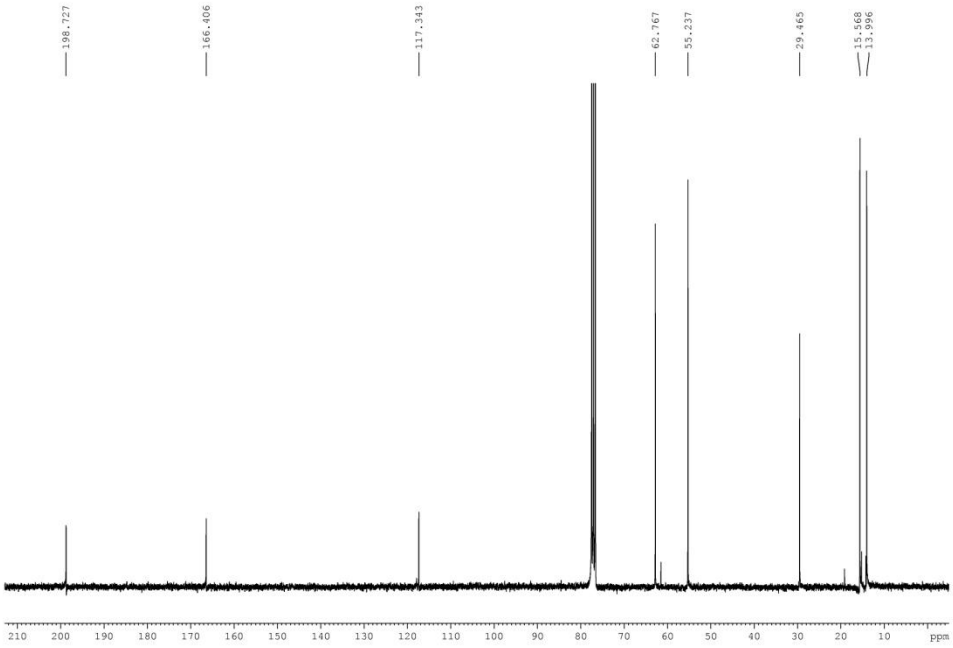

3.893
3.878
3.864
3.830
2.895
2.893
2.892
2.891
2.880
2.879
2.878
2.877
2.860
2.859
2.858
2.857
2.851
2.850
2.849
2.848
2.845
2.844
2.843
2.837
2.835
2.834
O
O
O
CN
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm
1.000
3.095
2.037
2.960

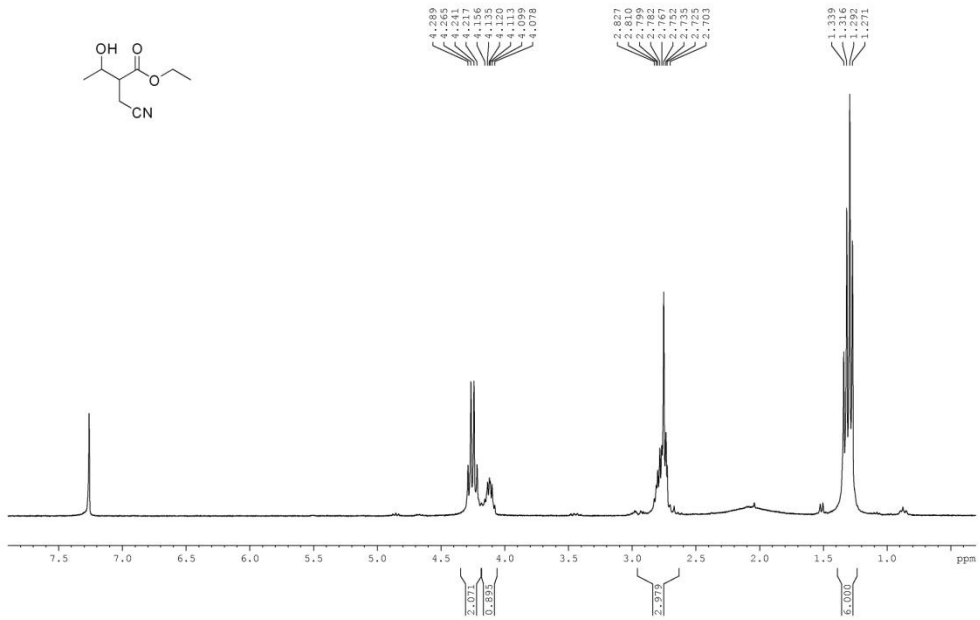

198.561
166.881
117.251
54.996
53.422
29.496
15.588
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
ppm

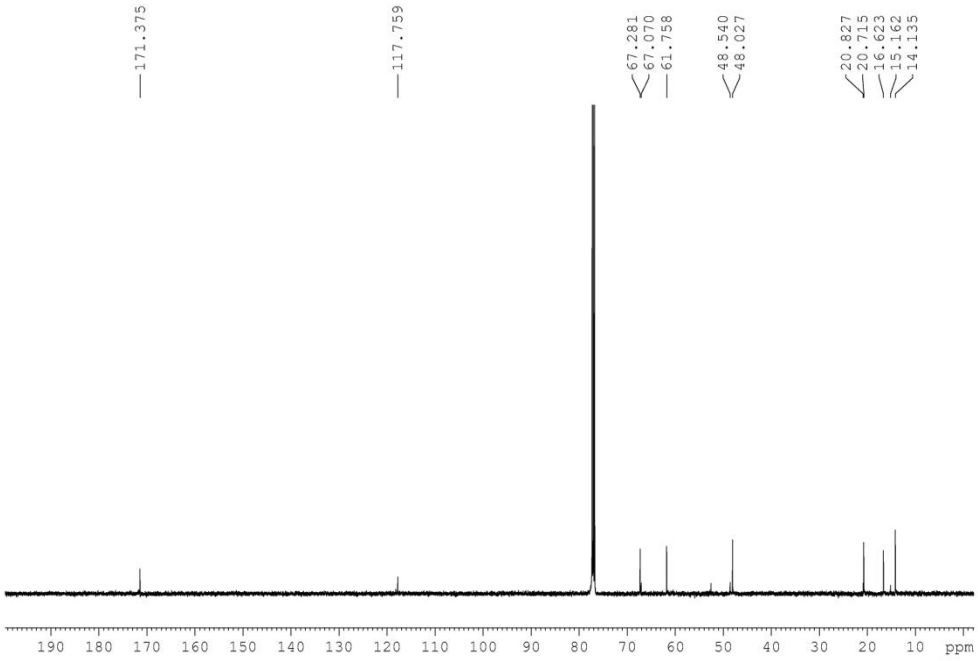

OH
O
O
CN
4.211
4.197
4.190
4.175
4.168
4.154
4.147
4.133
4.126
4.111
4.104
4.090
3.795
2.860
2.845
2.841
2.833
2.827
2.815
2.801
2.792
2.788
2.781
2.769
2.762
2.744
2.735
2.714
2.680
1.291
1.270
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm
1.000
2.983
3.027
3.143

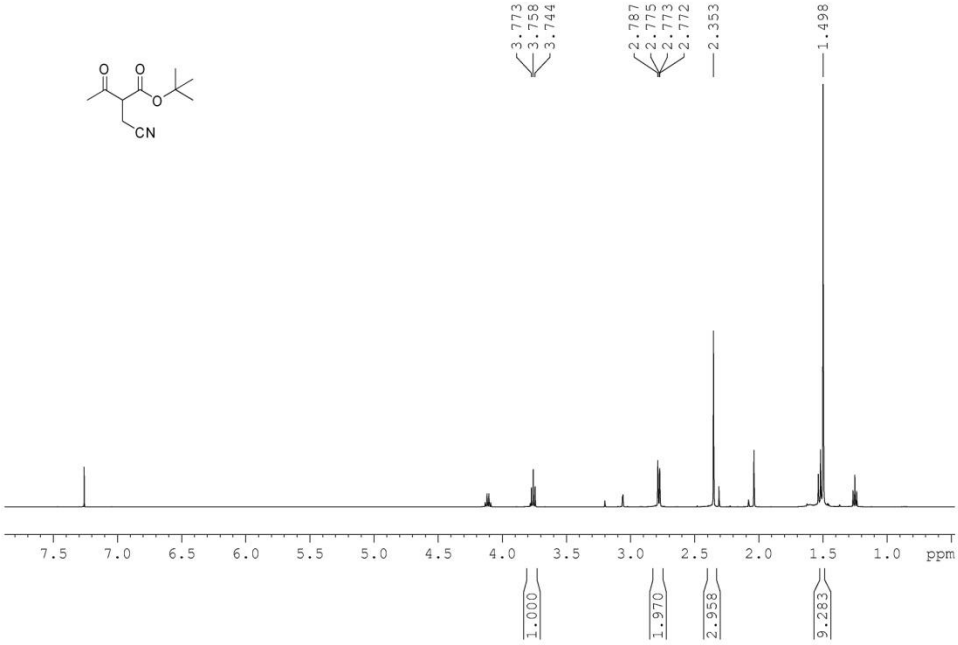

172.009
171.742
118.154
117.754
67.229
67.046
52.606
52.520
48.541
48.054
20.689
16.543
15.146
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
ppm

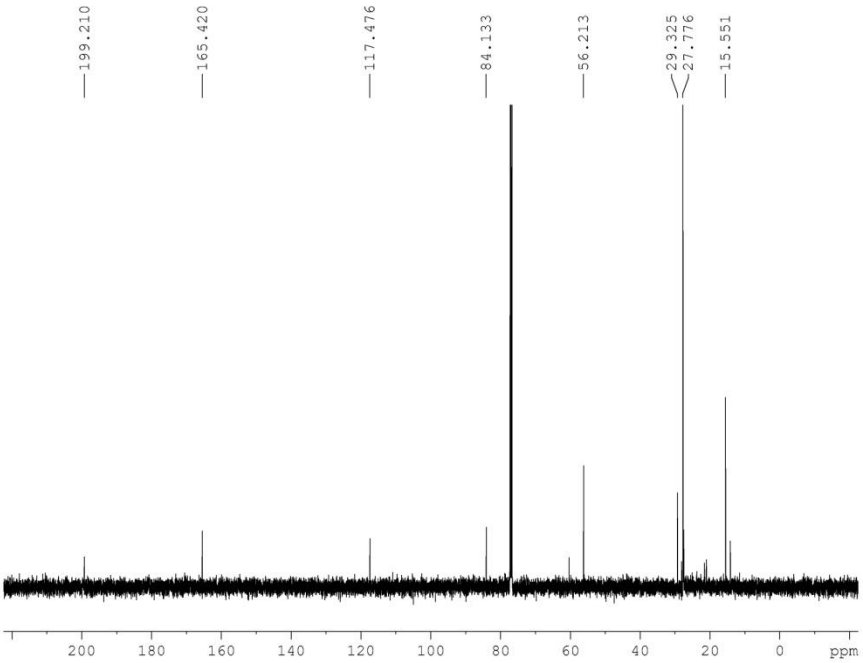

4.318
4.294
4.270
4.246
3.878
3.854
3.830
2.851
2.847
2.828
2.823
2.372
1.346
1.322
1.298
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
2.000
0.928
1.007
0.941
2.790
2.962

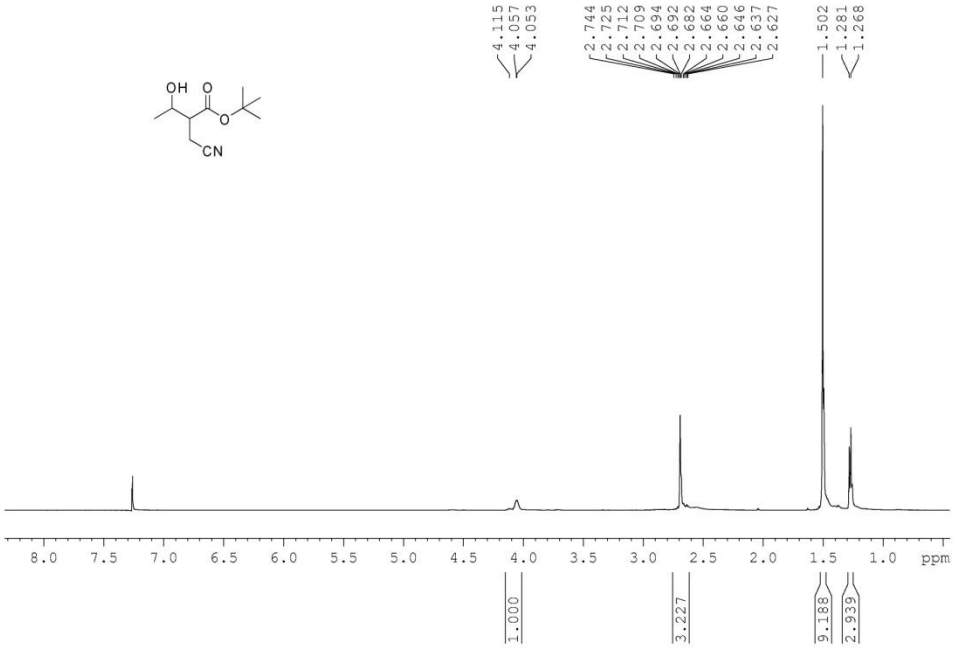

198.727
166.406
117.343
62.767
55.237
29.465
15.568
13.996
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

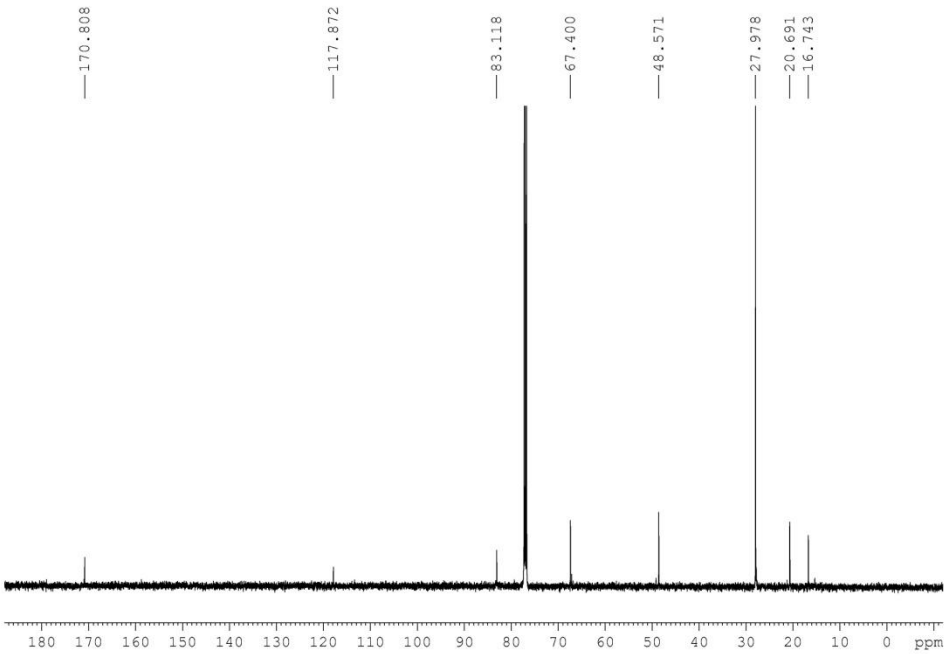

OH
O
O
CN
4.289
4.265
4.241
4.217
4.156
4.135
4.120
4.113
4.099
4.078
2.827
2.810
2.799
2.782
2.767
2.752
2.735
2.725
2.703
1.339
1.316
1.292
1.271
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
2.071
0.895
2.979
6.000

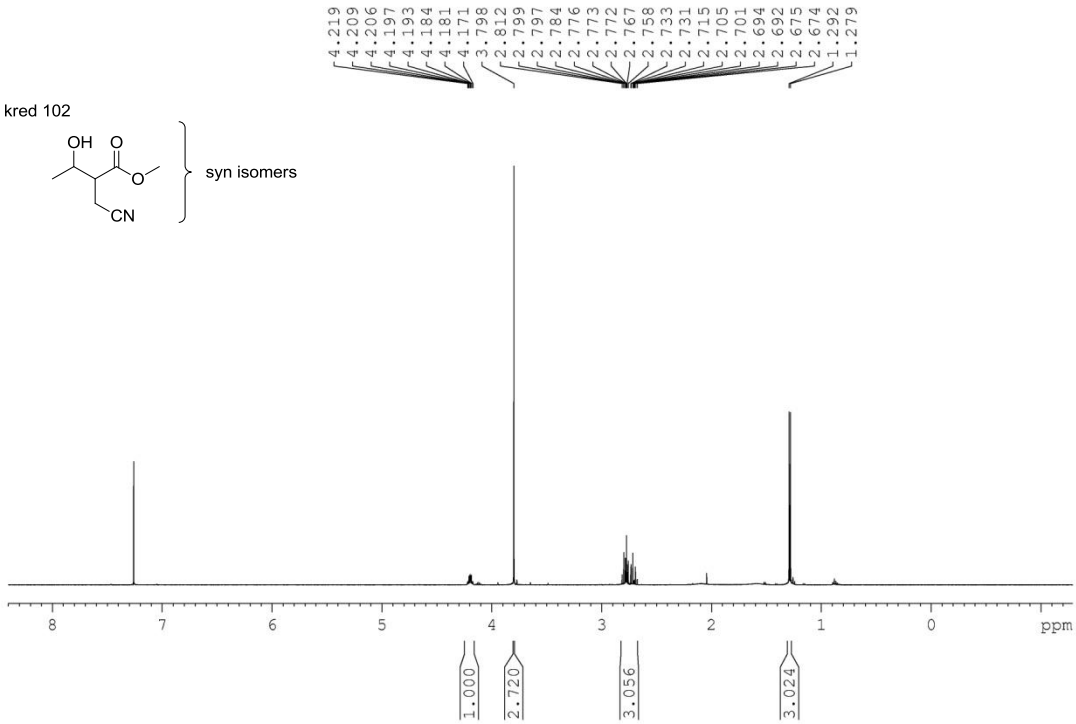

171.375
117.759
67.281
67.070
61.758
48.540
48.027
20.827
20.715
16.623
15.162
14.135
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

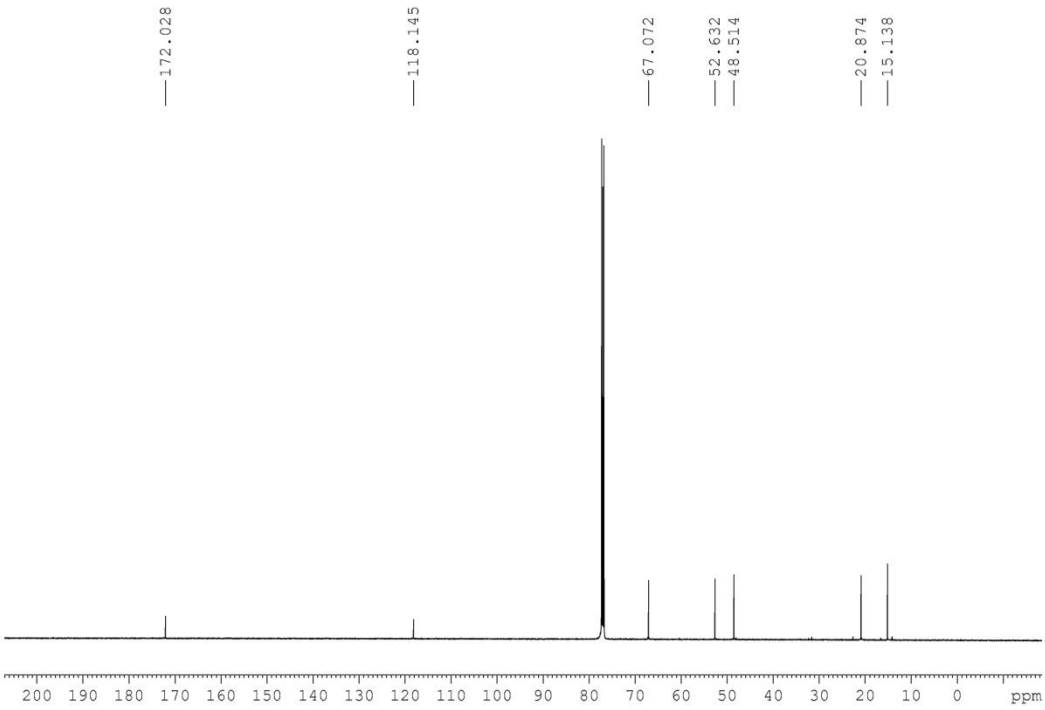

3.773
3.758
3.744
2.787
2.775
2.773
2.772
2.353
1.498
CN
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.000
1.970
2.958
9.283


199.210
165.420
117.476
84.133
56.213
29.325
27.776
15.551
200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

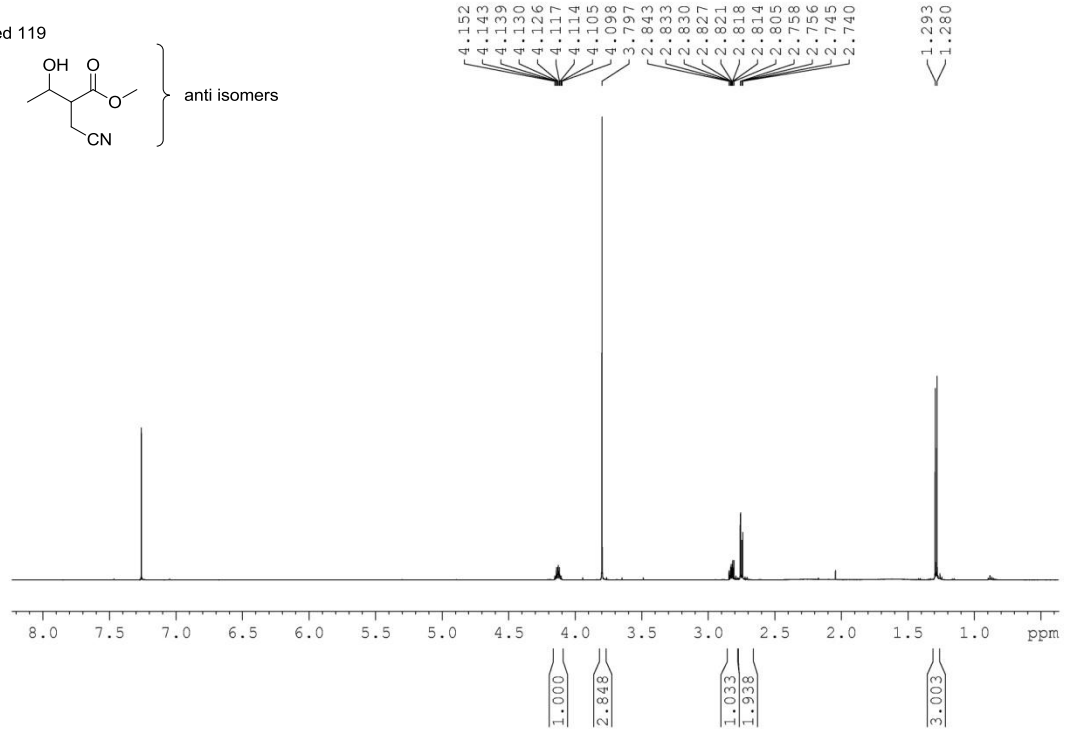

OH
O
O
CN
4.115
4.057
4.053
2.744
2.725
2.712
2.709
2.694
2.692
2.682
2.664
2.660
2.646
2.637
2.627
1.502
1.281
1.268
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.000
3.227
9.188
2.939

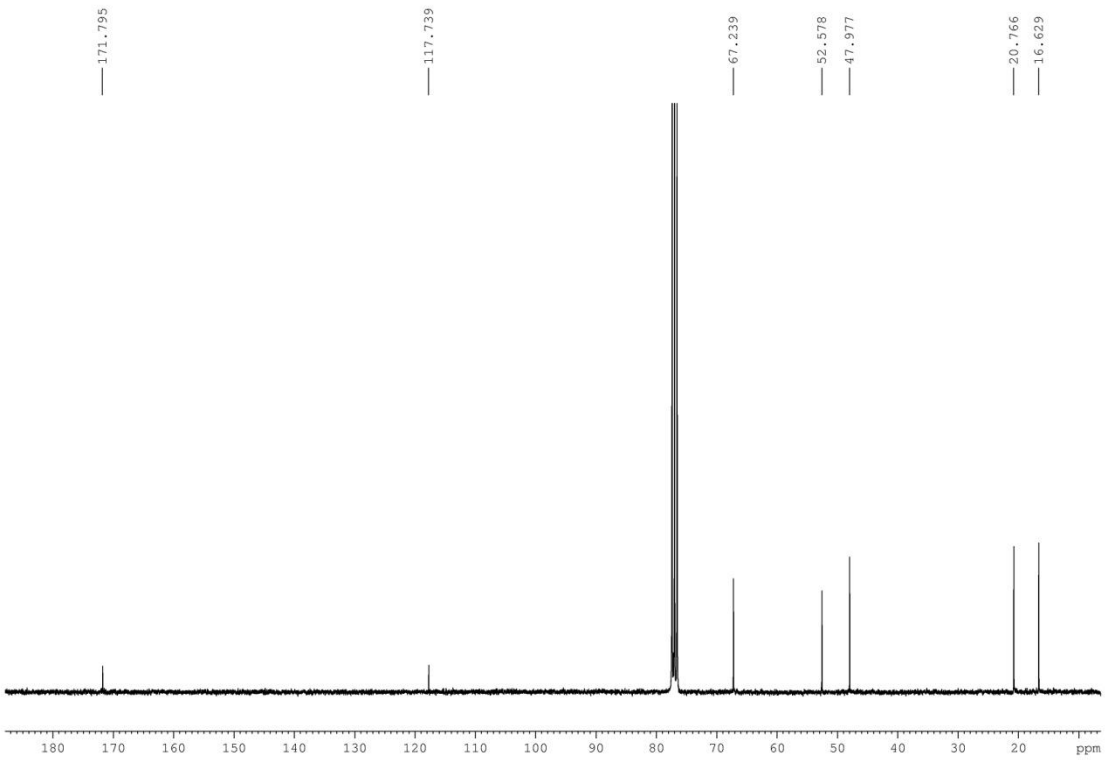

170.808
117.872
83.118
67.400
48.571
27.978
20.691
16.743
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm


kred 102
OH
O
O
CN
syn isomers
4.219
4.209
4.206
4.197
4.193
4.184
4.181
4.171
3.798
2.812
2.799
2.797
2.784
2.776
2.773
2.772
2.767
2.758
2.733
2.731
2.715
2.705
2.701
2.694
2.692
2.675
2.674
1.292
1.279
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.000
2.720
3.056
3.024

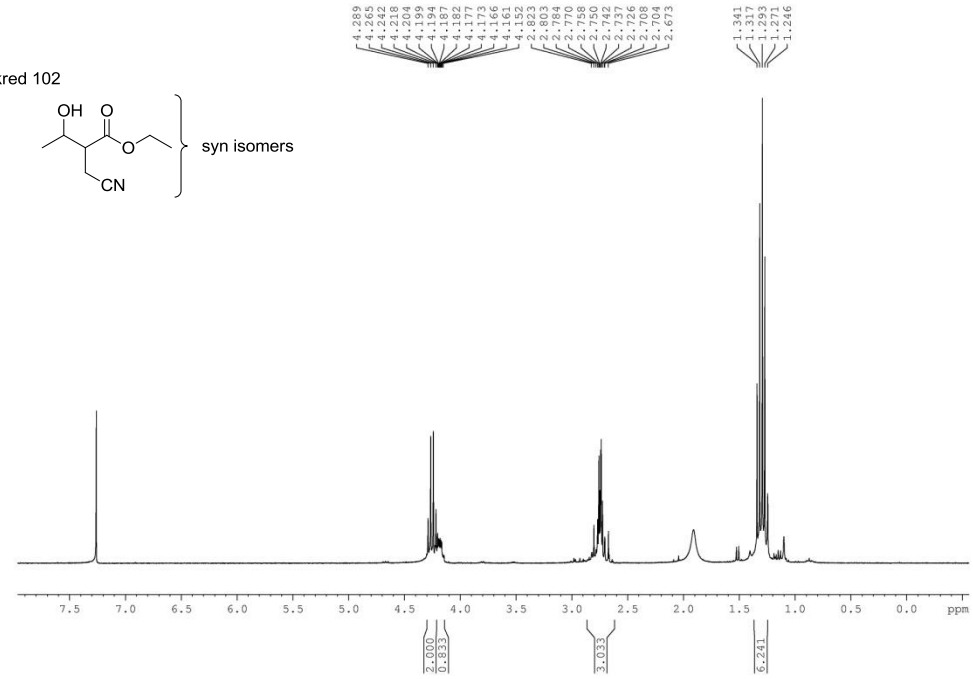

172.028
118.145
67.072
52.632
48.514
20.874
15.138
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

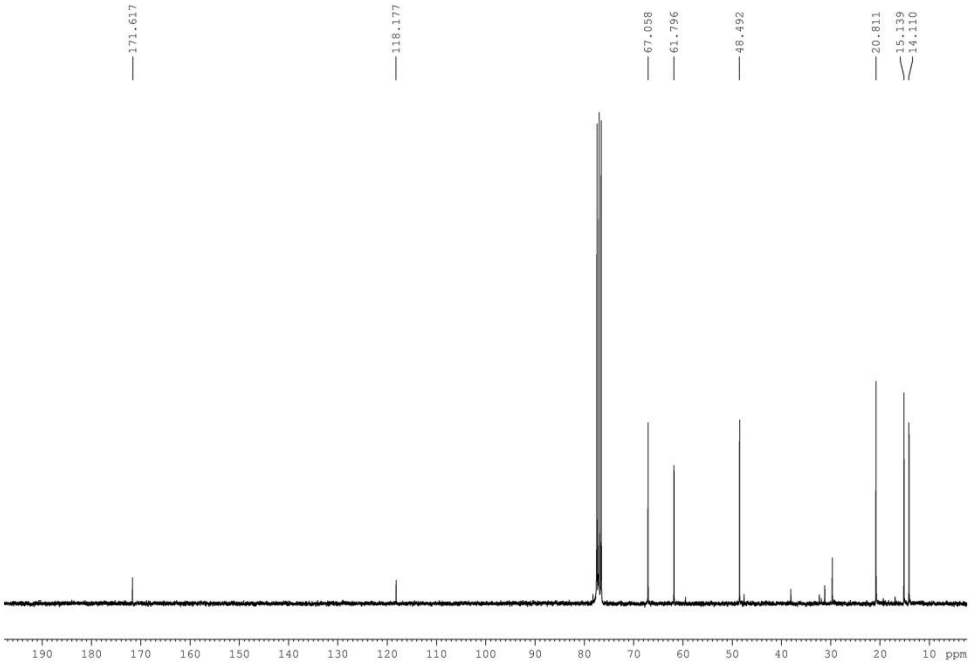
kred 119


OH
O
O
CN
anti isomers
4.152
4.143
4.139
4.130
4.126
4.117
4.114
4.105
4.098
3.797
2.843
2.833
2.830
2.827
2.821
2.818
2.814
2.805
2.758
2.756
2.745
2.740
1.293
1.280
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.000
2.848
1.033
1.938
3.003


171.795
117.739
67.239
52.578
47.977
20.766
16.629
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

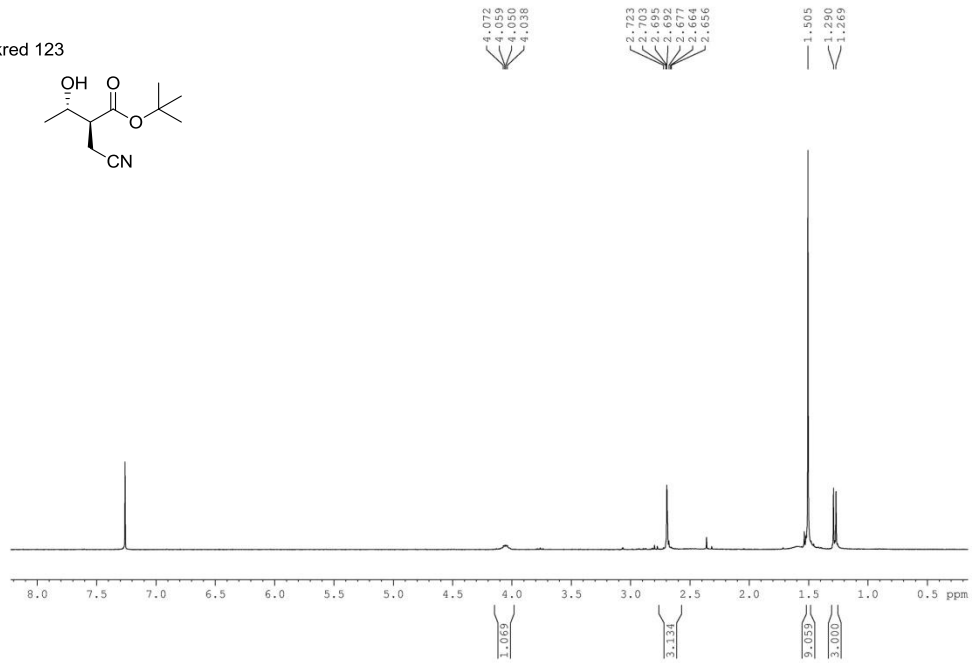
kred 102

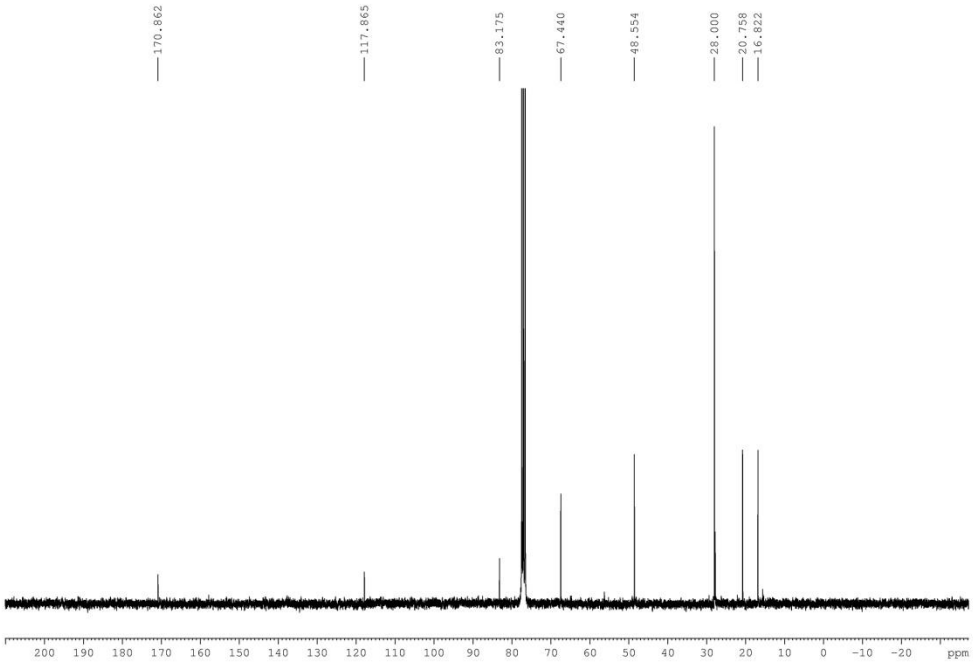

OH
O
O
CN
syn isomers
4.289
4.265
4.242
4.218
4.204
4.199
4.194
4.187
4.182
4.177
4.173
4.166
4.161
4.152
2.823
2.803
2.784
2.770
2.758
2.750
2.742
2.737
2.726
2.708
2.704
2.673
1.341
1.317
1.293
1.271
1.246
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
2.000
0.833
3.033
6.241

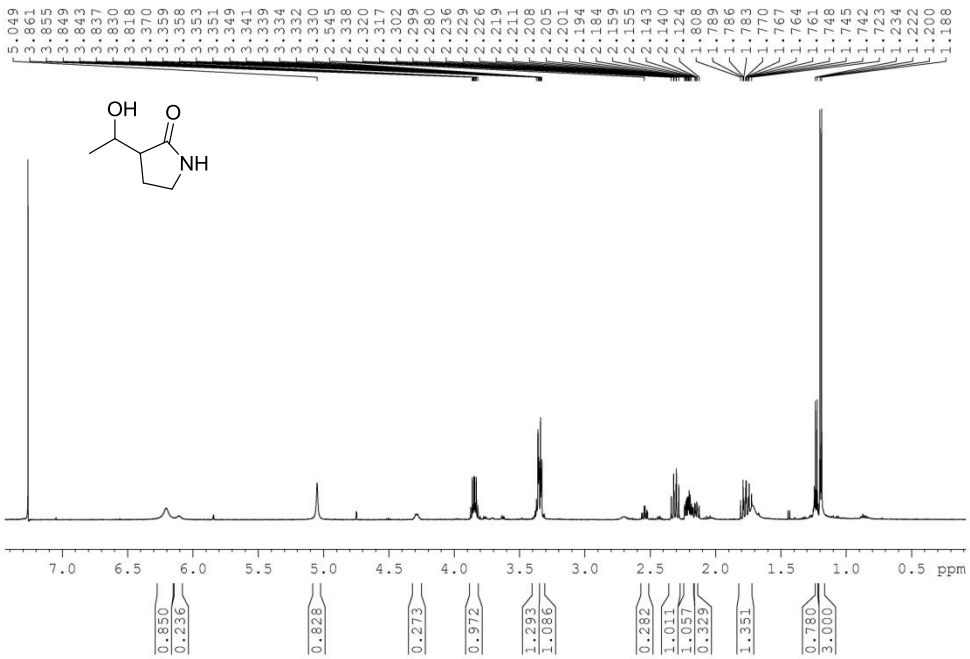

171.617
118.177
67.058
61.796
48.492
20.811
15.139
14.110
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

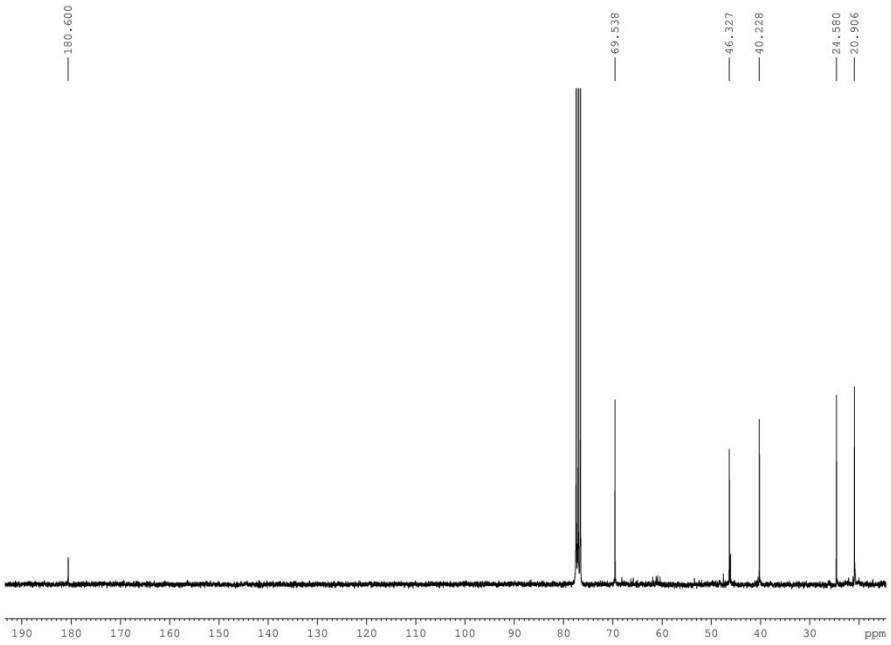
kred 123

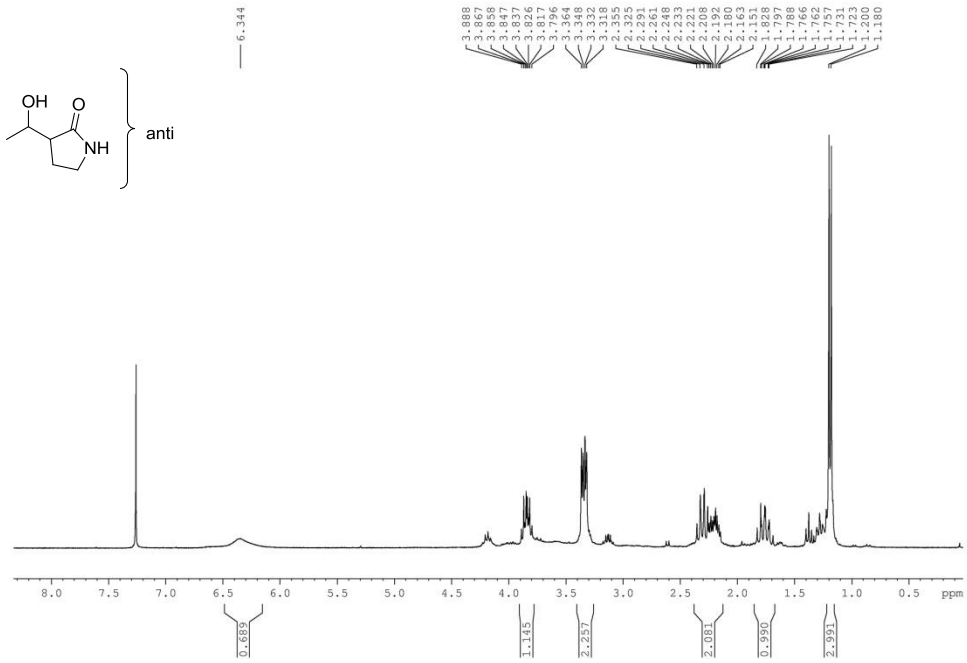
OH
O
O
CN

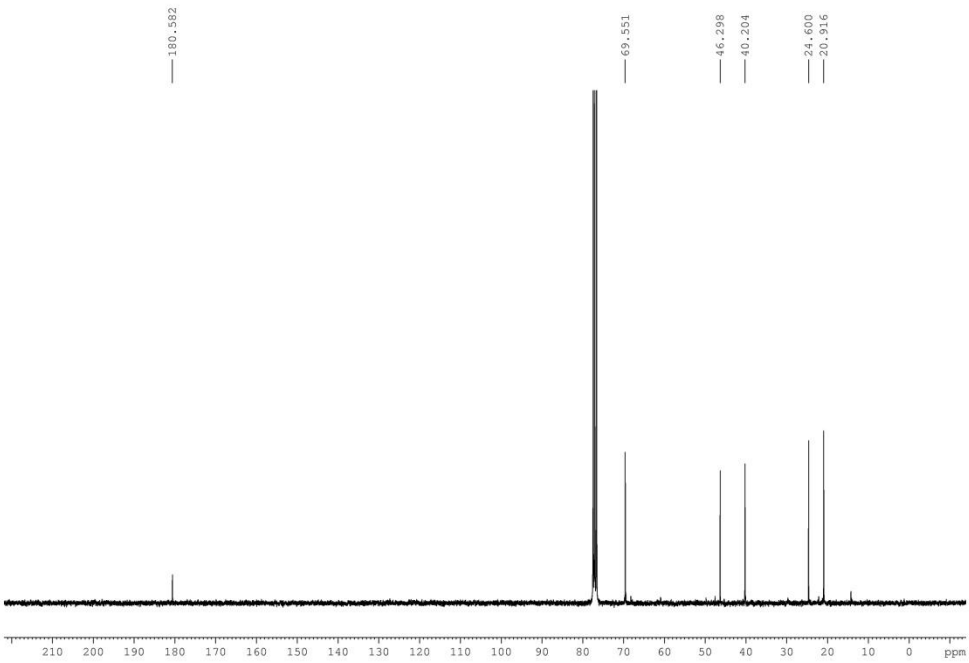

4.072
4.059
4.050
4.038
2.723
2.703
2.695
2.682
2.677
2.664
2.656
1.505
1.290
1.269
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
1.069
3.134
9.059
3.000

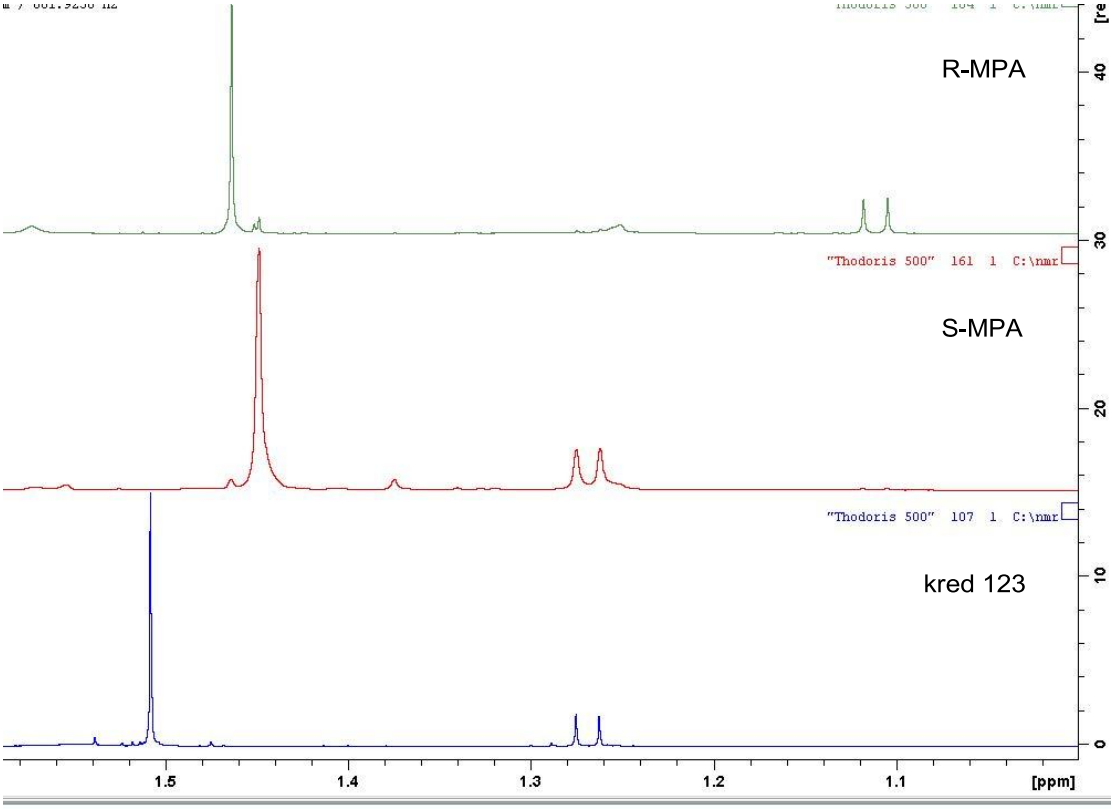

170.862
117.865
83.175
67.440
48.554
28.000
20.758
16.822
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10 -20 ppm


5.049
3.861
3.855
3.849
3.843
3.837
3.830
3.818
3.370
3.359
3.358
3.353
3.351
3.349
3.341
3.339
3.334
3.332
3.330
2.545
2.338
2.320
2.317
2.302
2.299
2.280
2.236
2.229
2.226
2.219
2.211
2.208
2.205
2.201
2.194
2.184
2.159
2.155
2.143
2.140
2.124
1.808
1.789
1.786
1.783
1.770
1.767
1.764
1.761
1.748
1.745
1.742
1.723
1.234
1.222
1.200
1.188
OH
O
NH
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
0.850
0.236
0.828
0.273
0.972
1.293
1.086
0.282
1.011
1.057
0.329
1.351
0.780
3.000

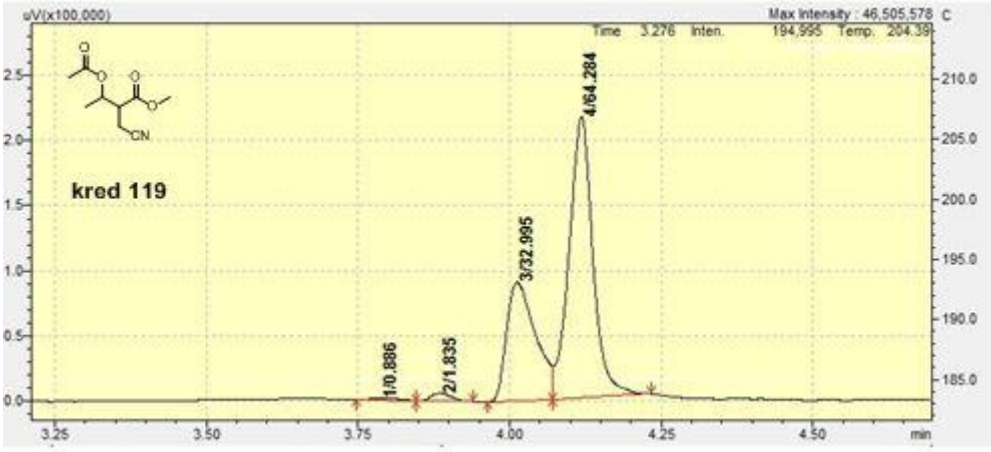

180.600
69.538
46.327
40.228
24.580
20.906
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 ppm


OH
O
NH
anti
6.344
3.888
3.867
3.858
3.847
3.837
3.826
3.817
3.796
3.364
3.348
3.332
3.318
2.355
2.325
2.291
2.261
2.248
2.233
2.221
2.208
2.192
2.180
2.163
2.151
1.828
1.797
1.788
1.766
1.762
1.757
1.731
1.723
1.200
1.180
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
0.689
1.145
2.257
2.081
0.990
2.991

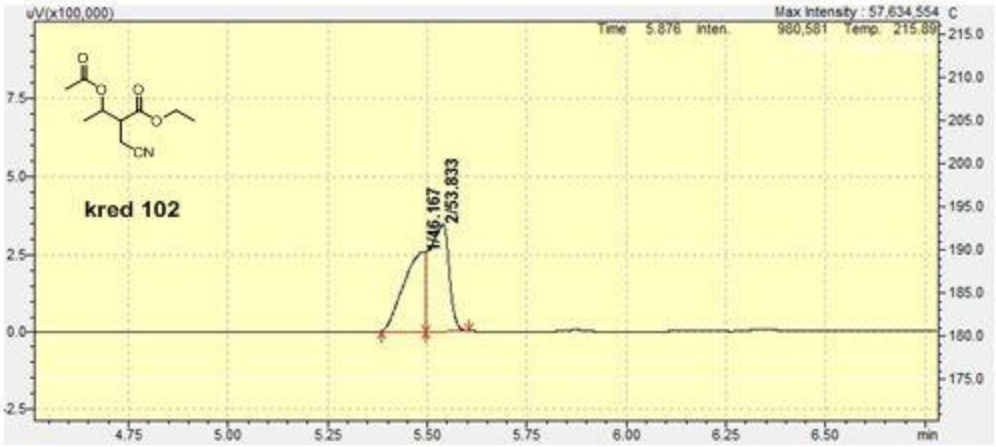

180.582
69.551
46.298
40.204
24.600
20.916
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

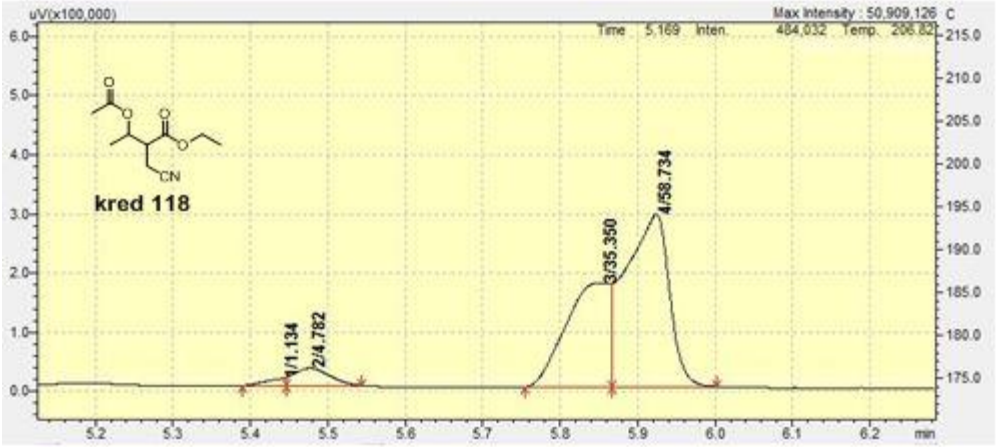

R-MPA
"Thodoris 500" 161 1 C:\nmr
S-MPA
"Thodoris 500" 107 1 C:\nmr
kred 123
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
[ppm]

uV(x100,000)
Max Intensity : 56,632,903 C
Time 3.473 Inten. 221,839 Temp. 207.95
kred 108
1/0.655
2/2.308
3/21.229
4/75.808
min

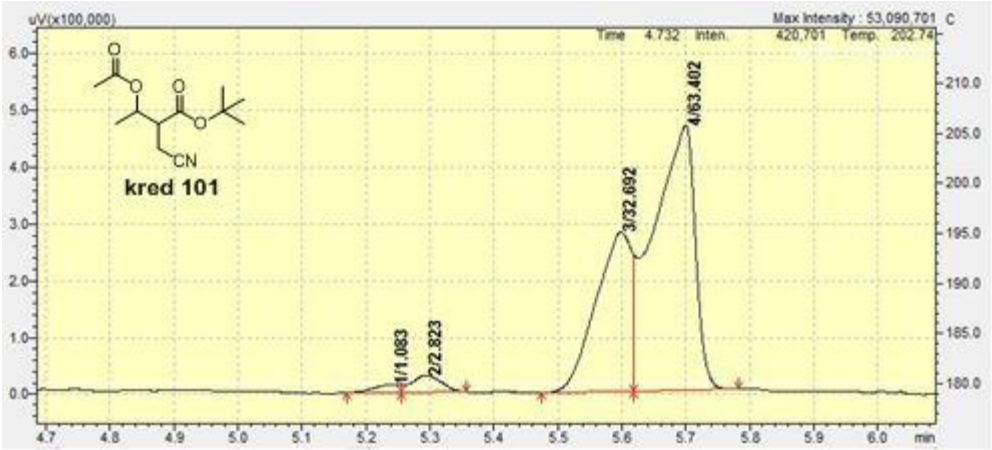

uV(x100,000)
Max Intensity : 46,505,578 C
Time 3.276 Inten. 194,995 Temp. 204.39
kred 119
1/0.886
2/1.835
3/32.995
4/64.284
min

uV(x100,000)
Max Intensity : 44,583,587 C
Time 3.146 Inten. 72,777 Temp. 197.05
kred A1C
1/36.310
2/63.690
min


uV(x100,000)
Max Intensity : 57,634,554 C
Time 5.876 Inten. 980,581 Temp. 215.89
kred 102
1/46.167
2/53.833
min


uV(x100,000)
Max Intensity : 50,909,126 C
Time 5.169 Inten. 484,032 Temp. 206.82
kred 118
1/1.134
2/4.782
3/35.350
4/58.734
min

uV(x100,000)
Max Intensity : 69,099,834 C
Time 4.646 Inten. 48,264 Temp. 184.74
kred 123
1/2.868
2/97.132
min


uV(x100,000)
Max Intensity : 53,090,701 C
Time 4.732 Inten. 420,701 Temp. 202.74
kred 101
1/1.083
2/2.823
3/32.692
4/63.402
min

uV(x100,000)
Max Intensity : 49,213,194 C
Time 4.868 Inten. 133,548 Temp. 211.16
kred 102
1/27.921
2/66.681
3/1.428
4/3.970
min

Βιβλιογραφία

1. Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practise*, Oxford University Press, **2000**.
2. Enthaler, S.; Junge, K.; Beller, M. *Angewandte Chemie International Edition*, **2008**, *47*, 3317.
3. Baratto, L.; Candido, A.; Marzorati, M.; Sagui, F.; Riva, S.; Danieli, B. *J. Mol. Catal.*, **2006**, 39, 3-8.
4. Peterson, D.H.; Murray, H.C.; Eppstein, S.H.; Reineke, L.M.; Weintraub, A.; Meister, P.D.; Leigh, H.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 5933-5936.
5. Woodward, R.B.; Sondheimer, F.; Taub, D.; Heusler, K.; Mclamore, W.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 4223-4251.
6. Roberts, S.M.; Wiletts, A.J *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes Micro-organisms*, 2nd edition, Cambridge University Press, **1995**.
7. Berry, A.; Dodge, T.C.; Pepsin, M.; Weyler, W. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 28, 127.
8. Van de Sandt, E.J.A.X.; de Vroom, E. *Chim. Oggi.* **2000**, 18, 72.
9. Forrest, G.L.; Gonzalez, B. *Chem-Biol. Interact.* **2000**, 129, 21.
10. Bradshaw, C.W.; Fu, H.; Shen, G.J.; Wong, C.H. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1526.
11. Prelog, V.; *Appl. Chem*, **1964**, 9, 119.
12. Liu, W.; Wang, P. *Biotechnol. Adv.* **2007**, 25, 369.
13. Levy, H.R.; Loewus, F.A.; Vennesland, B. *J. Am. Chem. Soc*. **1957**, 79, 2949.
14. Fryszkowska, A.; Peterson, A.J.; Nichola, L.D.; Dewar, C.; Evans, G.; Bycroft, M.; Triggs, N.; Fleming, T.; Gorantla, S.; Hoge, G.; Quirmbach, M.; Timmanna, U.; Poreddy, S.R.; Reddy, N.K.; Dahanukar, H.V.; Holt-Tiffin, K.E. *Org. Process Res. Dev.*, **2016**, 20(8), 1520-1528.
15. Hanson, I.R.; Goldberg, L.S.; Guo Z.; Tully, P.T.; Goswami, A.; Ye, X.; Robl, A.J.; Patel N.R. *Org. Process Res. Dev.*, **2014**, 18, 960-968.
16. Fotsch, C.; Wang, M. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4851.
17. Schnackenberg, C.G. *Curr. Opin. Invest. Dr.* **2008**, 9, 295.
18. Wamil, M.; Seckl, J.R. *Drug Discovery Today*, **2007**, 12, 504.
19. a) Kalaitzakis, D.; Rozzel, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org, Lett.*, **2005**, 7, 4799-4801. b) Kalaitzakis, D.; Rozzel, D.; Smonou, I.; Kambourakis, S. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 1958-1969.
20. Bariotaki, A.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Org, Lett.*, **2012**, 14, 1792-1795.
21. Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Eur. J. Chem.*, **2012**, 43-46.
22. Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Smonou I.; *Tetrahedron: Assymetry*, **2007**, 18, 2418-2426. METHOD OF MAKING (+)-SITOPHILURE. US.Patent application No. 60/75,877, with Biocatalytics, International Publication Number WO 2007/076109 with Biocatalytics.
23. Dale, J.A.; Mosher, H., S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.
24. Trost, B.M.; Belletire, J., L.; Godleski, S.; Mcdougal, P., G.; Balkovec, J., M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370.

25. a) Seco, J.M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev*. **2004**, *104*, 17; b) Latypov, Sh. K.; Seco, J.M.; Quinoa, E.; Riguera R. *J. Org. Chem*. **1996**, *61*, 8569-8577; c) Latypov, Sh.K.; Seco, J., M.; Quinoa, E.; Riguera R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 877-882.
26. a) Hollman F.; Arends I.; Holtman D., *Green Chem.*, **2011**, 13, 2285-2283. b) Musa M.; Phillips S.; *Catal. Sci. Technol.*, **2011**, 1, 1311-1323.
27. Kroutil W.; Mang H.; Eddeger K.; Faber K.; *Curr. Opin, Chem. Biol.*,**2004**, 8, 120-126.
28. a) Li F.; Cui J.; Qian X.; Ren W.; Wabg X.; *Chem. Commun.*, **2006**, 865-867; b) Hiraoka C.; Matsuda M.; Suzuki Y.; Fujieda S.; Tomita M.; Fuhshuku K.; Obata R.; Nishiyama S.; Sugai T.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 3358-3367;
29. a) Manam R.; Macherla R.; Pots M., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 2537-2549, b)Truppo D.; Pollard D.; Devine P., *Org. Lett.*, **2007**, 9, 335-338.
30. Feske D.; Stewart J.; *Tetrahedron: Assymetry* , **2005**, 16, 3124-3127.
31. a) Kalaitzakis D.; Rozzel D.J.; Kambourakis S.; Smonou I., *Org. Lett.* , **2005**, 7, 4799-4801, b) Kalaitzakis, D.; Rozzel, D.; Smonou, I.; Kambourakis, S. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 1958-1969, c) Kalaitzakis, D.; Rozzell D. J.; Kambourakis, S.; Smonou I. , **2006**, 2309-2313, d) Bariotaki, A.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Org, Lett.*, **2012**, 14, 1792-1795.
32. Lavandera I.; Kern a.; Verena R.; Ferreira-Silva B.; Glieder A.; Fabian W.; Wildeman S.; Kroutil W., *Org.Lett.*, **2008**, 11, 2155-2158.
33. Rossman G.; Moras D.; Olsen W., *Nature*, **1974**, 250, 194-199.
34. Scrutton S.; Berry A.; Perham N., *Nature*, **1990**, 343, 38-43.
35. Koumanov A.; Benach J.; Atrian S.; Gonzalez-Duarte R.; Karshikoff A.; Ladenstein R., *Proteins*, 51, 289-288.
36. Benach J.; Atrian S.; Gonzalez-Duarte R.; Ladenstein R., *J. Mol. Biol*, **1999**, 289, 335-355.
37. Oppermann C.; Filling C.; Berndt D.; Persson B.; Benach J.; Ladenstein R.; Jornvall h., *Biochemistry*, **1997**, 36, 34-40.
38. Yamashita A.; Kato H.; Wakatsuki S.; Tomizaki T.; Nakatsu T.; Nakajima K.; Hashimoto T.; Yamada Y.; Oda J., *Biochemistry*, **1999**, 38, 7630-7637.
39. Tietze S.; Apostolakis J., *J. Chem. Inf. Model*, **2007**, 47, 1657-1672.
40. Lavandera I.; Kern a.; Ferreira-Silva B.; Glieder A.; Wildeman S.; Kroutil W., *J. Org. Chem*, **2008**, 73, 6003-6005.
41. Ferreira-Silva B.; Lavandera I.; Kern A.; Faber K.; Kroutil W., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 3410-3414.
42. Ashton M.J.; Hills S.J.; Newton C.G.; Taylor J.B.; Tondu S.C.D., *Heterocycles*, **1989**, 28, 1015-1035.
43. Caroline E.P.; Lavandera I.; Gotor-Fernadez V.; Kroutil W.; *Chem.Cat.Chem.*, **2013**, 5, 3875-3881.
44. Zadlo A.; Schrittwieser H.J.; Koszelewski D.; Kroutil W.; Ostaszewski R., *Eur. J. Org. Chem*, **2016**, 1007-1011.
45. Kedziora K.; Bisogno R.F.; Lavandera I.; Gotor-Fernadez V.; Montejo-Bernardo J.; Garcia-Granda S.; Kroutil W.; Gotor V., *Chem.Cat.Chem.*, **2014**, 6, 1066-1073.
46. Amanda S.; Robert C.S.; Barbara G.; Gabriel C.; Bruno A.C.H.; Leandro S.M.; Kroutil W.; Kappe O.; Rodrigo O.S., *Chem. Cat. Chem*, DOI: 10.1002/cctc.201403023.

47. Kulig J.; Simon C.R.; Rose A.C.; Masoos Husain S.; Haeckh M.; Ludeke S.; Zeitler K.; Kroutil W.; Pohl M.; Rother D., *Catal.Sci.Technol.*, **2012**, 2, 1580-1589.
48. Ninfa, Alexander.; Ballou, David.; Benore, Marilee. *Fundamental laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*., **2010**, Wiley, 164–179.
49. Laemmli, U.K. *Nature*, **1970**, 227(5259), 680-685.
50. Mahmood T.; Chang P.Y.; *N.AM.J.Med.Sci.*, **2012**, 4(9), 429-434.
51. Kulig J.; Frese A.; Wolfgang K.; Pohl M.; Rother D., *Biotechnology and Bioengineering*,**2013**, 110, 7.
52. Gutzeit, H.; Ludwiq-Muller, J. *Plant Natural Products*., **2014**, Wiley.
53. Meragelman, T.; Scudiero, A.D.; Davis, R.E.; Staudt, M.L.; McCloud, G.T.; Cardellina H.J.; Shoemaker R. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72,336-339.
54. Toribio, A.; Bonfils, A.; Delannay, E.; Prost, E.; Harakat, D.; Henon, E.; Richard, B.; Litaudon, M.; Nuzillard, J.M.; Renault, J.H. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3825-3828.
55. Davies-Coleman, M.T.; Rivett, D.E.A. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **1989**, 55, 1-35.
56. Calvelheiro, A.J.; Yoshida, M. *Phytochemistry*, **2000**, 53, 811-819.
57. Buck, S.B.; Harduin C.; Ichikawa, S.; Soenen D.R.; Gauss, C.M.; Hwang, I.; Swingle, M.R.; Bonness, K.M.; Honkanen, R.E.; Boger, D.L. *J. Am. Chem. Soc.*¸ **2003**, 125, 15694-15695.
58. Sen, R.; Baltimore, D. *Cell*, **1986**, 46(5), 705-716.
59. Karin, M.; Greten, F.R. *Nat. Rev.Immunol.***, 2005**, 5(10), 749-759.
60. Baldwin, A.S. *Annu. Rev. Immunol.*, **1996**, 14, 649-683.
61. Mohapatra, K.D.; Pragna, P.D.; Reddy, D.S.; Yadav, S.J. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 5941-5944.
62. Reddy, D.K.; Shekar, V.; Prabhakar, P.; Chinna Babu, B.; Siddhardha. B.; Murthy, U.S.N.; Venkateswarlu, Y. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, **2010**, 45, 4657-4663.
63. Reddipalli, G.; Venkataiah, M.; Fadnavis, W.N. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 320-324.
64. a) Allais, F.; Aouhansou, M.; Majira, A.; Ducrot, P.H. *Synthesis*, **2010**, 16, 2787-2793, b) Boese, D.; Fernadez, E.; Pietruszka, J. *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 3643-3469, c) Goswami, A.; Saikia, P.P.; Saikia, B.; Chaturvedi, D.; Barua, C.N. *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 5133-5135, d) Das, B.; Srinivas, Y.; Sudhaker, C.; Reddy, R.P. *Helvetica Chimica Acta, **2011**, 94*, 1290-1294, e) Cross, F.; Pelotier, B.; Piva, O. *Eur. J. Org. Chem.*, ***2010***, 5063-5070.
65. Markou, C. *Master Thesis*, **2012**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
66. Mohapatra, K.D.; Reddy, D.S.; Ramaiah, M.J.; Ghosh, S.; Pothula, V,; Lunavath, S.; Thomas, S.; Valli, S.N.C.V.L.P.; Pal Bahdra, M.; Yadav, S.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 1389-1396.
67. Nodwell, B.M.; Menz, H.; Kirsch, S.F.; Sieber, S.A. *Chem. Bio. Chem.*, DOI: 10.1002/cbic.201200265.
68. Anderson, W.G.; Halvstadt, I.F.; Miller, H.W.; Roblin, R.O. *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 2197.
69. Bennet, F.; Knight, W.D.; Fenton, G. *J. Chem. Soc*., 1, **1991**, 133-139.
70. Hamana, H.; Sugasawa, T. *Chem. Lett.*, **1985**, 921.
71. Blaise, E. *Compt. Rend.* **1901**, 132, 478.
72. Lee, S.A.; Lin, L. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 8803-8806.
73. Stergiou, A. *Master thesis*, **2013**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

74. Hall, M.; Bommarius, S.A. *Chem. Rev.*, ***2011***, 111, 4088-4110.
75. Baldwin, E.J.; Lowe, C.; Schofield, J.C.; Lee, E. *Tetrhedron Lett.*, **1986**, 27, 3461-3464.
76. Boyd, B.D.; Elzey, K.T.; Hatfield, D.L.; Kinnick, D.M.; Morin Jr., M.J. *Tetrahedron Lett.* ***1986***, 27, 3453-3456.
77. Boyd, B.D.; Foster, J.B.; Hatfield, D.L.; Hornback, J.W.; Jones, D.N.; Munroe, E.J.; Swartzendruber, K.J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3457-3460.
78. a) Casiraghi, G.; Zanardi, F.; Battistini, L.; Rassu, G. *Synlett*, **2009**, 1525; b) Casiraghi, G.; Zanardi, F. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 1929; c) Nicolaou, C.K.; Dalby, M.S.; Majumder, U. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 14942.
79. Krawczyk, H.; Albrecht, L.; Wojciechowski, J.; Wolf, M.W.; Krajewska, U.; Rozalski, M. *Tetrhedron*, **2008**, 64, 6307-6314.
80. Liu, D.; Yu, X .; Huang, L. *Chin. J. Chem*., **2013**, 31¸ 344-348.
81. Cook, H.J.; Barzya, J.; Brennan, C.; Lowe, D.; Wang, Y.; Redman, A.; Scott, J.W.; Wood, E.J. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 1525-1528.
82. Fishwick, C.W.G.; Foster, J.R.; Carr E.R. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 3915-3918.
83. Pinza, M.; Farina, C.; Cerri, A.; Pfeiffer, U.; Riccaboni, T.M.; Banfi, S.; Biagetti, R.; Pozzi, O.; Magnani, M.; Dorigotti, L. *J. Med. Chem.*, **1993**, 4214-4220.
84. Caruano, J.; Muccioli, G.C.; Robiette, R. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 10123.
85. Jackowski, O.; Wang, J.; Xie, X.; Ayad, T.; Zhang, Z.; Ratovelomanna-Vidal, V. *Org. Lett.*, **2012**, 14, 4006-4009.
86. Yang, Y.; Dong, S.; Liu, X.; Lin, L.; Feng, X. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 5040-5042.
87. Corey, E.J.; Ensley, H.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97(23), 6908-6909.
88. Langlois, N.; Dahuron, N.; Wang, H. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 15117.
89. a) Felluga, F.; Gombac, V.; Pitacco, G.; Valentin, E. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 1341; b) Muralidhar, V.R.; Chirumamilla, R.R.; Ramachadran, N.V.; Marchant, R.; Nigam, P. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **2001**, 66/3a, 227; c) Chenevert, R.; Desjardins, M. *Can. J. Chem.*, **1994**, 72, 2312; d) Jouglet, B.; Rousseau, G. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34(14), 2307-2310.
90. Banerjee, S.; Smith, J.; Smith J.; Faulkner, C.; Masterson, D. *J. Org. Chem.*, **2012**, 77 (23), 10925-10930.
91. Noyori, R.; Ohkuma, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 40-73.
92. Kalaitzakis, D. *PhD Thesis*, **2006**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
93. Gomez, S.; Peters, A.J.; Maschmeyer, T. *Adv. Synth. Catal.*, **2002**, 344, 1037-1057.
94. Kukula, P.; Studer, M.; Blaser, H.U. *Adv. Synth. Catal.*, **2004**, 346, 1487-1493.
95. Willis, J.N.; Fischer, A.C.; Alder, M.C.; Harsanyi, A.; Shukla, L.; Adams, J.; Sandford, G. *Green Chem.*, **2016**, 18, 1313-1318.
96. Secrist, A.J.; Logue, W.M. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37(2), 335-336.
97. Reddy, P.A.; Hsiang, C.H.B.; Latifi, N.T.; Hill, W.M.; Rothman, M.S.; Ferrendelli, A.J.; Covey, F.D.; Woodward, E.K. *J. Med.Chem.*, **1996**, 39, 1898-1906.
    Caddick, S.; Haynes, K.A.; Judd, B.D.; Williams, V.R.M. *Tetrhedron Lett.*, **2000**, 41, 3513-3516.