

Diss. ETH Nr. 13552

**Synthese unterschiedlich markierter  
Oligomerer der  
3-Hydroxybuttersäure  
mit dem Ziel von  
Strukturbestimmungen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

PETER WASER

Dipl. Natw. ETH

geboren am 9. Oktober 1961 in Zürich

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. Dieter Seebach, Referent

Prof. Dr. Peter Walde, Korreferent

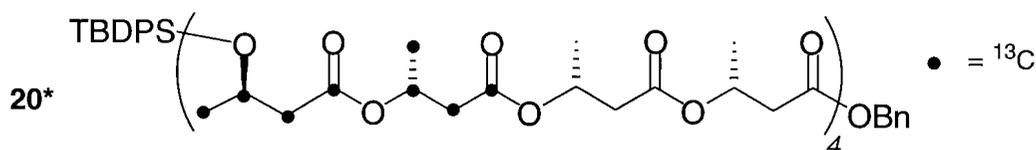
Zürich, Januar 2000

## ZUSAMMENFASSUNG

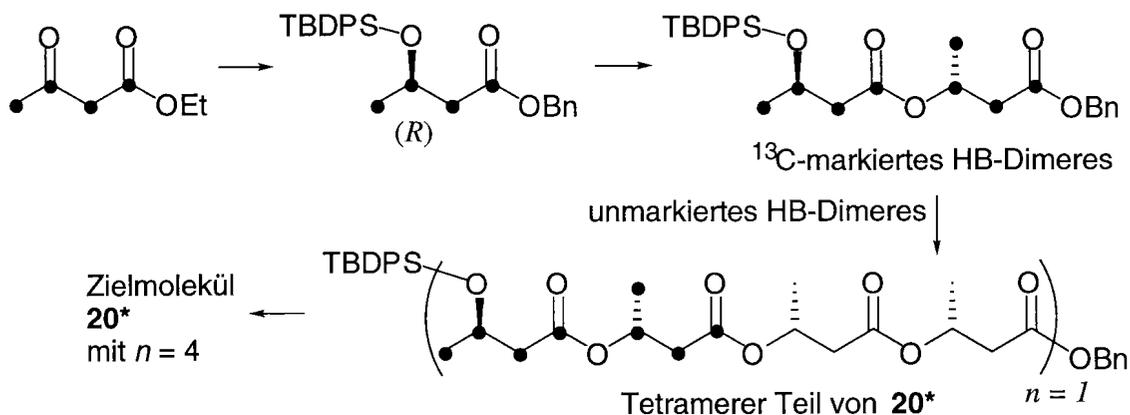
Die Festkörper-Struktur des Polymeren der (*R*)-3-Hydroxybuttersäure (3-HB) ist seit bald einem Vierteljahrhundert bekannt. Dieses Biopolymere *PHB* ist wegen seiner Bioabbaubarkeit und wegen seinen zu Polypropylen ähnlichen Stoff-Eigenschaften von Interesse und kann biotechnologisch in Bakteriengranulen akkumuliert werden. Oligomere von 3-HB und auch das Biopolymere (ca. 60'000 Monomereinheiten) liegen als amorphe Festkörper vor. Die *PHB*-Festkörperstruktur konnte nur mittels aus Röntgen-Faser-Beugungsdaten durchgeführten Energie-Minimierungsrechnungen als eine linksgängige  $2_1$ -Helix mit Ganghöhe von 6.1 Ångström bestimmt werden.

Mittels Hydrolyseversuchen wurde eine Form von *PHB* auch in Zellmembranen verschiedener Mikroorganismen nachgewiesen. Dort liegt *PHB* komplexiert mit Calcium-Ionen und Polyphosphat PP vor. Ein in Membranen rekonstituierter *PHB*/Ca<sup>2+</sup>/PP-Komplex war in der Lage, Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch die Membran durchzulassen und zeigte ein typisches elektrophysiologisches Kanalverhalten. Ein Modell eines solchen *PHB*-Membrankanals benutzt die Idee eines aus sieben  $2_1$ -Helices geformten Komplexes.

Um die Struktur des *PHB*-Ionenkanals besser diskutieren zu können, musste mehr über die Struktur von *PHB* in Lösung bekannt werden. Da *PHB* offensichtlich in Phospholipid-Membranen und weiter (nur) in chlorierten organischen Lösungsmitteln löslich ist, war eine Bestimmung der Lösungsstruktur mittels NMR-Methoden angezeigt. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sind beinahe alle Signale der gleichartigen Protonen von 3-HB-Oligomeren isochron. Damit 2D-NMR-Methoden angewendet werden konnten (Messungen von NOE-Intensitäten und Kopplungskonstanten), wurde ein speziell <sup>13</sup>C-markiertes Oligomer der 3-HB hergestellt. Es wurde das TBDPS-Ether- und Benzylester-geschützte 16-mer **20\*** der 3-HB synthetisiert, das hinsichtlich einer Dimereinheit alternierend <sup>13</sup>C- resp. unmarkiert ist:

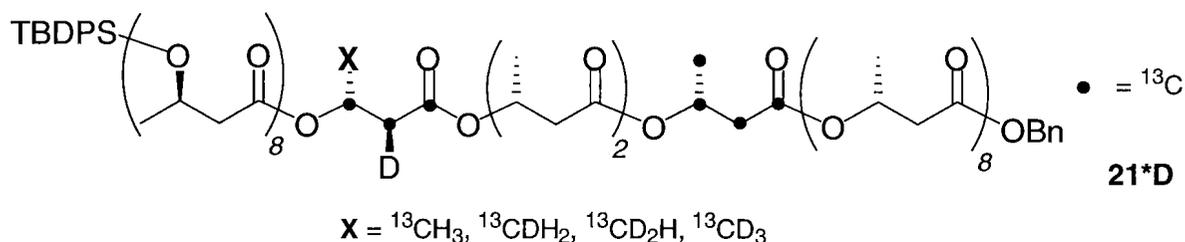


Die dem Oligomer **20\*** zugrunde liegende <sup>13</sup>C-markierte C<sub>4</sub>-Einheit wurde aus dem käuflichen und  $\geq 99\%$  mit <sup>13</sup>C-markierten  $\beta$ -Ketobuttersäureethylester hergestellt. Nach mit hoher Enantioselektivität erfolgter Reduktion der 3-Ketogruppe mit einem Ru-BINAP-Katalysator wurde der 3-Hydroxyester mit orthogonalen Schutzgruppen versehen und mit einer zweiten <sup>13</sup>C-markierten 3-HB-Einheit gekuppelt. Die <sup>13</sup>C-markierte dimere HB-Kette wurde mit dem unmarkierten HB-Dimeren zur tetrameren Teilstruktur verlängert. Nach zwei Zyklen des Segmentkupplungsverfahrens wurden mehr als ein Gramm des 16-mers **20\*** erhalten.



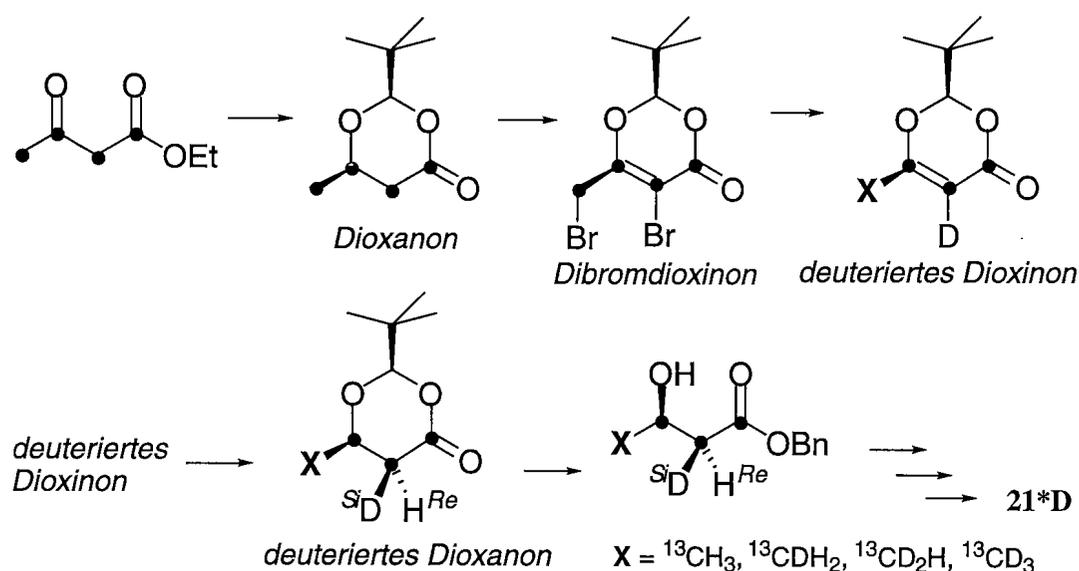
Die von *Schwalbe et al.* durchgeführten 2D-NMR-Untersuchungen des 16-mers  $20^*$  ergaben keine eindeutige Aussage über dessen 3D-Struktur. Viele Kreuzsignale konnten nicht aufgelöst werden. Eine Aussage über die 3D-Struktur in Lösung war nur durch Vergleich der erhaltenen NOE-Verhältnisse mit den für eine  $2_1$ - resp.  $3_1$ -Helix errechneten möglich. Die Struktur in Lösung entspricht laut NMR-Analyse eher einer  $3_1$ -Helix als einer  $2_1$ -Helix. Nicht überraschend ist, dass die 16-mer-Kette in der Kettenmitte eine höhere Ordnung aufweist als an den Kettenenden.

Um die NOE-Signale besser zuordnen zu können, wurde ein 3-HB-Oligomer hergestellt, das im mittleren Kettenbereich neben  $^{13}\text{C}$ - auch Deuterium-Markierung aufweist. Das für die noch durchzuführenden NMR-Untersuchungen synthetisierte 20-mer  $21^*\text{D}$  enthält zwei  $^{13}\text{C}$ -markierte HB-Einheiten, wovon die eine HB-Einheit zusätzlich an der  $^{13}\text{C}(2)$ -HB-Position ein Deuteriumatom enthält und an der  $^{13}\text{C}(4)$ -HB-Position ebenfalls deuteriert ist. Spezielle NMR-Untersuchungen der deuterierten Dioxanon-Zwischenstufe ergaben, dass der Deuterierungsgrad an der erwähnten  $^{13}\text{C}(4)$ -Position nicht wie gewünscht eins ist. Die hergestellte Substanz (Zielmolekül  $21^*\text{D}$ ) ist bezüglich Deuterium ein Isotopomerengemisch:

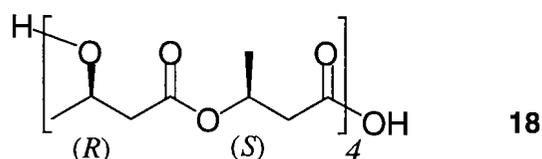


Aus dem käuflichen  $\beta$ -Ketoester wurde nach enantioselektiver Reduktion das  $^{13}\text{C}$ -markierte Dioxanon hergestellt, das in drei Reaktionsschritten deuteriert wurde. Die NBS-Bromierung des Dioxanons ergab ein Gemisch verschieden bromierter Dioxinone. Das mittels mehrfacher Säulenchromatographie isolierte Dibromdioxinon wurde mit  $\text{D}_2$  zum deuterierten Dioxinon umgesetzt und anschliessend die Doppelbindung hydriert. Die *tert*-Butylgruppe des deuterierten Dioxinons ist für die 60 zu 6-Selektivität der Hydrierung verantwortlich. An

$^{13}\text{C}(2)$  wurde mittels NMR-Analysen eine saubere Deuterierung festgestellt. Mittels einem "inverse-gated"  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimentes wurde folgende Verteilung der verschiedenen deuterierten Methylgruppen festgestellt: 29%  $^{13}\text{C}(4)\text{H}_3$ , 33%  $^{13}\text{C}(4)\text{DH}_2$ , 21%  $^{13}\text{C}(4)\text{D}_2\text{H}$  und 17%  $^{13}\text{C}(4)\text{D}_3$ . Der durchschnittliche Deuterierungsgrad an  $^{13}\text{C}(4)$  betrug somit 42% anstelle des gewünschten von 33%. Die Verteilung der Molekül-Ionen aus dem MALDI-Massenspektrum bestätigte dieses Resultat. Der aus dem deuterierten Dioxanon erhaltene 3-HB-Benzylester wurde nach dem Segmentkupplungsverfahren als Baustein für den Kettenaufbau des 20-mers  $21^*\text{D}$  verwendet. Es wurden schliesslich 0.7 Gramm des Zielmoleküls  $21^*\text{D}$  für NMR-Untersuchungen erhalten.



Das in Bakterien-Granulen akkumulierte *PHB* muss für den eigenen Energiestoffwechsel zugänglich sein und somit mit zelleigenen Enzymen auf- und abgebaut werden. Bakterien sind auch in der Lage, *PHB* bereits lysierter Zellen mit Depolymerasen abzubauen. Um den kinetischen Abbau von *PHB* der *Alcaligenes faecalis*-Depolymerase studieren und die Stereo- sowie die Substratspezifität dieses Enzyms beschreiben zu können, wurde das syndiotaktische 3-HB-Oligomer **18** hergestellt. Das Syntheseprinzip für die Herstellung von **18** ist das Segmentkupplungsverfahren. Die Resultate dieser in einer anderen Doktorarbeit beschriebenen Enzymstudie sind zusammengefasst.



Die Festkörper-Struktur des Octamers **18** wurde von einer anderen Arbeitsgruppe mit Hilfe von Energie-Minimierungsrechnungen mit Pulverdiffraktionsdaten gelöst. Syndiotaktische *PHB*-Ketten sind linksgängige  $2_1$ -Helices mit Ganghöhe 7.69 Ångström.

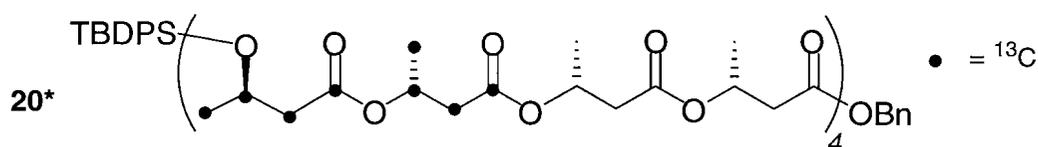


## SUMMARY

The solid phase structure of the polymer of (R)-3-hydroxybutanoic acid (3-HB) has been known for a quarter of a century. This biopolymer called *PHB* is of interest because of its biodegradability and its properties that are similar to polypropylene. *PHB* is accumulated in bacterial inclusion bodies and can be produced biotechnologically in high quantities. Oligomers of 3-HB and the biopolymer itself (60,000 monomeric units) are amorphous solids. Therefore its solid phase structure could only be solved by means of energy optimization calculations with data that were available from powder diffraction. The result was a left-handed  $2_1$ -helix with 6.1 Å pitch.

Hydrolysis experiments indicated the existence of *PHB* in cell membranes of different microorganisms. There *PHB* is complexed with calcium ions and polyphosphate PP. When incorporated into bilayer vesicles, this three-component complex was shown to have calcium channel activity and gave typical signal characteristics of protein  $\text{Ca}^{2+}$  channels. A model of such a *PHB* membrane complex consists of a protein-barrel like complex composed of seven  $2_1$  helices.

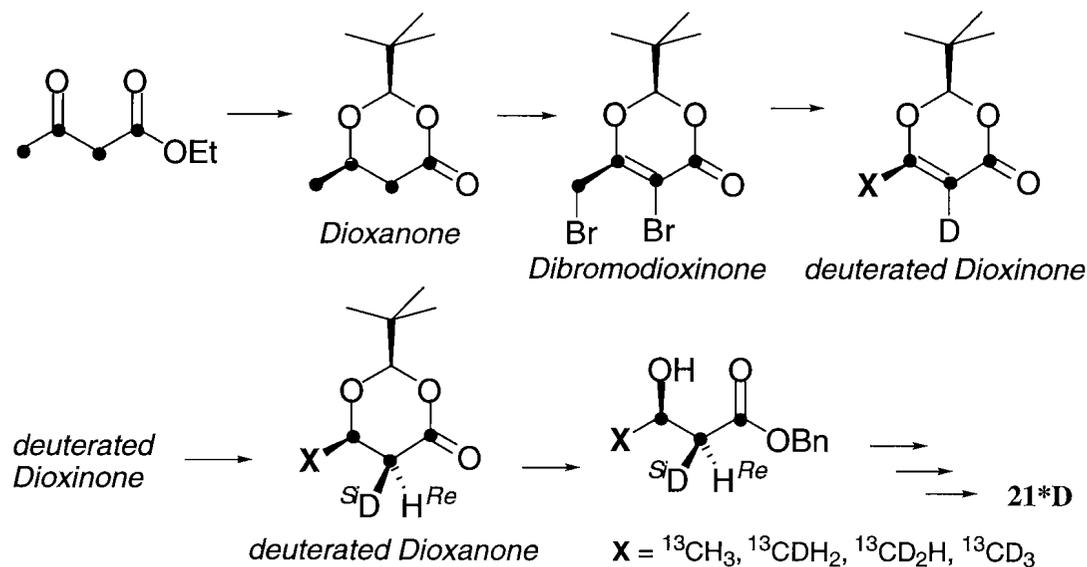
In order to be able to discuss the *PHB*-channel in deeper detail, knowledge of the solution structure of *PHB* is of great importance. Because of the insolubility of *PHB* in most organic solvents except for chlorinated methanes and phospholipids the determination of the solution structure could be done with NMR methods. The  $^1\text{H}$ -NMR spectra of 3-HB oligomers only show isochrone signals for each type of proton. In order to determine NOE-intensities and coupling constants with 2D NMR methodology a specially  $^{13}\text{C}$ -labelled 3-HB oligomer was synthesized. This TBDPS-ether- and benzyl ester protected 16-mer  $20^*$  consists of a repetitive tetrameric unit of which the first two HB-units are  $^{13}\text{C}$ -labelled:



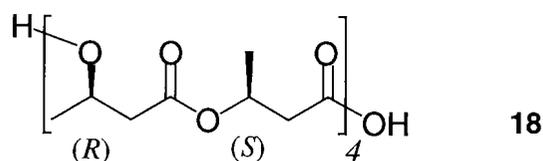
The two  $\text{C}_4$ -units of the  $^{13}\text{C}$ -labelled 3-HB-dimers of  $20^*$  were synthesized from the available  $^{13}\text{C}$ -labelled ethyl acetoacetate. Highly enantioselective reduction of the 3-keto group with a Ru-BINAP-catalyst and subsequent protection of the two functional groups with orthogonal protecting groups gave the 3-HB monomer from which the  $^{13}\text{C}$ -labelled dimer was synthesized. The  $^{13}\text{C}$ -labelled dimer was elongated with the unlabelled 3-HB dimer to the tetrameric substructure. After two coupling cycles more than one gram of the 16-mer  $20^*$  was isolated.



The 3-HB benzyl ester obtained from the deuterated dioxanone was used as a building block for the synthesis of the 20-mer **21\*D** according to the segment-coupling method. Finally 0.7 grams of the target molecule **21\*D** were obtained for NMR studies.



Because *PHB* is available for the bacteria's own metabolism biosynthesis and degradation must be catalyzed by its own enzymes. Different bacteria are able to degrade *PHB* from lyzed cells with depolymerases. In order to study the kinetic properties of *PHB* by *Alcaligenes faecalis* depolymerase and to describe the stereo- and substrate specificity of this enzyme the *syndiotactic* 3-HB octamer **18** was synthesized. The principle of the syntheses of **18** is the established segment-coupling method. The enzyme studies have been reported in another thesis work. The results are summarized.



The solid state structure of 3-HB octamer **18** was solved by another group. The methods used were powder diffraction and energy minimization calculations. *Syndiotactic PHB* chains are left-handed  $2_1$  helics with 7.69 Å pitch.

