

Biotransformationen von Farnesylpyrophosphat-Analoga durch Sesquiterpencyclasen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

von

Clara Mareike Oberhauser, M. Sc.

2018

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Korreferent: PD Dr. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 19. Oktober 2018

Für Johanna

Du hast mich gefordert und inspiriert, warst Vorbild und Freundin.

Kurzzusammenfassung

Clara M. Oberhauser

Biotransformationen von Farnesylpyrophosphat-Analoga durch Sesquiterpencyclasen

Schlagwörter:

Sesquiterpene, Chemoenzymatik, Biokatalyse, Substratspezifität, rekombinante Enzyme

Terpene bilden mit mehr als 80 000 bekannten Verbindungen die größte Klasse sekundärer Naturstoffe. Trotz ihrer strukturellen Vielfalt, lassen sie sich anhand ihres aus Isopreneinheiten bestehenden Grundgerüsts zu einer Naturstoffklasse zusammenfassen, dessen Ursprung in den gemeinsamen biosynthetischen Bausteinen Isopentenylpyrophosphat and Dimethylallylpyrophosphat begründet ist. Ihre Kondensation führt zu den linearen Vorläufern Geranyl-, Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat, welche mit Hilfe von Terpencyclasen zu Terpenen umgesetzt werden. Diese Enzyme haben die faszinierende Eigenschaft die schlichten, linearen Vorläufer der Terpene in nur einem Schritt stereoselektiv in vielfältige und komplexe, zum Teil mehrzyklische Produkte zu verwandeln. Indem die gewöhnlichen Substrate der Terpencyclasen durch synthetisch zugängliche Pyrophosphate ersetzt werden, kann ihr Potential genutzt werden, um neue, strukturvariierende Terpenoide zu erhalten, die anschließend für die semisynthetische Produktion von entsprechenden Wirk- und Duftstoffen eingesetzt werden können.

Da die Biotransformation unnatürlicher Farnesylpyrophosphat-Derivate durch Sesquiterpencyclasen bisher kaum erforscht wurde, konzentriert sich diese Arbeit auf die Untersuchung der Substratspezifität dieser Enzyme sowie auf die Identifizierung der Produkte dieser Biotransformationen. Dafür wurden acht Sesquiterpencyclasen pflanzlichen, bakteriellen und fungalen Ursprungs, welche höchst diverse Zyklisierungsprodukte mit unterschiedlich starker Produktpromiskuität bilden, heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Zudem wurden Schwefelfunktionalisierte Farnesylpyrophosphat-Derivate synthetisiert, welche neben weiteren Analoga, mit anderen Heteroatomfunktionalisierungen oder abweichenden Methylierungsmustern, als Substrate für die rekombinanten Sesquiterpencyclasen getestet und bewertet wurden. Dabei wurden die meisten Farnesylpyrophosphat-Derivate als Substrate akzeptiert und zahlreiche neue, bisher unbekannte Terpenoide erzeugt. Zur Identifizierung dieser Produkte erfolgte ein Upscaling dieser Biotransformationen mit Anpassung der Reaktionsbedingungen. Die präparativen Biotransformationen von drei ether- und thioetherfunktionalisierten Pyrophosphaten führten zur Bildung neuer 11-gliedriger Makrozyklen.

Abschließend wurden mehrere Mutanten der Sesquiterpencyclasen erzeugt, welche Rückschlüsse hinsichtlich des Einflusses ausgewählter Aminosäuren auf das Produktspektrum und die Substrattoleranz zulassen könnten. Mit diesen Mutanten erfolgten bereits erste Biotransformationen von Farnesylpyrophosphat und eines etherfunktionalisierten Derivats, welche zum Teil veränderte Produktspektren aufwiesen.

Abstract

Clara M. Oberhauser

Biotransformations of farnesyl pyrophosphate analogues by sesquiterpene cyclases

Keywords:

Sesquiterpenes, chemoenzymatic, biocatalysis, substrate specificity, recombinant enzymes

With more than 80 000 known compounds, terpenes form the largest group of natural products. They are comprised of repeating isoprene units, which are derived from the biosynthetic building blocks isopentenyl pyrophosphate and dimethylallyl pyrophosphate. Their condensation leads to the linear terpene precursors geranyl, farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate, which are further transformed by terpene cyclases. These enzymes have the intriguing ability to transform the plain linear precursors of terpenes into diverse and complex polycyclic products with defined stereocenters in a single step. There is great potential for accessing novel and diverse terpene derivatives by replacing the ordinary substrates of terpene cyclases with analogous synthetically prepared pyrophosphates. Conceptually, this strategy offers a straightforward, selective and direct means to generate new terpene-like backbones; and could be used to accelerate the production of related medicinal compounds and fragrances through a semisynthetic approach.

Since the biotransformation of unnatural farnesyl pyrophosphate derivatives by sesquiterpene cyclases has hardly been investigated, this work focusses on the substrate specificity of these enzymes and the identification of products from these biotransformations. Therefore, eight sesquiterpene cyclases from bacteria, plant and fungi, which produce highly diverse compounds with different product promiscuity, were heterologously expressed in *E. coli* and purified by immobilized metal affinity chromatography. Sulfur-functionalized farnesyl pyrophosphate derivatives were synthesized and, as well as other analogues with heteroatoms or an altered pattern of methylation, applied and evaluated as substrates for the recombinant sesquiterpene cyclases. Most of the synthetic pyrophosphates were accepted as enzymatic substrates and lead to the formation of multiple novel and so far unknown terpenoids. To identify the products, the conditions were adjusted according to the upscaling of the biotransformations. After preparative biotransformations, three ether and thioether functionalized pyrophosphates were found to yield novel 11-membered cyclic terpene derivatives.

Additionally, several mutants of the sesquiterpene cyclases were prepared, which subsequently might support conclusions on the influence of selected amino acids on the product spectrum and the substrate tolerance. These mutants were already applied in first biotransformation tests with farnesyl pyrophosphate and an ether functionalized derivative, in some cases resulting in an altered product spectrum.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Buchstabencodes und Nummerierung der Aminosäuren	4
1 Einleitung	5
1.1 Terpene	5
1.2 Biosynthese von DMAPP und IPP	7
1.3 Terpenyclasen	9
1.3.1 Trichodiensynthase Tri5	12
1.3.2 Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2	14
1.3.3 Cubebolsynthase Cop4	15
1.3.4 Pentalenensynthase PenA	16
1.3.5 <i>Epi</i> -Isozizaensynthase Cyc1	18
1.3.6 (+)-Caryolan-1-ol-Synthase GcoA	20
1.3.7 Vetispiradiensynthase Hvs1	21
1.3.8 Sesquiterpenyclase Tps32	22
1.4 Biotransformation von unnatürlichen Substraten	23
1.4.1 Enzymatische Biotransformationen	23
1.4.2 Biotransformationen durch Terpenyclasen mit unnatürlichen Substraten	25
2 Zielsetzung	29
2.1 Herstellung von katalytisch aktiven Terpenyclasen	30
2.2 Synthese von Farnesyl-Derivaten	32
2.3 Untersuchung der Substratakzeptanz und Identifizierung neuer Terpeniode	32
3 Ergebnisse und Diskussion	33
3.1 Herstellung und Reinigung der Sesquiterpenyclasen	33
3.1.1 Klonierungsarbeiten	33
3.1.2 Heterologe Expression der Sesquiterpenyclasengene in <i>E. coli</i>	34
3.1.3 Proteinreinigung mittels Metallchelatchromatographie	36
3.2 Analytische <i>In Vitro</i> Enzymtests mit Farnesylpyrophosphat	39
3.2.1 Aktivität von Terpenyclasen	39
3.2.2 Koinjektionsexperimente mit Tps32 und Hvs1	42
3.2.3 Optimierungsexperimente mit Tps32, GcoA und Cop4	42
3.3 Synthese von Farnesylpyrophosphat-Derivaten	46
3.3.1 Darstellung von thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivaten	46
3.3.2 Synthese der Pyrophosphate	49
3.4 Akzeptanz von allylischen Pyrophosphaten mit zusätzlichen Heteroatomen	51
3.4.1 Analytische Enzymtests mit den etherfunktionalisierten Derivaten 155a und 155b	52
3.4.2 Analytische Enzymtests mit den thioetherfunktionalisierten Derivaten 155b und 156b	57
3.4.3 Analytische Enzymtests mit den aminofunktionalisierten Derivaten 155c und 156c	61
3.5 Akzeptanz von Pyrophosphaten mit alternativem Methylierungsmuster oder Doppelbindungsmodifikationen	63
3.5.1 Analytische <i>in vitro</i> Enzymtests mit Pyrophosphat 201	64
3.5.2 Analytische <i>in vitro</i> Enzymtests mit den Pyrophosphaten 202-205	67
3.5.3 Analytische <i>In vitro</i> Enzymtests mit <i>E,Z</i> -FPP	71
	VI

3.6	Semipräparative Biotransformationen und Produktcharakterisierung	73
3.6.1	Vorarbeiten	73
3.6.2	Batchprozesse mit Tps32	75
3.6.3	Biotransformation mit kontinuierlicher Substratzugabe	78
3.6.4	Olfaktorische Analyse ausgewählter Sesquiterpenoide	85
3.7	Substratazeptanz von Sesquiterpencyclasen und Entstehung unnatürlicher Terpenoide	87
3.8	Einfluss von Aminosäuren auf das Produktspektrum und die Substratazeptanz	95
3.8.1	Bioinformatische Analyse der Sesquiterpencyclasen	95
3.8.2	Erstellung von Mutanten	98
3.8.3	Analytische Enzymtests	99
4	Zusammenfassung und Ausblick	105
4.1	Zusammenfassung	105
4.2	Ausblick	108
5	Experimenteller Teil	111
5.1	Allgemeine Hinweise	111
5.2	Analytik der chemisch- und biosynthetischen Arbeiten	115
5.3	Chemische Synthese	119
5.4	Mikrobiologische Methoden	127
5.5	Molekularbiologische Methoden	128
5.6	Proteinbiochemische Methoden	133
5.7	Analytische <i>in vitro</i> Enzymtests	136
5.8	Präparative Biotransformationen	139
6	Literaturverzeichnis	147
7	Anhang	151
7.1	Gen- und Proteinsequenzen	151
7.2	Primersequenzen	154
7.3	Ausgewählte Massenspektren von Biotransformationsprodukten	155
7.4	Ausgewählte NMR-Spektren	186

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintri-phosphat
Bot2	Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase aus <i>Botrytis cinerea</i>
bp	Basenpaare
ca.	circa
CAPS	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
Cop4	Sesquiterpencyclase aus <i>Coprinus cinereus</i>
COSY	Korrelationsspektroskopie (engl. <i>correlation spectroscopy</i>)
CTP	Cytidintri-phosphat
CY	Zyklisierung (engl. <i>cyclization</i>)
Cyc1	<i>EpI</i> -Isozizaensynthase aus <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
DC	Dünnschichtchromatographie
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DME	Ethylenglycoldimethylether
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxy ribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation
EIZS	<i>EpI</i> -Isozizaensynthase (alternative Bezeichnung für Cyc1) aus <i>S. coelicolor</i> A3(2)
<i>et al.</i>	Und andere (lat. <i>et alii</i>)
EtOAc	Ethylacetat
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavonmononukleotid
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
FPP	Farnesylpyrophosphat (sofern nicht anders gekennzeichnet ist das <i>E,E</i> -Isomer gemeint)
GC	Gaschromatographie
GcoA	(+)-Caryolan-1-ol-Synthase aus <i>Streptomyces griseus</i>
GFPP	Geranylarnesylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
H ⁺ ~	Protonenshift
H~	Hydridshift
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
6 \times His	Hexahistidin
HMBC	engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (engl. <i>high-resolution mass spectrometry</i>)

Abkürzung	Bedeutung
HSQC	engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hvs1	Vetispiradiensynthase aus <i>Hyoscamus muticus</i>
Hz	Hertz
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPP	Isopropylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iso	isothermal
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
LV	Leervektor (Vektor ohne insertiertes Gen)
M	Molar
M	Marker (bei Gelelektrophorese)
mbar	Millibar
Me	Methyl
Me ⁻	Methylshift
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeONa	Natriummethanolat
MEP	Methylerythritolphosphat
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
m/v	Masse pro Volumen
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilazid
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
negK	Negativkontrolle
ng	Nanogram
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOE	nuklearer Overhauser-Effekt
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda=600$
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Petrolether (Sdp. 40-60 °C)
PenA	Pentalenensynthase aus <i>Streptomyces exfoliatus</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazine- <i>N,N</i> -bis(2-ethansulfonsäure)

Abkürzung	Bedeutung
posK	Positivkontrolle
PPase	Pyrophosphatase
ppm	Teile pro Million (engl. <i>parts per million</i>), $1 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6}$
quant.	quantitativ
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
Sdp.	Siedepunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
STC(n)	Sesquiterpencyclase(n)
TAE	TRIS Acetat EDTA
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
t-BuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEAS	5- <i>Epi</i> -Aristolochin-Synthase aus <i>Nicotiana tabacum</i>
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenchromatogram
Tps32	Sesquiterpencyclase aus <i>Solanum lycopersicum</i>
Tri5	Trichodiensynthase aus <i>Fusarium sporotrichioides</i>
t _R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	atomare Masseneinheit (engl. <i>unified atomic mass unit</i>)
U	Enzymeinheit (engl. <i>enzyme unit</i>)
UPLC	engl. <i>ultra performance liquid chromatography</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung
VIS	sichtbares Licht (engl. <i>visible light</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WM	WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung
Wt	Wildtyp
%	Prozent
°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
×g	-fache Gravitationskraft
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
®	registrierte Warenmarke
™	unregistrierte Warenmarke (engl. <i>unregistered trade mark</i>)

BUCHSTABENCODES UND NUMMERIERUNG DER AMINOSÄUREN

Zur Beschreibung der Sesquiterpencyclasen und ihrer Mutanten wurden meist Aminosäuren im Einbuchstabencode verwendet (Tabelle 1). Dabei beschreibt D100 eine Asparaginsäure an Position 100, wobei Position 1 der ersten, N-terminalen Aminosäure im natürlichen Protein entspricht. Die in dieser Arbeit verwendeten Positionsnummern für rekombinante Proteine sind identisch mit der Nummerierung im natürlichen Protein, so dass Position 1 nicht der ersten, N-terminalen Aminosäure des Proteins entspricht, sondern der ersten Aminosäure der Sesquiterpencyclasen-Sequenz.

Die bei der Beschreibung der erstellten Mutanten verwendeten Bezeichnungen sind entsprechend dem folgenden Beispiel zu verstehen: D100E = Asparaginsäure (D) an Position 100 wurde im Mutanten durch Glutaminsäure (E) substituiert.

Zudem ist anzumerken, dass es sich bei einem Ausdruck wie C6 nicht um eine Aminosäure, sondern stets um ein Kohlenstoffatom (an Position 6) handelt, da Cysteinreste in dieser Arbeit nicht diskutiert werden.

Tabelle 1: Ein- und Dreibuchstabencode von Aminosäuren.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminoäure	Xaa	X

1 EINLEITUNG

1.1 Terpene

Der Begriff Terpen leitet sich von Terpentin ab und bezeichnet mit derzeit mehr als 80 000 bekannten Verbindungen die größte Klasse sekundärer Naturstoffe. Darunter befinden sich sowohl kleine Verbindungen wie Duft- und Geschmacksstoffe, als auch größere, bioaktive Verbindungen, Steroide und Vitamine. Vertreter diese Klasse sind hauptsächlich für den Geruch, den Geschmack oder die pharmakologische Wirkung von Pflanzen bzw. Pflanzenbestandteilen wie Kräutern, Blüten, Zitrusfrüchten, Nadelbäumen oder Wurzeln. Bekannte Beispiele sind (+)- α -Pinen (1), der Hauptbestandteil des Kiefernöls Terpentins, (-)-Zingiberen (2), welches in größeren Mengen in Ingweröl zu finden ist, sowie α -Ionon (3), der Hauptgeruchsträger der Veilchen (Abbildung 1).^[1-3]

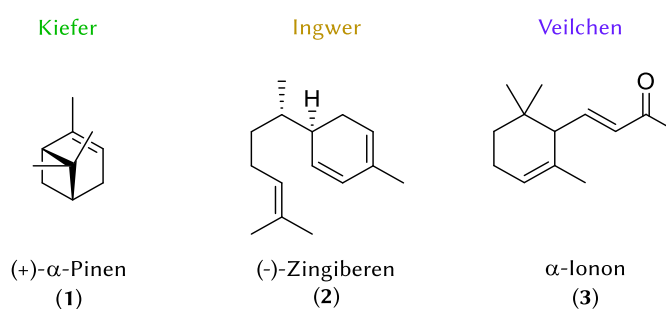


Abbildung 1: Terpene, die zum Geruch oder Geschmack ihrer natürlichen Quelle beitragen.^[1,3]

Die Extraktion dieser Terpene dient der Gewinnung von essentiellen Ölen, welche zur Zubereitung von Parfümen, als Geschmacksstoffe in Nahrungsmitteln oder zur Herstellung von Phytopharmaka dienen. In den natürlichen Quellen, die neben Pflanzen auch Pilze, Bakterien und Insekten umfassen, dienen Terpene meist als Signalstoffe, Wachstumsregulatoren oder Pheromone. Insbesondere Pflanzen nutzen auch bittere oder toxische Terpene zur Abwehr von Fressfeinden, während ihre Blüten flüchtige Terpene absondern, um Insekten anzulocken.^[1,4] Terpene sind zwar chemisch und strukturell höchst divers, jedoch lassen sie sich als Naturstoffe, welche aus Isoprenoideinheiten aufgebaut sind, zusammenfassen und werden daher auch als Isoprenoide bezeichnet (Abbildung 2).^[1,2]

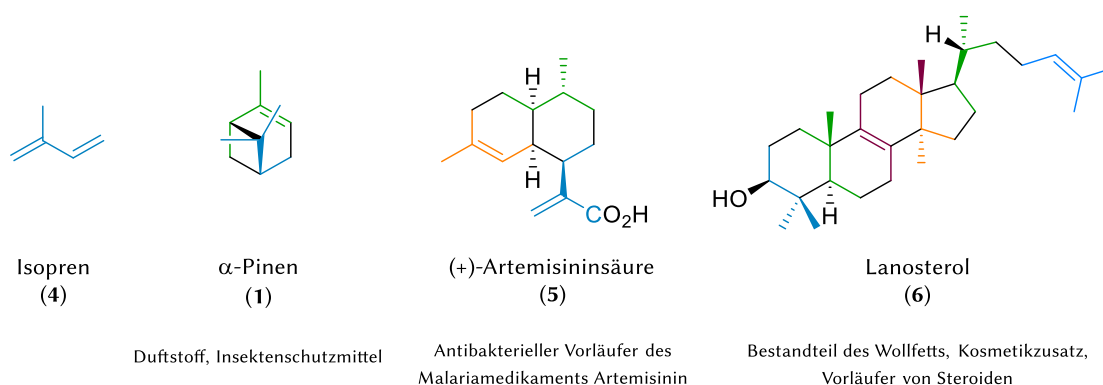


Abbildung 2: Terpene und Terpenoide mit farblich markierten Isoprenoideinheiten.^[1]

Nachdem der deutsche Chemiker OTTO WALLACH diese Einheiten identifiziert hatte^[5], formulierte der Nobelpreisträger LEOPOLD RUŽIČKA 1953 die biogenetische Isoprenregel und beschrieb lineare, allylische Pyrophosphate wie Geranylpyrophosphat (GPP, 7) und Farnesylpyrophosphat (FPP, 8) als

direkte Vorläufer der Terpene, deren Grundgerüst daher im Terpenoid wiederzufinden ist. Bei einigen isoprenoiden Verbindungen wie Lanosterol (6) kommt es in der Biosynthese durch Methylshifts oder WAGNER-MEERWEIN-Umlagerungen jedoch zu einer Veränderung dieses Isoprenmusters, so dass dieses nicht direkt erkennbar ist.^[6] Unabhängig davon, werden Terpene anhand der Anzahl der Isopreneinheiten in verschiedene Klassen unterteilt, welche aus einem oder mehreren der C₅-Bausteine bestehen (Abbildung 3).^[1]

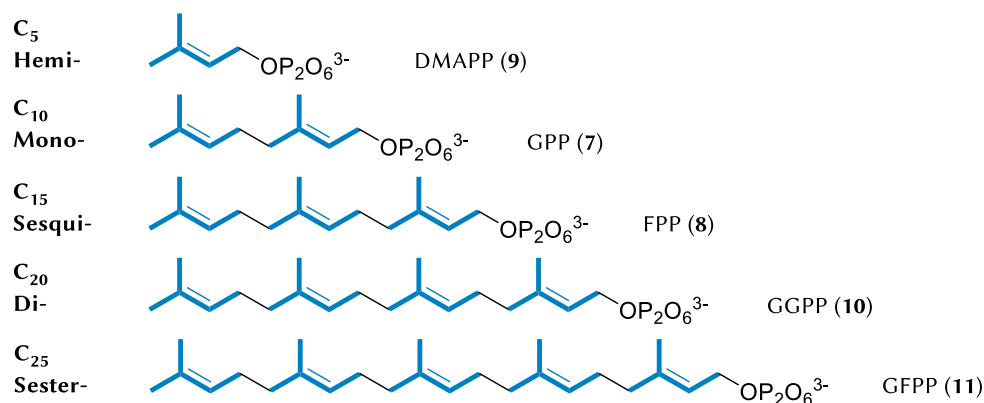


Abbildung 3: Die Vorläufer der Terpene bestehen aus C₅-Bausteinen (blau markiert). Größere Verbindungen werden daher als Verknüpfung kleinerer Einheiten beschrieben (G = Geranyl, F = Farnesyl, PP = Pyrophosphat).^[1]

Diese Isopreneinheiten werden in der Natur durch Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, 9) und Isopentenylpyrophosphat (IPP, 10) repräsentiert (Abbildung 4), wobei das Dimethyl-Ende als Kopf und das Ethylpyrophosphat als Schwanz bezeichnet wird. Um Vorläufer für Mono-, Sesqui-, Di- und Sesterterpene zu bilden, wird die Kopf-Schwanz-Verknüpfung von IPP und DMAPP von Prenyltransferasen katalysiert. Zur Entstehung größerer Terpene werden die Vorläufer GPP oder FPP über Schwanz-Schwanz-Verknüpfung verbunden.^[1,2]

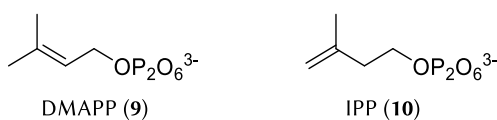
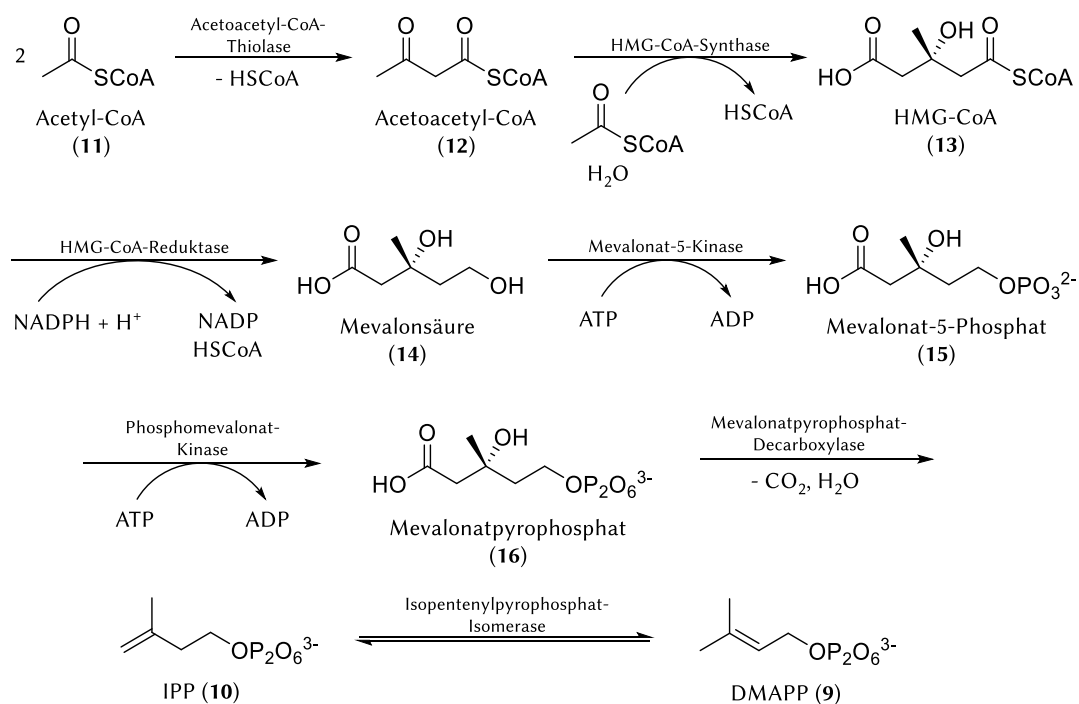


Abbildung 4: Grundbausteine der Terpene.

1.2 Biosynthese von DMAPP und IPP

Die isomeren Hemiterpene IPP (10) und DMAPP (9) werden überwiegend durch den cytosolischen Mevalonat-Weg hergestellt. In Pflanzen, grünen Algen und vielen Bakterien kann ihre Biosynthese zusätzlich über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) in Plastiden, wie z. B. den Chloroplasten, erfolgen.^[7] In Archaea wurde der Mevalonat-Weg zudem mit geringen Modifizierungen bei der Phosphorylierung und Decarboxylierung nachgewiesen.^[8]

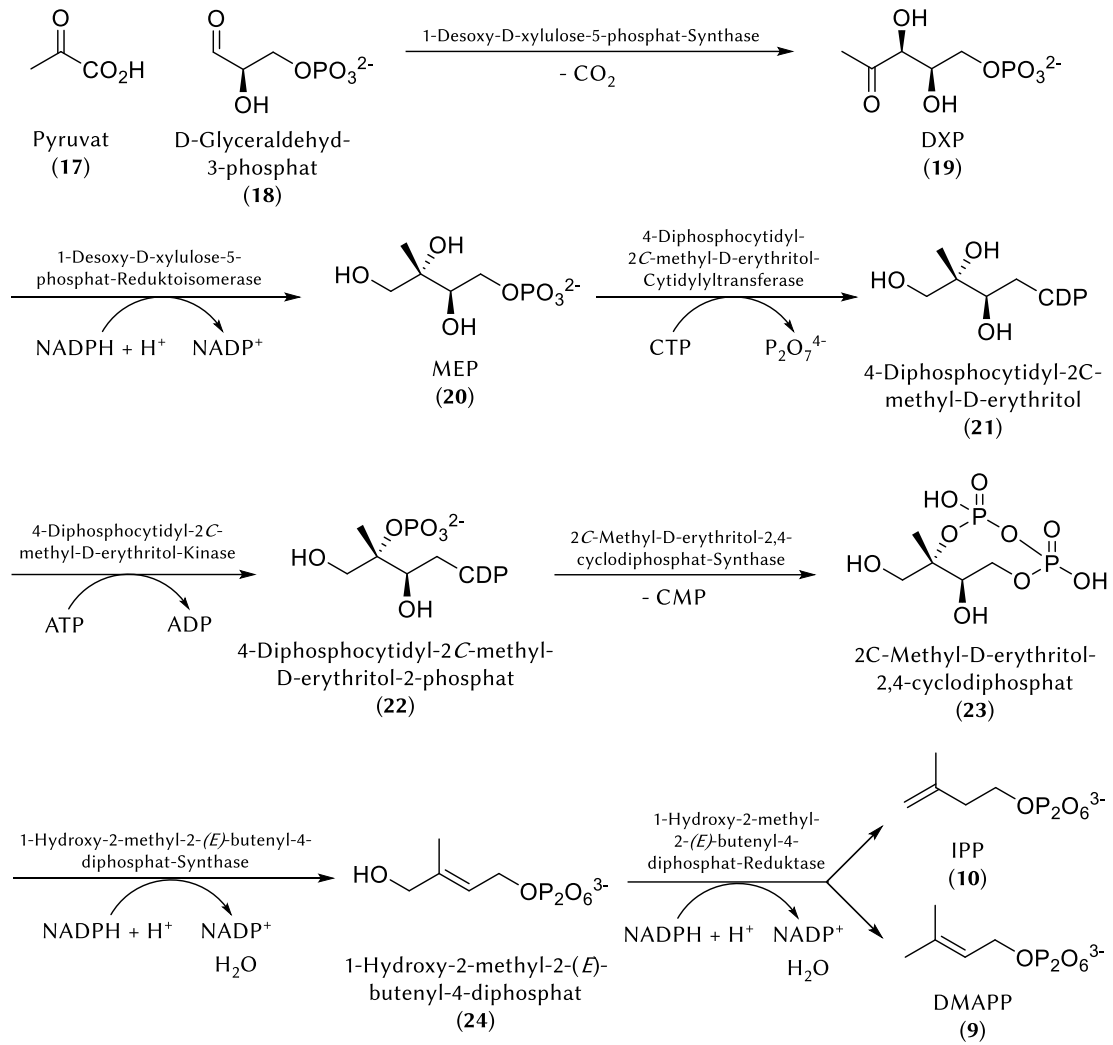
Der Mevalonat-Weg (Schema 1) beginnt mit der CLAISEN-Kondensation von zwei Acetyl-CoA (11), welche aus dem Fettsäurestoffwechsel stammen. Es folgen die Aldolreaktion mit einer dritten Acetyl-CoA-Einheit, die Hydrolyse des Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, 13) sowie die Reduktion mit NADPH zur namensgebenden Mevalonsäure (14). Anschließend kommt es zur ATP-abhängigen, sequentiellen Phosphorylierung durch Kinasen am primären Alkohol zu Mevalonatpyrophosphat (16). Die finale Decarboxylierung ermöglicht daraufhin die Eliminierung von Wasser und führt zur Bildung von IPP (10). Dieses kann durch eine Isomerase in DMAPP (9) umgewandelt werden.



Schema 1: Mevalonat-Weg.

Der MEP-Weg, auch 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg (DXP-Weg) genannt, beginnt hingegen mit den zwei Glykolyseprodukten Pyruvat (17) und D-Glyceraldehyd-3-phosphat (18) (Schema 2). Mit Hilfe der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase und Thiaminpyrophosphat als Cofaktor kondensieren die Ausgangsverbindungen 17 und 18 zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP, 19). Anschließend erfolgt eine Umlagerung über Retroaldol/Aldol-Reaktion mit einhergehender Reduktion zu 2C-Methyl-D-erythriol-4-phosphat (MEP, 20), bevor die Phosphatgruppe mit Cytidinmonophosphat (CMP) verknüpft wird. Es folgen die Phosphorylierung des tertiären Alkohols 21 durch ATP und eine Zyklisierung über die Phosphatester zum Cyclodiphosphat 23, wobei CMP abgespalten wird. Die anschließende Ringöffnung geht mit einer Eliminierung von Wasser einher, so dass lediglich eine letzte Reduktion nötig ist, um IPP (10) und DMAPP (9) zu bilden.^[1,9]

Einleitung



Schema 2: Methylerythritolphosphat-Weg.

1.3 Terpencyclasen

Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft und ihrer biosynthetischen Bedeutung bleibt bei der Betrachtung von Terpencyclasen die Erwähnung von Prenyltransferasen nicht aus. Zudem wurden viele Funktionsweisen von Terpencyclasen aus Studien zur sogenannten FPP-Synthase, der Prenyltransferase, die Farnesylpyrophosphat (FPP, **8**) bildet, abgeleitet.^[10] Prenyltransferasen katalysieren prozessiv die Kopf-Schwanz-Kondensation von IPP (**10**) und DMAPP (**9**), wobei mehrere Kettenverlängerungsschritte durch Kondensation mit IPP erfolgen können. Dabei sorgen aromatische Aminosäurereste in der aktiven Tasche dafür, dass die Kettenverlängerung nur bis zur gewünschten Länge erfolgt. Klasse-I-Terpenyclasen nutzen die von Prenyltransferasen gebildeten linearen, allylischen Isoprenylpyrophosphate, wie z. B. FPP, und transformieren diese über carbokationische Zyklisierungskaskaden in Terpene, die mehrzyklisch sein und mehrere Stereozentren aufweisen können. Die strukturelle Homologie zwischen Prenyltransferasen und Klasse-I-Terpenyclasen, welche Mono-, Sesqui- und einige Diterpenyclasen umfassen, weist auf eine divergente Entwicklung von einem gemeinsamen Vorfahren hin. Trotz fehlender Sequenzähnlichkeit ist die aktive Tasche beider Enzymklassen im Zentrum eines α -helikalen Bündels lokalisiert und besitzt zwei Metall-Bindemotive (Abbildung 5). Klasse-I-Terpenyclasen komplexieren drei Mg-Ionen über zwei Asparaginsäurereste der aspartatreichen Sequenz DDXXD auf Helix D sowie über das sogenannte NSE/DTE-Motiv auf Helix H mit der Konsensussequenz (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE¹. Mit Hilfe dieser Metall-Bindedomänen erfolgt die Bindung und Ausrichtung der Substrate anhand ihres Pyrophosphatrestes sowie die Schließung der aktiven Tasche. Im Gegensatz dazu befindet sich das aktive Zentrum von Klasse-II-Terpenyclasen, die z. B. als Triterpenyclasen für die Biosynthese von größeren Terpenen, wie Steroiden und Vitaminen zuständig sind, an der Schnittstelle zwischen zwei α -helikalen Domänen. Dort befinden sich keine Metall-Bindemotive, da die Substrate von Klasse-II-Terpenyclasen keinen Pyrophosphatrest besitzen.^[2,11-13]

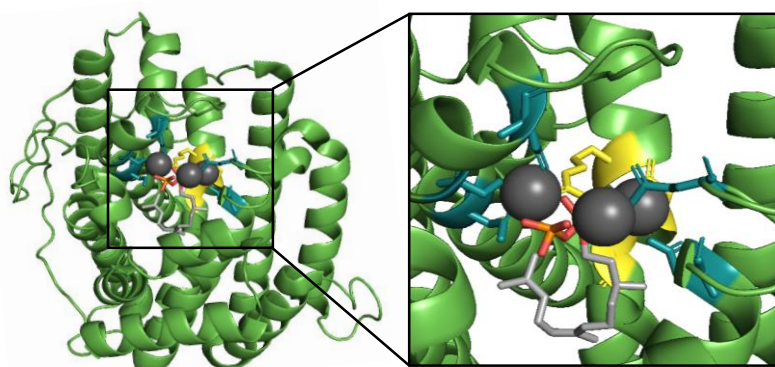


Abbildung 5: Kristallstruktur der Selinadiensynthase in der geschlossenen Konformation mit gebundenen Mg-Ionen (dunkelgrau) und Substrat (grau, Pyrophosphat: rot/orange). Farblich hervorgehoben sind die Metallbindedomänen (blau) und die Effektortriade (gelb).^[14]

Die Struktur und der Mechanismus von Klasse-I-Terpenyclasen, werden im Folgenden anhand von Sesquiterpenyclasen (STCn), die im Fokus dieser Arbeit stehen, näher betrachtet. Die Bindung des Substrats mit einhergehender Schließung der Enzymtasche erfolgt über einen Induced-Fit-Mechanismus. Die Konformationsänderung bewirkt die aktive Abspaltung des Pyrophosphats. Dabei bildet Arginin meist mit Glycin und Asparaginsäure eine konservierte Effektortriade im Bereich des

¹ Fett markierte Aminosäuren binden die Metallliganden.

Helixbruchmotivs der Helix G, bzw. Helix H bei pflanzlichen Terpencyclasen. Der Pyrophosphatsensor Arginin reorientiert sich bei der Substratbindung und bildet zwei Wasserstoffbrücken zum Pyrophosphatrest aus. Zeitgleich kommt es zu einer Drehung der Helix sowie eines Linkers, welcher eine Wasserstoffbrücke zum Arginin ausbildet. Neben Asparaginsäure handelt es sich bei dem Linker auch oft um Threonin, Asparagin oder Serin. Die Konformationsänderung der Helix G1 bewirkt eine Verschiebung des Effektors Glycin, dessen katalytisch aktiver Carbonylsauerstoff mit den freien Elektronenpaaren direkt auf die C3-Position von FPP (8) ausgerichtet ist. Wechselwirkungen zwischen dem π^* -Orbital der C2-C3-Doppelbindung und dem freien Elektronenpaar des Carbonylsauerstoffs bewirken eine Abspaltung des Pyrophosphats.^[14]

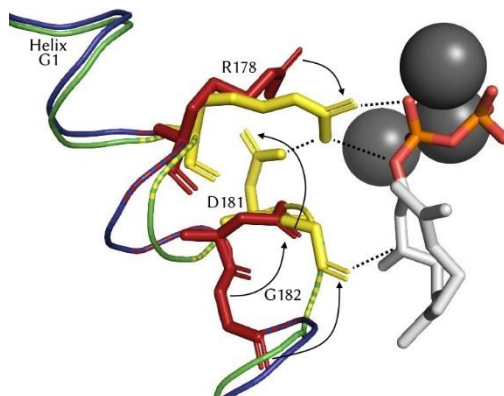
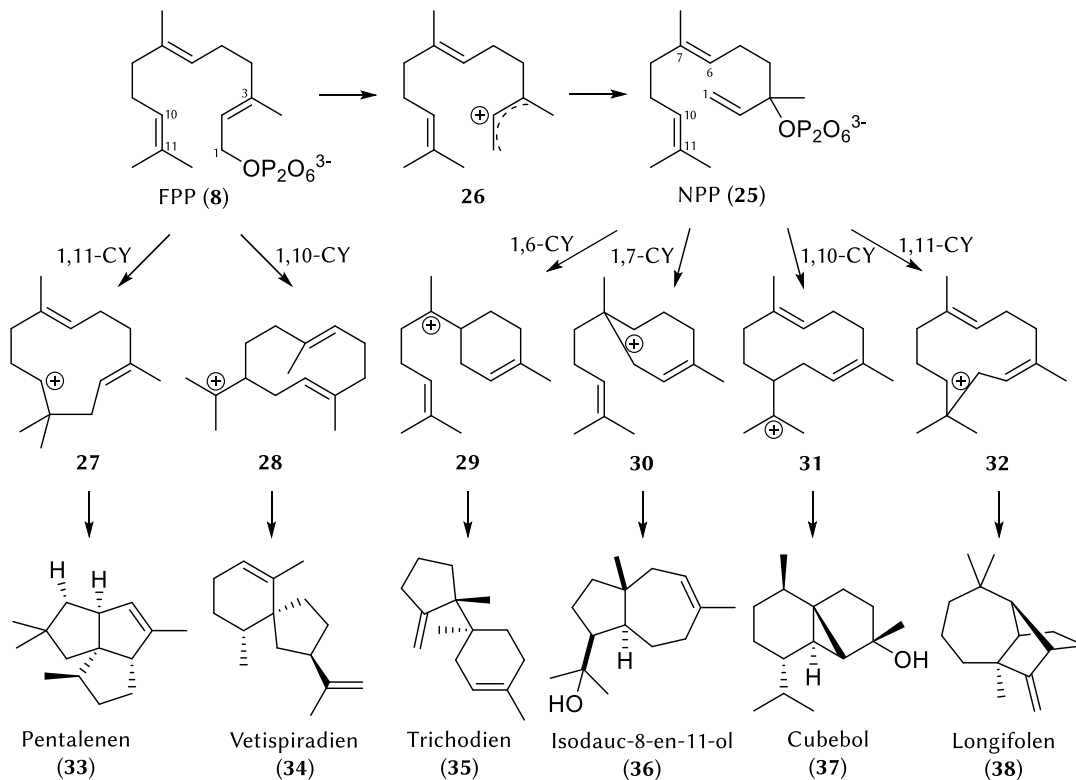


Abbildung 6: Bei Substratbindung erfolgt ein Induced-Fit-Mechanismus von der offenen (blau, 4OKM) zur geschlossenen Konformation (grün, 4OKZ) mit Konformationsänderung der G1-Helix und des Helixbruchmotiv. Die Darstellung wurde anhand der Kristallstrukturen der Selinadiensynthase in apo-Konformation sowie in geschlossener Konformation als Komplex mit Mg-Ionen (dunkelgrau) und 2,3-Dihydro-FPP (grau, Pyrophosphat: rot/orange) angefertigt.^[14] Die Effektortriade ist rot bzw. gelb markiert. Ihre Konformationsänderung wurde mit Hilfe von Pfeilen angezeigt und ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien).

Das dabei generierte Farnesylykation durchläuft eine Zyklisierungskaskade mit einer Vielzahl an carbokationischen und neutralen Intermediaten. Bei der ersten Zyklisierung kann FPP bzw. das transoide Farnesylykation eine 1,10- oder eine 1,11-Zyklisierung durchlaufen (Schema 3). Alternativ kann eine Isomerisierung der C2-C3-Doppelbindung zum cisoiden Nerolidylpyrophosphat (NPP, 25) erfolgen. Dieses kann neben der 1,10- oder 1,11-Zyklisierung auch eine 1,6- oder eine 1,7-Zyklisierung absolvieren. Anschließend können weitere Angriffe von Doppelbindungen auf Kationen, Hydrid- und Methylshifts sowie WAGNER-MEERWEIN-Umlagerungen erfolgen. Die in der Enzymtasche befindlichen hydrophoben und aromatischen Aminosäurereste konturieren dabei das aktive Zentrum und stabilisieren, z. B. durch Kation- π -Interaktionen, carbokationische Intermediate. Ihre voluminösen Orbitale lassen meist nur Raum für die korrekte Faltung der Intermediate. Demzufolge werden besonders große Enzymtaschen mit promiskuen Enzymen in Verbindung gebracht, da sie unterschiedliche Faltungen der carbokationischen Intermediate erlauben.^[2,11,14,15]

Die Zyklisierungskaskade endet für gewöhnlich mit einer Deprotonierung, um eine Doppelbindung zu generieren, oder durch Addition von Wasser an das Carbokation. Der Nachweis von aktiven Basen, welche diese und andere Deprotonierungen katalysieren können, ist trotz umfangreicher Mutagenesestudien bisher nicht gelungen. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass das anorganische Pyrophosphat oder eine Asparaginsäure aus dem Metallbinde-Motiv als aktive Base fungiert.^[11,16]



Schema 3: Die erste Zyklisierung (CY) von FPP kann über verschiedene Positionen erfolgen. In manchen Fällen kommt es jedoch zuerst zur Isomerisierung der C2-C3-Doppelbindung zu NPP (25), welches weitere Zyklisierungsmöglichkeiten bietet. [15,17,18-22]

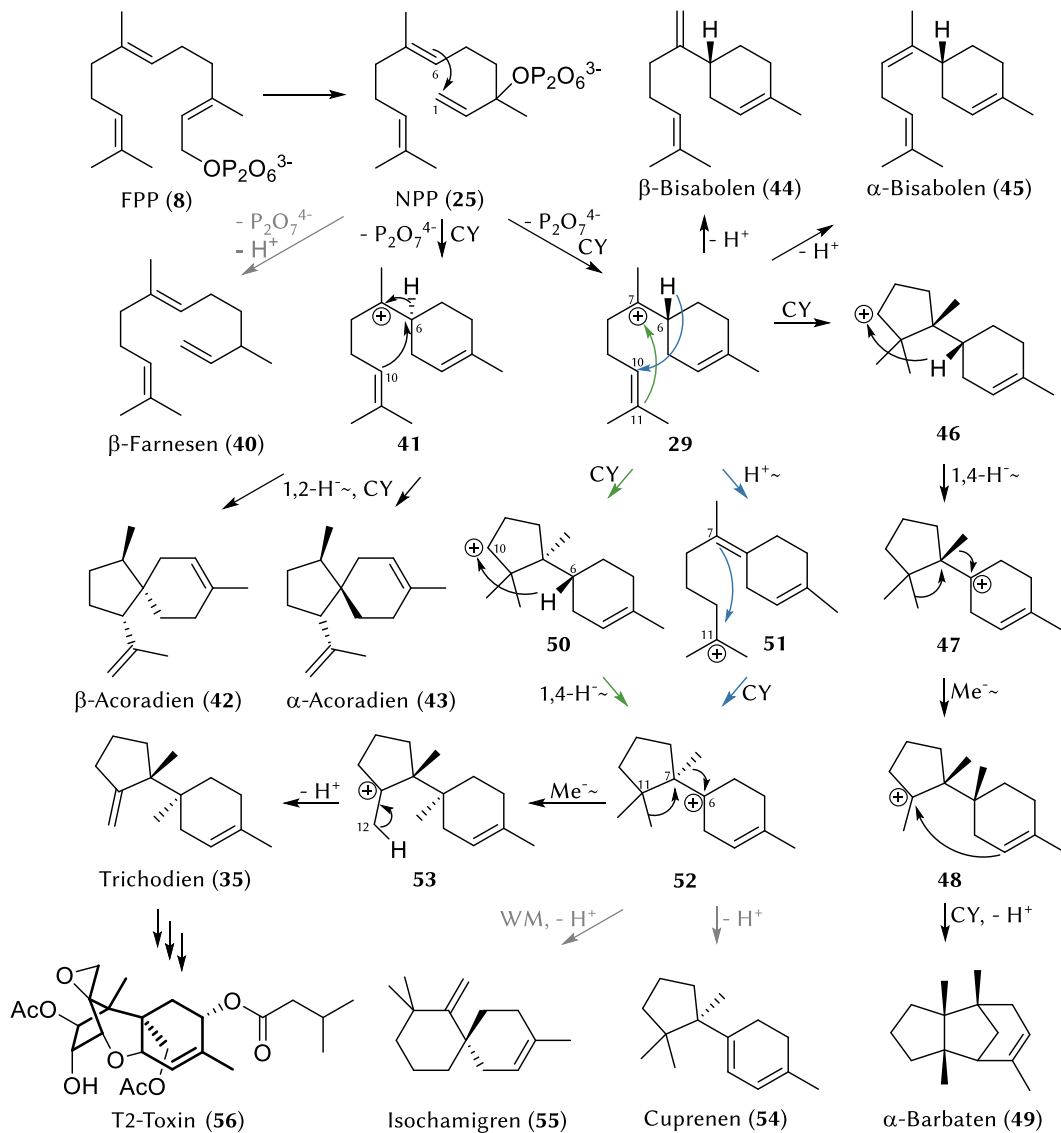
Detaillierte Beschreibungen dieser hochkomplexen Zyklisierungsmechanismen finden sich in den folgenden Kapiteln, in denen näher auf einzelne STCN eingegangen wird. Dabei zeigt sich außerdem, dass obwohl STCN für gewöhnlich FPP als Substrat nutzen, die Produkte höchst unterschiedlich sind. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass viele STCN in einzigartiger Weise die Fähigkeit besitzen mehrere Produkte aus dem gleichen Substrat zu bilden. Dabei konnte bisher jedoch kein Zusammenhang zwischen der Produktbildung und der Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum festgestellt werden.^[15] Studien, in denen im aktiven Zentrum Mutationen erfolgten, zeigen meist einen Anstieg von Neben- bzw. Shuntprodukten, welche für gewöhnlich aus alternativen Konformationen der carbokationischen Intermediate resultieren.^[11,20,23-26] Obwohl allein die Zyklisierung von FPP zu vielfältigen Terpenstrukturen eine bemerkenswerte Steigerung der Chemodiversität mit sich bringt, sind einige Terpencyclasen zusätzlich in der Lage, verschiedene Farnesyl-Derivate zu akzeptieren und zu transformieren.^[2,18,20,27]

In den nachfolgenden Kapiteln werden die in dieser Arbeit verwendeten STCN nach bisherigen Wissensstand genauer betrachtet. Dabei wird besonderes Augenmerk auf die biosynthetischen Eigenschaften der Enzyme und die Bedeutung einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum gelegt, da diese Themen im Fokus dieses Projektes stehen. Zudem wird anhand der Trichodien synthese der Mechanismus der Sesquiterpenbildung ausgehend von FPP unter Berücksichtigung des Einflusses von Aminosäuren, die die aktive Tasche begrenzen, detailliert erläutert.

1.3.1 Trichodien synthase Tri5

Die Trichodien synthase Tri5 aus dem Pilz *Fusarium sporotrichioides* ist seit den 1980er Jahren bekannt und wurde daher detailliert als Modell-Terpencyclase untersucht. Das lange Zeit als einziges Hauptprodukt von Tri5 bekannte Trichodien (35) gilt als Vorläufer der Trichothecene, zu denen auch die Mykotoxine Vomitoxin und T2 Toxin (56) gehören.^[28,29] Nicht verwunderlich ist daher, dass die Trichodien synthase auch in anderen Pilzen zu finden ist.^[30] In neueren Studien konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass Tri5 geringe Mengen von mehr als zehn verschiedenen Nebenprodukten bildet. Davon konnten bisher β -Farnesen (40), α -Acoradien (43), β -Acoradien (42), α -Bisabolen (45), β -Bisabolen (44), α -Barbaten (49), Cuprenen (54) und Isochamigren (55) identifiziert werden. Diese Produkte entstehen meist indem Intermediate der Trichodienbildung, wie das Bisabolykation (29), deprotoniert werden (Schema 4). Ausnahmen bilden dabei α -Barbaten, Isochamigren und die Acoradiene, welche durch Alkyl- oder Hydridshifts eine alternative Abzweigung zur Trichodienbildung nehmen, bevor es zur finalen Deprotonierung kommt.^[31,32]

Die Kristallstruktur von Tri5 eröffnete präzise Einblicke in den Mechanismus der Trichodien synthase. Bei der Bindung des Substrats führt dessen Pyrophosphat einheit zu Konformationsänderungen mehrerer Helices der STC. Die daraus resultierende Spaltung bestehender und Ausbildung neuer Wasserstoffbrücken löst eine Schließung der aktiven Tasche aus. Nach der initialen Ionisierung von FPP (8) wird das abgespaltene Pyrophosphat umgehend an C3 gebunden. Das entstandene (3*R*)-NPP (25) ermöglicht eine freie Rotation um die C2-C3-Bindung und somit die Änderung der transoiden in die cisoide Konformation, welche das leere p-Orbital an C1 so zum C6-C7- π -Orbital ausrichtet, dass eine C1-C6-Bindung gebildet werden kann. Nach der Abspaltung verbleibt das Pyrophosphat in der aktiven Tasche, da es entscheidend für die Erhaltung der geschlossenen Konformation ist. Das Carbokation an C7 wird vermutlich durch Kation- π -Interaktionen mit Y93 stabilisiert. Eine Rotation des Cyclohexenrings von Intermediat 29 könnte das leere p-Orbital an C7 in Richtung des C10-C11- π -Orbitals orientieren, wodurch es in Folge einer zweiten Zyklisierung zur Bildung von Intermediat 50 kommt (Schema 4, grün). Das resultierende Carbokation an C10 könnte dabei über elektrostatische Interaktionen mit D100 und dem Pyrophosphat stabilisiert werden. Anschließend könnte ein 1,4-Hydridshift von C6 nach C10 erfolgen wobei Intermediat 52 entsteht, während ein konkurrierender Methylshift des C12 oder C13 sterisch durch die Seitenkette von L97 unterbunden wird.^[13] Alternativ zu der zweiten Zyklisierung gefolgt von dem 1,4-Hydridshift postulieren HONG und TANTILLO hingegen, ausgehend von Intermediat 29, einen energetisch begünstigten 1,5-Protontransfer von C6 nach C10 mit anschließender Zyklisierung zu Intermediat 52 (Schema 4, blau).^[33,34] Danach kommt es zu zwei Methylshifts von C7 zu C6 und von C11 zu C7, wobei die Seitenkette von T96 einen konkurrierenden Methylshift des C12 zu C7 verhindert. Die finale Deprotonierung des Intermediats 53 an C12 wird vermutlich durch D100 oder das Pyrophosphat ausgelöst und führt zu Trichodien (35).^[13]

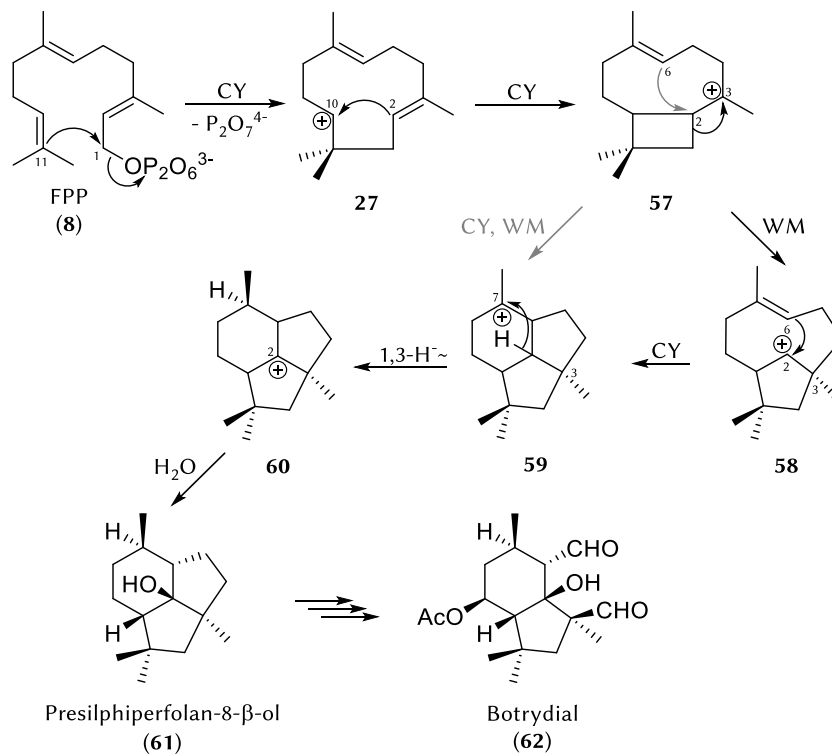


Schema 4: Mechanismus der Trichodiensynthese Tri5 zur Bildung von Trichodien und Nebenprodukten. Abkürzungen: CY = Zyklisierung, WM = WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung, H^{\sim} = Protonenshift, H^{\sim} = Hydridshift, Me^{\sim} = Methylshift. Durch weitere Biotransformationen kann aus Trichodien (35) das T2-Toxin (56) gebildet werden.^[13,25,31,35,36]

Nach erfolgreicher Expression in *Escherichia coli*^[36,37] wurden an Tri5 umfangreiche Mutagenesestudien zur Untersuchung des aktiven Zentrums von Sesquiterpencyclasen durchgeführt. Dabei wurde neben den aspartatreichen Regionen vor allem die Bedeutung von Arginin- und Cysteinresten sowie von aromatischen Aminosäuren untersucht. Beispielhaft sind hier D100, R304 und Y305 zu nennen.^[31,35,38–40] Außerdem wurden zur Identifizierung potentieller Inhibitoren für die Trichodiensynthese bereits verschiedene FPP-Derivate, welche als Substratanaloga in Kristallstrukturen dienen sollten, getestet. Eine ausführlichere Beschreibung dieser Arbeiten findet sich in Kapitel 1.4.2.

1.3.2 Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2

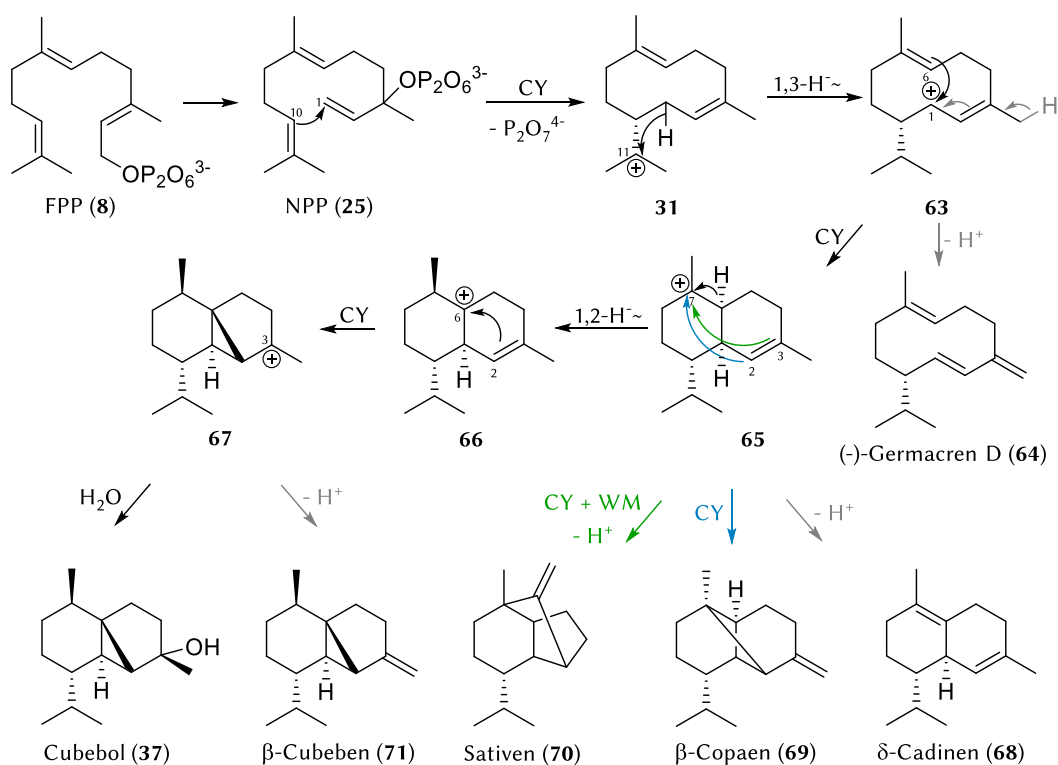
Als zweite Sesquiterpencyclase fungalen Ursprungs wurde die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2 aus *Botrytis cinerea* ausgewählt, dessen Gen als Teil des Genclusters für die Botrydial-Biosynthese entdeckt wurde.^[41] Nach heterologer Expression in *E. coli* lieferte eine Inkubation des rekombinanten Proteins mit FPP (8) Presilphiperfolan-8- β -ol (61) als Produkt,^[42] welches als Vorläufer des Toxins Botrydial (62) vermutet wird^[43]. Untersuchungen mit Isotopen-markierten FPP-Analoga und NPP (25) gaben bereits detailliertere Einblicke in den Mechanismus und die Stereochemie der Presilphiperfolan-8- β -ol-Bildung durch Bot2. Nach der Abspaltung des Pyrophosphates kommt es durch 1,11-Zyklisierung zur Bildung eines Humulylkations (27), gefolgt von der 2,10-Zyklisierung zum Caryophyllkation (57) (Schema 5). Ein Mechanismus über NPP konnte hingegen ausgeschlossen werden. Ausgehend von Intermediat 57 wäre eine Ringerweiterung durch WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung mit anschließender 2,6-Zyklisierung denkbar. Da die Existenz des energetisch ungünstigen, sekundären Kations 58 nicht eindeutig bewiesen wurde, wäre allerdings auch ein konzertierter Mechanismus zur Bildung von Intermediats 59 möglich (Schema 5, grau). Das dabei entstandene trizyklische Kation 60 unterläuft einen 1,3-Hydridshift, bevor die Reaktionskaskade durch Addition von Wasser beendet wird.^[44-46]



Schema 5: Der Mechanismus der Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2 kann entweder über das sekundäre Carbokation oder durch eine konzertierte Zyklisierung mit Ringerweiterung verlaufen. Abkürzungen: CY = Zyklisierung, WM = WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung, H \sim = Hydridshift. Presilphiperfolan-8- β -ol (61) kann anschließend durch weitere Biotransformationen zu Botrydial (62) umgesetzt werden.^[44,46]

1.3.3 Cubebolsynthese Cop4

Die Suche nach homologen Sequenzen zu den fungalen Sesquiterpencyclasen Trichodien-, Aristolochen- und Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase in fungalen Genomen, führte zu der Entdeckung von sechs Sesquiterpensynthasen in dem Pilz *Coprinus cinereus* (dt. Struppiger Tintling). Durch heterologe Expression in *E. coli* erfolgte die Charakterisierung der Sesquiterpencyclase Cop4, welche eine Vielzahl an Produkten bildet, darunter (-)-Germacren D (64), δ -Cadinen (68), β -Copaen (69), Sativen (70), β -Cubeben (71) und Cubebol (37).^[47] Aller bisher identifizierten Produkte werden durch 1,10-Zyklisierung von FPP (8) zum Germacradienylkation (31) gebildet (Schema 6). Dafür durchläuft das Substrat nach der Abspaltung des Pyrophosphats eine Isomerisierung der C2-C3- π -Bindung, gefolgt von der Bildung von NPP (25). Im Anschluss stattfindende Zyklisierungen, WAGNER-MEERWEIN-Umlagerungen und Hydridshifts führen zu hochkomplexen, trizyklischen Produkten, deren Bildung ebenfalls aus NPP als Substrat nachgewiesen werden konnte. Die Anteile einzelner Zyklisierungsprodukte von Cop4 zeigten sich zudem stark von den äußeren Bedingungen, wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke, abhängig.^[20]

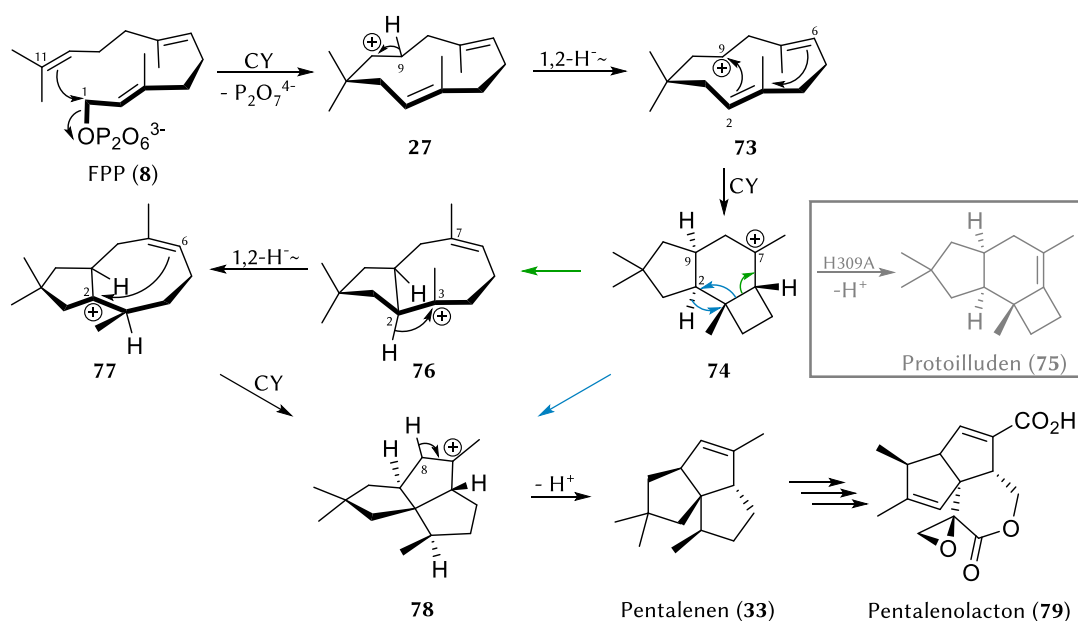


Schema 6: Mechanismus der stark promiskuen Sesquiterpencyclase Cop4 zur Bildung von Cubebol (37), (-)-Germacren D (64) und weiteren Produkten. Die Stereochemie der Produkte erfolgte nach der Annahme, dass sich die Stereochemie der Isopropylgruppe im späteren Mechanismus nicht mehr verändert. Abkürzungen: CY = Zyklisierung, WMR = WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung, H \sim = Hydridshift. ^[20,47]

Ein Homologiemodell von Cop4 weist auf eine besonders große aktive Tasche hin, welche verschiedene Konformationen des Substrats und der Intermediate ermöglicht und damit ursächlich für die hohe Anzahl an Zyklisierungsprodukten sein dürfte.^[20,23] Die Ursache der gesteigerten Promiskuität des Enzyms wurde zudem mittels Mutagenese sowie Austausch des H- α 1-Loops untersucht, da diese Region während der Substratbindung eine große Konformationsänderung vollzieht und Einfluss auf die Selektivität der Produktbildung zu haben scheint.^[23]

1.3.4 Pentalenensynthase PenA

Die bakteriellen Terpencyclasen, die für dieses Projekt gewählt wurden, stammen ausschließlich aus Streptomyeten. Eine der ersten identifizierten Terpencyclasen, die Pentalenensynthase PenA aus *Streptomyces exfoliatus*² wurde in der Gruppe von DAVID E. CANE entdeckt und charakterisiert. PenA bildet Pentalenen (33) als einziges Hauptprodukt, welches als natürlicher Vorläufer für Pentalenolacton-Antibiotika gilt.^[48,49] Die Aufklärung des Mechanismus von PenA (Schema 7) erweist sich als besondere Herausforderung, da nicht mit Hilfe von Nebenprodukten Rückschlüsse auf die nach der 1,11-Zyklisierung folgenden Schritte gezogen werden können. Allerdings zeigten einige Mutanten die Bildung des Nebenprodukts Protoilluden (75)^[26], welches auf die Existenz des Protoilludylkations (74) hinweist. Trotz diverser Vorschläge zum Mechanismus der Pentalenen-bildung auf Grundlage von Untersuchungen mit Isotopen-markierten Substraten und theoretischen Berechnungen, herrscht über dieses Intermediat, entgegen früher Vorschläge von CANE und TANTILLO^[19,50,51,52], mittlerweile Einigkeit. Ob es anschließend zu einer Ringöffnung (Schema 7, grün) über Intermediat 77 oder direkt zu einer Ringerweiterung (Schema 7, blau) kommt, ist hingegen noch unklar.^[34,53–55]



Schema 7: Mechanismus der Pentalenensynthase PenA. Obwohl es nach der Bildung des Protoilludylkations (74) auch zur Ringerweiterung kommen könnte (grau), ist der Mechanismus über die Ringöffnung energetisch bevorzugt. ^[34,53–55] Abkürzungen: CY = Zyklisierung, H⁻ = Hydridshift. Pentalenolacton (79) kann anschließend durch mehrfache Oxidationen aus Pentalenen (33) gebildet werden. ^[56]

Nach erfolgreicher Expression in *E. coli*^[57] wurde eine Kristallstruktur von PenA erstellt (Abbildung 7)^[52], anhand derer angenommen wird, dass F76, F77, N219 und W308 die carbokationischen Intermediate durch Quadropol-Ladungs- und Dipol-Ladungs-Interaktionen stabilisieren und die Enzyntasche so konturieren, dass die Bildung von Nebenprodukten verhindert wird.^[51] Während zunächst angenommen wurde, dass es sich bei H309 um die aktive Base handelt, konnte dies, ebenso wie für W308, durch spätere Mutagenesestudien widerlegt werden. Aufgrund der Abwesenheit weiterer basischer Aminosäuren in der Enzyntasche, müssen andere Basen für die Deprotonierung verantwortlich sein. Da weder die Kristallstrukturen gebundene Wassermoleküle in der aktiven Tasche zeigen, noch Nebenprodukte mit Hydroxyfunktion bekannt sind, kann Wasser als aktive Base

² Früher trug dieser Organismus die Bezeichnung *Streptomyces* UC5319 und wird daher in vielen Studien noch so aufgeführt.

ausgeschlossen werden. Daher kommen nur noch die Carbonylsauerstoffe des Peptidrückgrats oder das anorganische Pyrophosphat als Base in Frage.^[26]

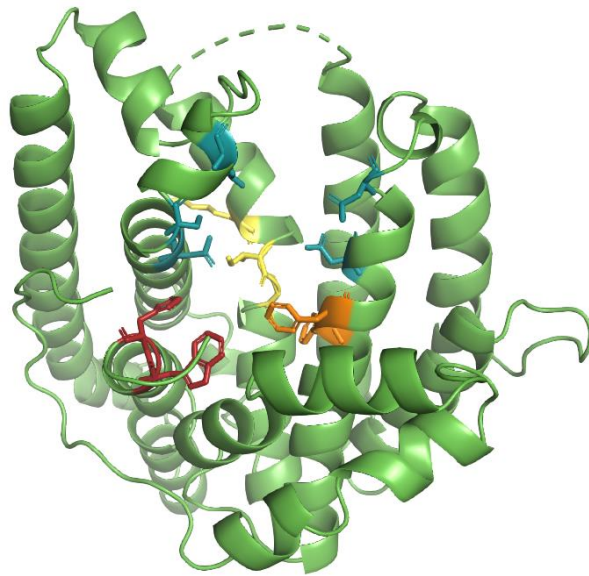
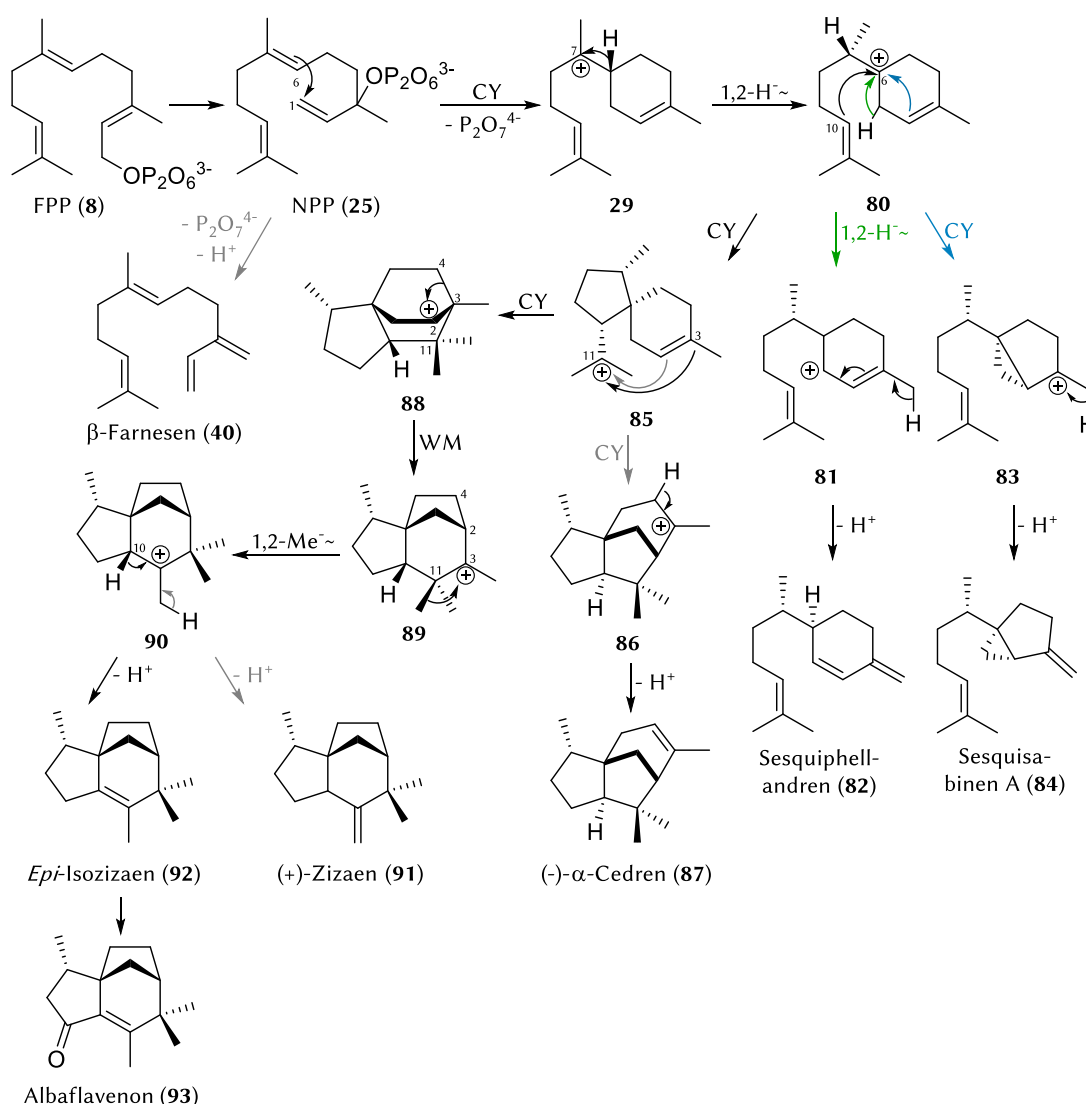


Abbildung 7: Kristallstruktur der Pentalenensynthase PenA in der offenen Konformation. Markiert sind die Metallbindedomänen (blau) inklusive N219, die Effektortriade (gelb), die aromatischen Aminosäuren F76 und F77 (orange) sowie W308 und H309 (rot).^[51]

1.3.5 *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1

Die *Epi*-Isozizaensynthase (EIZS/Cyc1) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurde 2006 durch *Genome Mining* entdeckt, da ihre Gensequenz eine hohe Ähnlichkeit mit dem Gen der Pentalenensynthase *penA* aufweist.^[58] Das Hauptprodukt *Epi*-Isozizaen (92) wird durch Cyc1 zu etwa 80 % gebildet und dient als Vorläufer für das Antibiotikum Albaflavenon (93). Bei den Nebenprodukten (40, 82, 84, 87, 91) handelt es sich neben Isomeren von *Epi*-Isozizaen auch um mehrere azyklische und monozyklische Shuntprodukte, wie β -Farnesen (40) und Sesquiphellandren (82) (Schema 8). Die Bildung aller Produkte, bis auf β -Farnesen, beginnt durch eine 1,6-Zyklisierung zum Bisabolylkation (29), gefolgt von einem 1,2-Hydridshift. Zwei sequentielle Zyklisierungen führen zur Bildung des trizyklischen Intermediats 88. Nach einer WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung mit anschließendem 1,2-Methylshift kommt es zur Bildung des Intermediats 90, welches entweder zu *Epi*-Isozizaen oder dem Nebenprodukt (+)-Zizaen (91) deprotoniert werden kann.^[24]



Schema 8: Mechanismus der *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 zur Bildung von *Epi*-Isozizaen (92) und Nebenprodukten. Abkürzungen: CY = Zyklisierung, WM = WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung, H \sim = Hydridshift, Me \sim = Methylshift. Anschließend kann *Epi*-Isozizaen (92) durch eine Cytochrom P450 Monooxygenase in Albaflavenon (93) umgesetzt werden.^[24,58,59]

Anhand von Kristallstrukturanalysen konnte bei Cyc1 (Abbildung 8), ebenso wie bei Cop4, eine große Enzymtasche beobachtet werden, welche die erhöhte Promiskuität aufgrund verschiedener möglicher Konformationen der Intermediate erklärt.^[24,60] Der Anteil der Nebenprodukte konnte zudem durch eine erhöhte Temperatur weiter gesteigert werden.^[61] Ebenso wie bei Tri5, konnte mit Hilfe von Kristallstrukturen eine Mg- und FPP-induzierte Schließung des aktiven Zentrums durch molekulare Erkennung des Pyrophosphatrests beobachtet werden^[24]

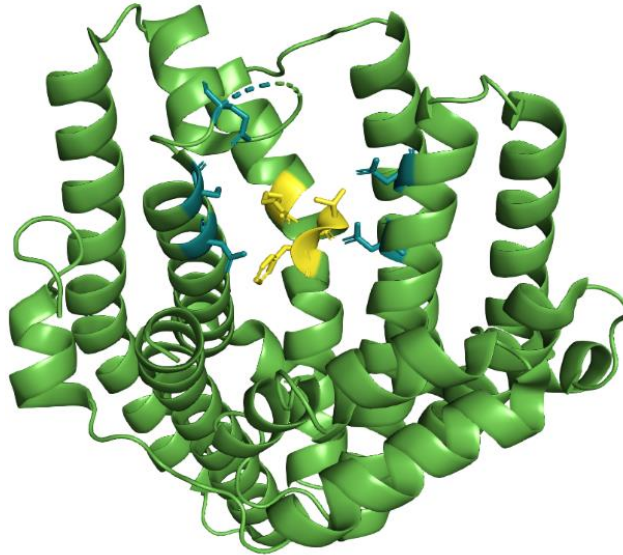
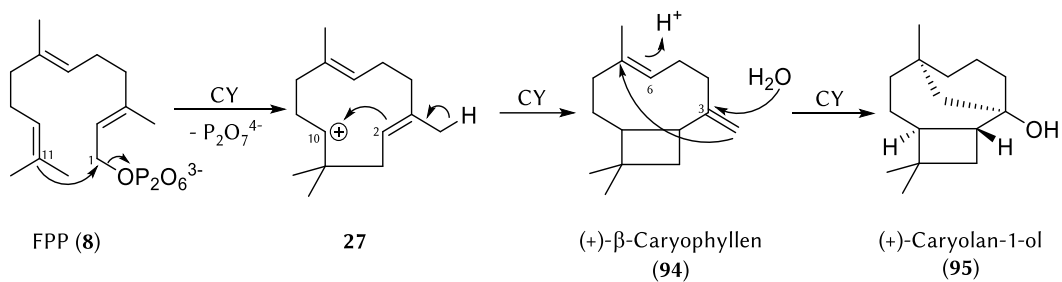


Abbildung 8: Kristallstruktur der *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 in der offenen Konformation. Markiert sind die Metallbindedomänen (blau) und die Effektortriade (gelb).

1.3.6 (+)-Caryolan-1-ol-Synthase GcoA

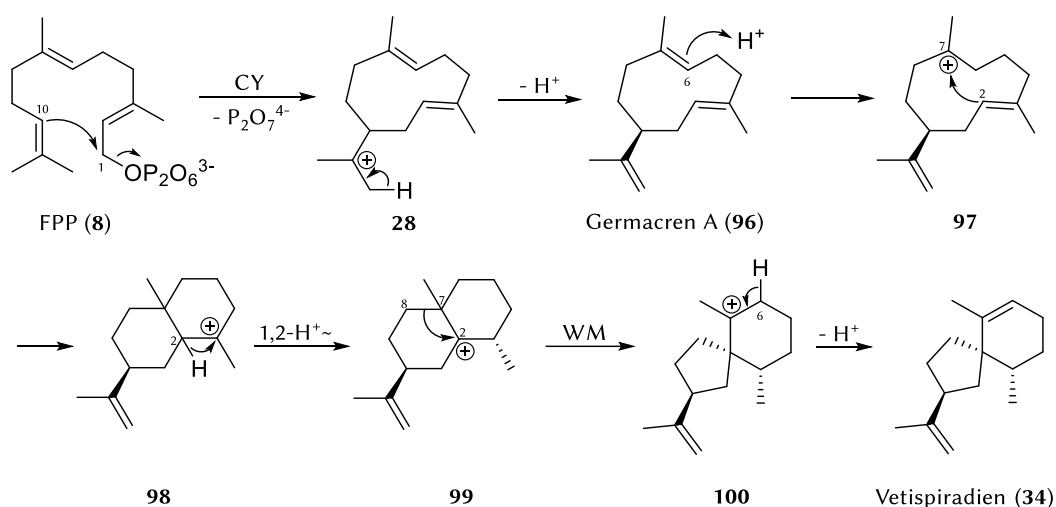
Bei der Erforschung des Sekundärmetabolismus von *Streptomyces griseus* konnte in dessen Genomsequenz die (+)-Caryolan-1-ol-Synthase GcoA ausgemacht werden, deren Aminosäuresequenz zu 29 % identisch zu PenA ist. Bei der Charakterisierung von GcoA konnte gezeigt werden, dass diese STC die Abspaltung des Pyrophosphats von FPP (8), gefolgt von der 1,11-Zyklisierung zum Humulylkation (27), katalysiert (Schema 9). Anschließend kommt es nach einer 2,10-Zyklisierung und Deprotonierung zur Bildung von (+)- β -Caryophyllen (94) welches durch Addition von Wasser zu (+)-Caryolan-1-ol (95) zyklisiert. Der genaue Mechanismus dieses letzten Zyklisierungsschrittes ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Derzeit wird von der Protonierung an C6 ausgegangen, welche eine zweite Zyklisierung auslöst, gefolgt von der Addition von Wasser an C3. Im Gegensatz zu GcoA vollbringen die bisher bekannten Caryolan-1-ol-Synthasen lediglich die Addition von Wasser an (+)- β -Caryophyllen, welches auch als Nebenprodukt von GcoA nachgewiesen werden kann. [62]



Schema 9: Der Mechanismus der (+)-Caryolan-1-ol-Synthase GcoA verläuft über das neutrale Intermediat (+)- β -Caryophyllen (94).
Abkürzung: CY = Zyklisierung. [62]

1.3.7 Vetispiradiensynthese Hvs1

Die Vetispiradiensynthese (Hvs1) aus *Hyoscamus muticus* (dt. Ägyptisches Bilsenkraut) wurde bereits vor über 20 Jahren entdeckt. Nach erfolgreicher heterologer Expression in *E. coli* beschränkt sich ihre Erforschung jedoch hauptsächlich auf grundlegende kinetische und mechanistische Studien. Als Hauptprodukt wird mit über 90 % Vetispiradien (34) genannt, wobei die Anzahl und Identität der Nebenprodukte bisher unbekannt ist.^[22] Die Vetispiradienbildung verläuft, nach der Abspaltung des Pyrophosphats durch 1,10-Zyklisierung und Deprotonierung, über Germacren A (96) als neutrales Intermediat (Schema 10). Nach dessen Protonierung erfolgt eine zweite Zyklisierung zu Intermediat 98, gefolgt von einem 1,2-Hydridshift und einer WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung. Eine finale Deprotonierung an C6 resultiert in Vetispiradien.^[63,64]

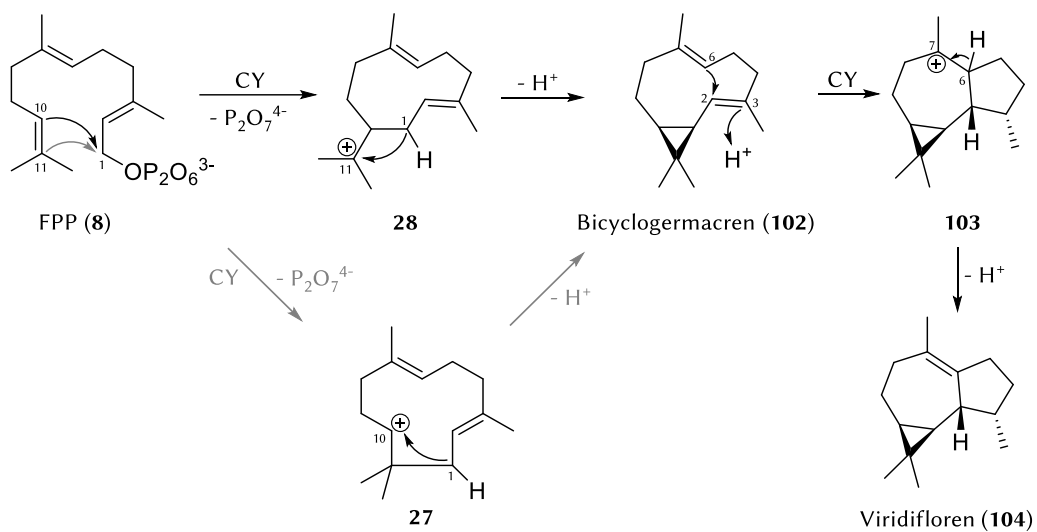


Schema 10: Der Mechanismus der Vetispiradiensynthese Hvs1 verläuft über das neutrale Intermediat Germacren A (96).^[63,64] Abkürzungen: CY = Zyklisierung, WM = WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung, H \sim = Hydridshift.

Aufgrund mechanistischer Ähnlichkeiten zur 5-*Epi*-Aristolochen-Synthese (TEAS), bei der es statt der WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung zu einem Methylshift kommt, wurden beide Enzyme miteinander verglichen, um die Ursache für die WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung in Hvs1 zu ergründen. Die bei der Untersuchung der funktionellen Domänen von Hvs1 und TEAS erzeugten chimären STCn zeigten eine deutlich erhöhte Promiskuität, welche die Bildung von Vetispiradien und 5-*Epi*-Aristolochen beinhaltet. Eine konkrete Ursache für die WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung konnte dabei jedoch nicht ausgemacht werden und wurde daher auf minimale Unterschiede in der Form der aktiven Tasche zurückgeführt.^[22,65,66]

1.3.8 Sesquiterpencyclase Tps32

Mit Tps32 wurde eine zweite pflanzliche Sesquiterpencyclase aus *Solanum lycopersicum* (dt. Tomate) für diese Arbeit ausgewählt. Diese wurde zusammen mit anderen Terpencyclasen des Tomatengenoms durch Homologievergleiche entdeckt und phylogenetisch analysiert. Nach erfolgreicher Expression in *E. coli* wurde die enzymatische Aktivität von Tps32 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Tps32 sowohl *E,E*-FPP (**8**), als auch *Z,Z*-FPP als Substrat akzeptiert. Das Produkt aus *E,E*-FPP wurde als Viridifloren (**104**) identifiziert, während die Produkte aus *Z,Z*-FPP bisher unbekannt sind.^[27] Eine detaillierte Aufklärung des Mechanismus der Viridiflorenbildung fehlt bisher (Schema 11), jedoch wird angenommen, dass dieser über das neutrale Bicyclogermacren (**102**) verläuft, welches sowohl durch 1,10- als auch über 1,11-Zyklisierung gebildet werden könnte. Nach der Protonierung an C3 folgen dann eine Zyklisierung und Deprotonierung zur Bildung von Viridifloren.



Schema 11: Der Mechanismus der Viridiflorenbildung könnten sowohl mit einer 1,10- als auch mit einer 1,11-Zyklisierung beginnen. ^[67]
Abkürzungen: CY = Zyklisierung.

1.4 Biotransformation von unnatürlichen Substraten

1.4.1 Enzymatische Biotransformationen

Biotransformationen umfassen alle Reaktionen, bei denen ein Substrat durch einen Biokatalysator in ein Produkt umgewandelt wird. Biokatalysatoren können dabei entweder Enzyme oder ganze Zellen darstellen.^[68] Da sich die vorliegende Arbeit mit Biotransformation durch gereinigte Terpencyclasen beschäftigt, werden im Folgenden die Anwendungsmöglichkeiten von Enzymen als Biokatalysatoren fokussiert.

Enzyme sind, mit Ausnahme von Ribozymen, katalytisch aktive Proteine und übernehmen wichtige Funktionen im Stoffwechsel aller Lebewesen. Ebenso wie andere Proteine werden sie durch Proteinbiosynthese hergestellt.^[69] Da die meisten Enzyme jedoch, aufgrund ihrer Substratflexibilität und Promiskuität in der Lage sind, auch außerhalb ihrer natürlichen Umgebung andere als ihre natürlichen Substrate zu transformieren^[70], können sie als Biokatalysatoren in der organischen Synthese eingesetzt werden. Dafür sind wässrige Medien mit einem pH-Wert zwischen 5 und 8 sowie Temperaturen zwischen 20 °C und 40 °C von Vorteil. Diese milden Bedingungen reduzieren zudem Nebenreaktionen und sind einer der Hauptgründe für die Umweltfreundlichkeit von Biotransformationen.^[71] Andererseits können diese eng begrenzten Bedingungen eine Limitierung darstellen, welche jedoch durch Enzyme, die organische Medien oder extreme Bedingungen tolerieren, umgangen werden kann. Solche Enzyme werden beispielsweise im weltweit größten Sektor für industrielle Enzyme, der Waschmittelindustrie, eingesetzt. Da Enzyme die Reinigung schneller, einfacher und Material-schonender bewerkstelligen können als es mit Hilfe von chemischen oder mechanischen Verfahren möglich wäre, werden insbesondere Amylasen, Proteasen und Lipasen als Waschmittelzusätze eingesetzt. Um bei einem Waschvorgang optimal zu agieren, haben die verwendeten Enzyme ihr Aktivitätsoptimum im alkalischen Bereich, sind bis mindestens 60 °C stabil sowie kompatibel mit weiteren Waschmittelbestandteilen, wie Seife und Bleichmittel.^[72]

Eine Herausforderung bei der Verwendung von Enzymen ist die häufig beobachtete Substrat- oder Produkthemmung, bei der hohe Konzentrationen an Substrat oder Produkt zu einer Inhibierung des Enzyms mit einhergehender Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit führen. Ein Vorteil von Enzymen gegenüber chemischen Katalysatoren ist allerdings ihre hohe Effizienz, da enzymatisch katalysierte Prozesse mit einer hohen Geschwindigkeit ablaufen. Folglich müssen deutlich geringere Mengen an Katalysator eingesetzt werden als es bei chemischen Katalysatoren üblich ist, wodurch im Zweifelsfall höhere Kosten bei der Herstellung des Biokatalysators hingenommen werden können. Des Weiteren können Enzyme Reaktionen katalysieren, die aus Sicht der organischen Chemie nicht machbar erscheinen, da sie besonders selektiv agieren. Aufgrund ihrer Chemo-, Regio- und Diastereoselektivität reagieren Enzyme nicht nur mit einer spezifischen funktionellen Gruppe, sondern können dabei auch zwischen verschiedenen Positionen im Substrat unterscheiden. Außerdem arbeiten Enzyme als chirale Katalysatoren für gewöhnlich enantioselektiv, da sie aus L-Aminosäuren aufgebaut sind. Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren ist eine Herstellung des spiegelbildlichen Katalysators nicht möglich. Stattdessen muss zur Erzeugung des anderen Enantiomers ein Enzym mit der umgekehrten stereochemischen Selektivität erzeugt oder gefunden werden.

Ein weiteres Hindernis können die vom Enzym benötigten Cofaktoren darstellen.^[68,71,73] Cofaktoren umfassen neben Metallionen auch die häufig von Vitaminen abstammenden Coenzyme, wie z. B. ATP, Coenzym A und NADH, sowie nicht-dissoziative prosthetische Gruppen, wie z. B. Flavinmononukleotid (FMN). Wenn kostspielige Cofaktoren wie NADH in stöchiometrischen Mengen benötigt werden, empfiehlt sich daher ein System zum Recycling des Cofaktors. Metallionen hingegen werden

im Laufe des katalytischen Prozesses von den Enzymen meist selbst regeneriert und sind deutlich preiswerter.^[71,74]

Neben Biotransformationen in Batchprozessen lassen sich zudem Flowprozesse mit immobilisierten Enzymen oder Zellen, zur Rückgewinnung des Biokatalysators, oder als Kombination aus mehreren sequentiellen Biotransformationsschritten durchführen, so dass auf die Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten verzichtet werden kann.^[71,73,75,76] Solche Prozesse sind besonders für die industrielle Nutzung von Biokatalysatoren relevant und werden dementsprechend auch für STCn erprobt, um höhere Umsätze mit Hilfe von segmentierten Flowprozessen zu erzielen.^[77]

Trotz der geringen Wasserlöslichkeit und der hohen Flüchtigkeit von Terpenen wird, aufgrund steigender Nachfrage, auch die biotechnologische Herstellung von Terpenoiden immer bedeutender. Außerdem ermöglicht sie die Unabhängigkeit von landwirtschaftlichen Erträgen und Handelsrestriktionen.^[78] Mono- und Sesquiterpene können in der Industrie nicht nur als Duft- und Aromastoffe, sondern auch als Medikamente, Insektenschutzmittel, Bioplastik, antimikrobielle Substanzen oder Biokraftstoffe Anwendung finden.^[79]

1.4.2 Biotransformationen durch Terpencyclasen mit unnatürlichen Substraten

Die Fähigkeit von Enzymen, unnatürliche Substrate zu akzeptieren, wurde bereits angeführt. Dabei wird oft angenommen, dass Enzyme mit komplexen Reaktionsmechanismen gegenüber unnatürlichen Substraten wenig tolerant sind.^[71] Da Terpencyclasen die bisher komplexesten bekannten Biotransformationen in der Natur katalysieren, wäre demnach anzunehmen, dass unnatürliche Substrate nicht oder zumindest kaum akzeptiert werden.

In früheren Studien wurden neben den natürlich vorkommenden Substraten GPP (7) und *Z,E*-FPP (121) bereits verschiedene Derivate entwickelt, um STCn zu inhibieren oder ihren biosynthetischen Mechanismus aufzuklären. Diese umfassen meist methylierte oder halogenierte FPP-Derivate.^[80] Im Folgenden werden FPP-Derivate aufgeführt, die mit den in dieser Arbeit verwendeten STCn getestet wurden oder interessantes Potential für Biotransformationen bieten.

Im Fall der Trichodiensynthese Tri5 wurde GPP (7) nicht als Substrat akzeptiert. Allerdings wurden noch diverse unnatürliche Substrate (105-113) als potentielle Inhibitoren für Tri5 getestet, die als Substratanaloga in Kristallstrukturen dienen sollten (Abbildung 9). Dabei zeigte sich 10-Fluoro-FPP (105) als besonders guter kompetitiver Inhibitor von Tri5.

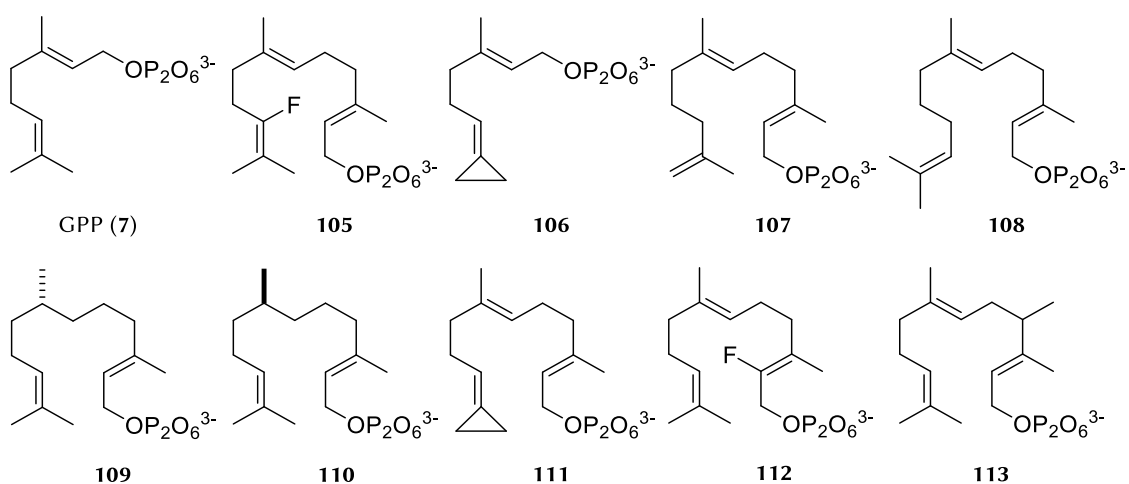
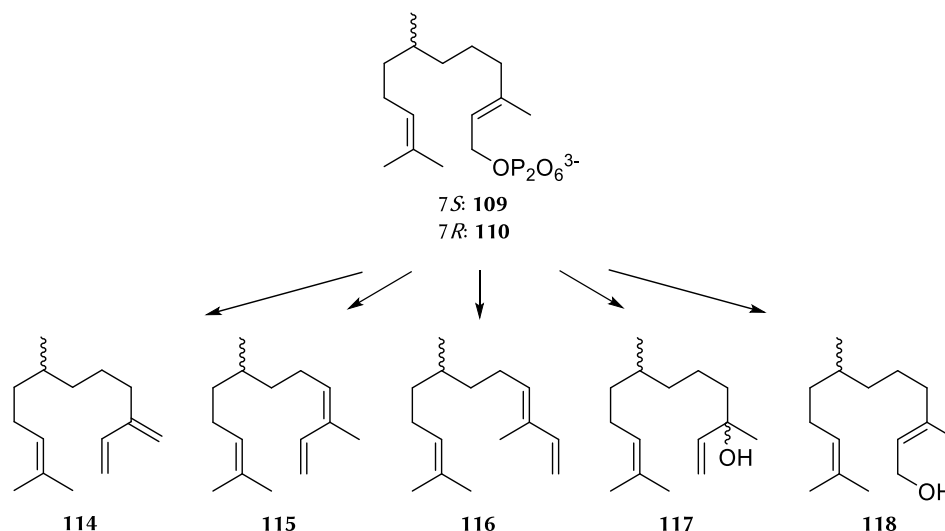


Abbildung 9: FPP-Derivate, die in früheren Studien als Substrate für die Trichodiensynthese Tri5 getestet worden sind.

Das GPP-Derivat 106 und Iso-FPP (107) bewirkten ebenfalls eine deutliche Inhibierung von Tri5, während diese bei Homo-FPP (108) sowie den 6,7-Dihydro-FPP-Derivaten (109 und 110) schwächer ausgeprägt war. Letztere konnten sogar in präparativen Biotransformationen eingesetzt und ihre Produkte als Farnesen-Isomere (114-116) und azyklische Alkohole (117 und 118) identifiziert werden (Schema 12).^[21,81]

Des Weiteren wurde 10-Cyclopropyliden-FPP (111) zur Untersuchung des Tri5-Mechanismus eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass das FPP-Derivat vorübergehend Tri5 inaktiviert, allerdings trotzdem von der STC zu drei verschiedenen Produkten umgesetzt werden kann.^[82] Zudem konnten 2-Fluoro-FPP (112) und 4-Methyl-FPP (113) durch Tri5 zu 10 bzw. 17 Produkten umgesetzt werden. Eine Identifizierung dieser Produkte erfolgte bislang jedoch nicht. Dennoch postulierte VEDULA, dass Tri5 eine hohe Substrattoleranz haben muss.^[32]



Schema 12: Produkte der 6,7-Dihydro-FPP-Derivate **109** und **110** durch Biotransformation mit Tri5.^[21]

Ferner wurden erste Untersuchungen zur Substrattoleranz der Cubebol synthase Cop4 mit anderen natürlich vorkommenden allylischen Pyrophosphaten durchgeführt. Zusätzlich zu FPP (**8**) und NPP (**25**) konnte somit die Transformation von *Z,E*-FPP (**121**) und GPP (**7**) durch Cop4 nachgewiesen werden, obwohl sich die katalytische Aktivität beim Einsatz dieser Substrate deutlich verringerte. Dabei konnte GPP nur schlecht von Cop4 umgesetzt werden und führte größtenteils zur Bildung von (*E*)- β -Ocimen (**119**) (Abbildung 10). Zyklische Produkte wie Limonen (**120**) sind hingegen nur in geringen Mengen entstanden und bestätigen, dass Cop4 in der Lage ist die C2-C3- π -Bindung zu isomerisieren. Als Ursache für die schlechte Akzeptanz von GPP wird die große Enzymtasche vermutet.^[20]

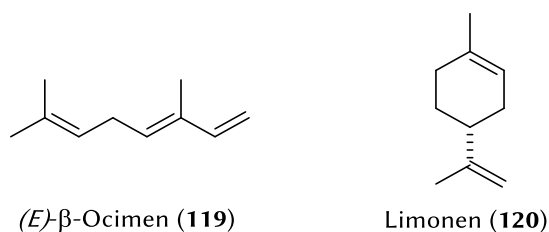
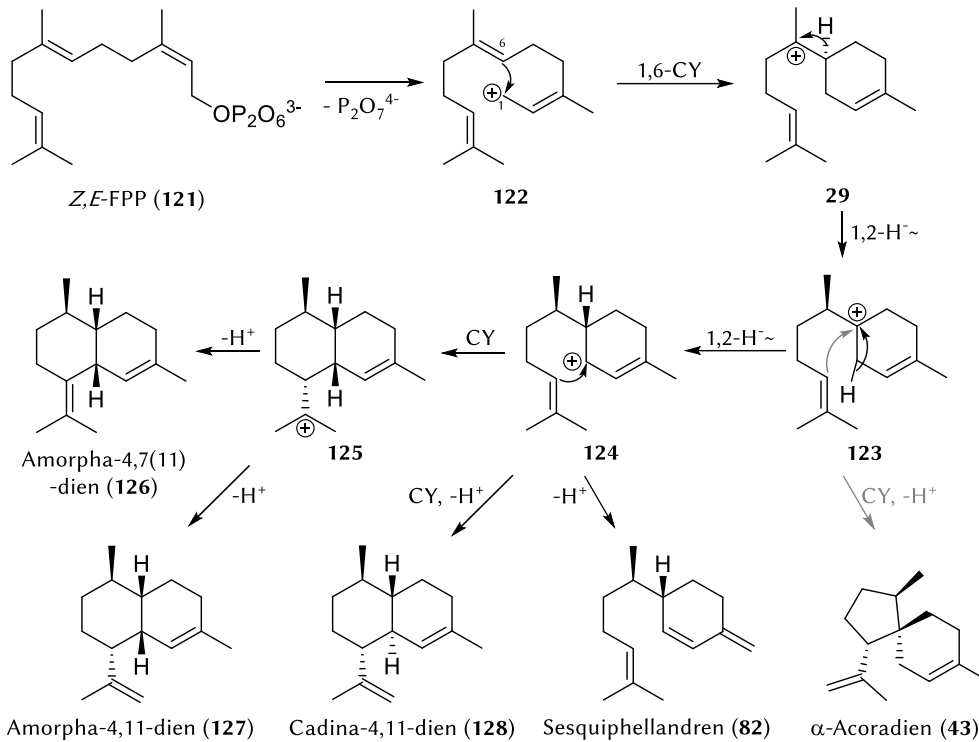


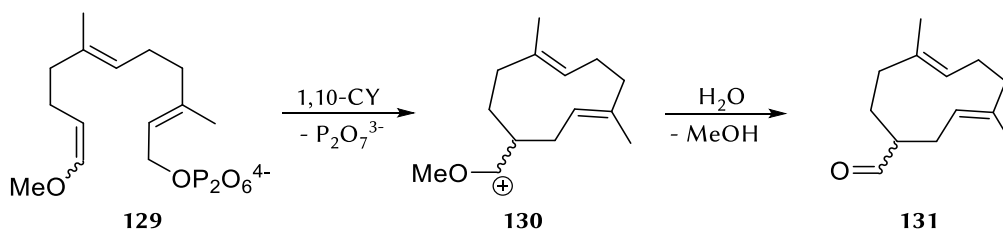
Abbildung 10: Ausgewählte Produkte der Transformation von GPP (**7**) durch Cop4.

Die Umsetzung von *Z,E*-FPP durch Cop4 führte nicht nur zur Bildung gänzlich anderer Produkte (**43**, **82**, **126-128**) als mit FPP, ihre Bildung erfolgte außerdem durch eine 1,6- statt einer 1,10-Zyklisierung (Schema 13). Als Ursache für diese mechanistische Besonderheit wird eine unterschiedliche Bindung des Substrats im aktiven Zentrum der STC angenommen.^[20]



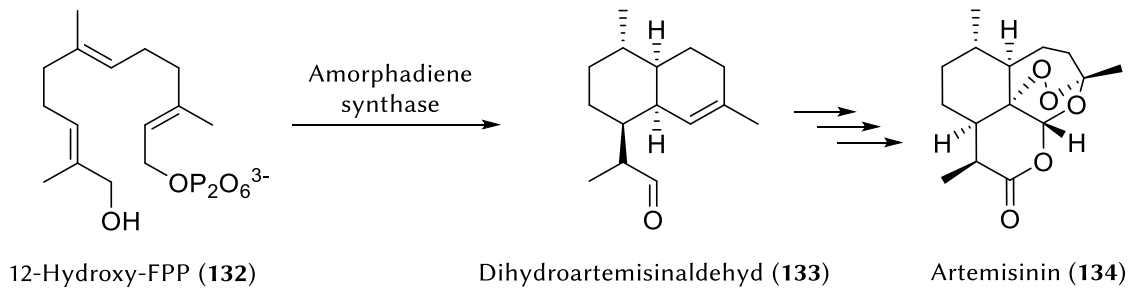
Schema 13: Bei der Biotransformation von *E,Z*-FPP (121) durch Cop4 kommt es zur 1,6-Zyklisierung. Abkürzungen: CY = Zyklisierung, 1,2 H~ = 1,2-Hydridshift.

Im Gegensatz zu den FPP-Derivaten, die zur Inhibierung oder Erforschung von Sesquiterpencyclasen genutzt wurden, gibt es bislang nur wenige Beispiele für weitere Anwendungen. Darunter fällt die Entwicklung eines kolorimetrischen Screenings, um mittels *Directed Evolution* die Thermostabilität von Bot2 zu erhöhen. Dabei setzt Bot2 ein Methoxy-FPP-Derivat (129) zu einem Aldehyd (131) um (Schema 14), während das als Nebenprodukt entstehende Methanol zur Detektion der Reaktion dient.^[83]



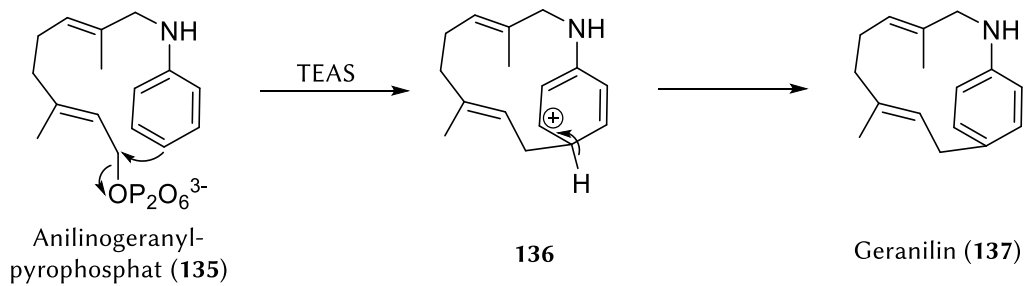
Schema 14: Biotransformation von Methoxy-FPP (129) durch Bot2 im Rahmen eines kalorimetrischen Screenings.

Bislang handelt es sich bei der Biotransformation von 12-Hydroxy-FPP (132) durch die Amorphadiensynthese um die einzige Anwendung mit chemoenzymatischer Zielsetzung (Schema 15). Das dabei entstehende Dihydroartemisininaldehyd (133) dient als Vorläufer für das Anti-Malaria-Mittel Artemisinin (134), welches im Anschluss über nur vier chemisch-synthetische Stufen gebildet werden kann.^[84]



Schema 15: Die Biotransformation von 12-Hydroxy-FPP (132) durch die Amorphadiensynthase als erster Schritt zur Synthese von Artemisinin (134).

Die Transformation von Anilino-GPP (135) durch die 5-*Epi*-Aristolochen-Synthase (TEAS) wurde hingegen zufällig bei der Suche nach neuen Inhibitoren beobachtet und beschreibt das einzige bisher bekannte Beispiel, bei dem ein FPP-Derivat mit heteroatommodifiziertem Rückgrat durch eine STC umgesetzt wird. Dabei wurde neben der inhibierenden Wirkung des Substrats auch sein Ringschluss zu einem 13-gliedrigen Makrozyklus (137) beobachtet (Schema 16). Das Produkt konnte nicht nur in der Kristallstruktur des Enzym-Produkt-Komplexes, sondern auch mittels GC-MS und NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.^[85]



Schema 16: Biotransformation von Anilino-GPP (135) durch TEAS.

2 ZIELSETZUNG

Für die biotechnologische Herstellung von Terpenoiden gibt es nicht nur aufgrund der steigenden Nachfrage an Düften und Aromen einen hohen Bedarf.^[78] Auch in anderen Bereichen sind Biotransformationen, unter anderem wegen ihrer ökologischen Vorteile und der milden Reaktionsbedingungen, aktuell sehr gefragt. Außerdem können mit ihnen oft neue Wege für Reaktionen, die mit chemischen Methoden nicht oder nur über Umwege zu erreichen sind, eröffnet werden.^[68,71] Bei Enzymen, die besonders komplexe Reaktionen katalysieren, kann zudem die Verwendung unnatürlicher Substrate auf einfache Weise zu ganz neuen, teilweise unerwarteten Verbindungen führen, deren Potential es daher noch zu untersuchen gilt.

Während erste Anwendungsmöglichkeiten von Terpencyclasen mit natürlichen Substraten bereits ausgelotet wurden, gibt es bisher kaum Erfahrungen bei der Verwendung von unnatürlichen Substraten.^[77,84,86] Da Terpencyclasen ein großes Potential besitzen, um hochkomplexe Reaktionen zu katalysieren, die zu vielfältigen Produkten führen und damit eine außergewöhnliche Steigerung der Chemodiversität durch eine einzelne Reaktion erreichen, soll in dieser Arbeit die Substratspezifität mehrerer Sesquiterpencyclasen (STCn) untersucht werden. Ihr natürliches Substrat *E,E*-Farnesylpyrophosphat (8, FPP) soll dabei durch Farnesyl-Analoga mit zusätzlichen Heteroatomen, modifiziertem Methylierungsmuster oder veränderten Doppelbindungen ersetzt werden (Abbildung 11). Aufgrund der komplexen Zyklisierungsmechanismen der Terpencyclasen ist im Vorfeld jedoch nicht abzusehen, ob ein Zyklisierungsprodukt analog zu FPP, lediglich mit einem zusätzlichen Heteroatom bzw. einer veränderten Methylgruppe, gebildet wird oder ein gänzlich anderes Produkt entsteht.

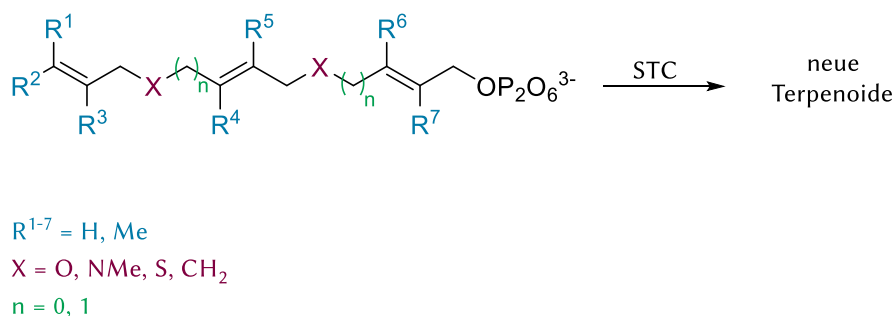


Abbildung 11: Diverse FPP-Derivate können als Substrate für Sesquiterpencyclasen (STCn) zur Erzeugung neuer Terpene dienen.

Der Fokus dieser Arbeit über die katalytische Aktivität von Sesquiterpencyclasen soll daher weniger auf der Reaktionskinetik, sondern vielmehr auf der strukturellen Diversität der Produkte liegen. Dafür lässt sich diese Arbeit thematisch in drei Teile gliedern: Die Herstellung von katalytisch aktiven Terpencyclasen, die Synthese von Farnesyl-Derivaten sowie die finale Biotransformation der Farnesylpyrophosphat-Derivate, einschließlich der Bewertung der Substratakzeptanz und der Charakterisierung der entstandenen Produkte.

2.1 Herstellung von katalytisch aktiven Terpencyclasen

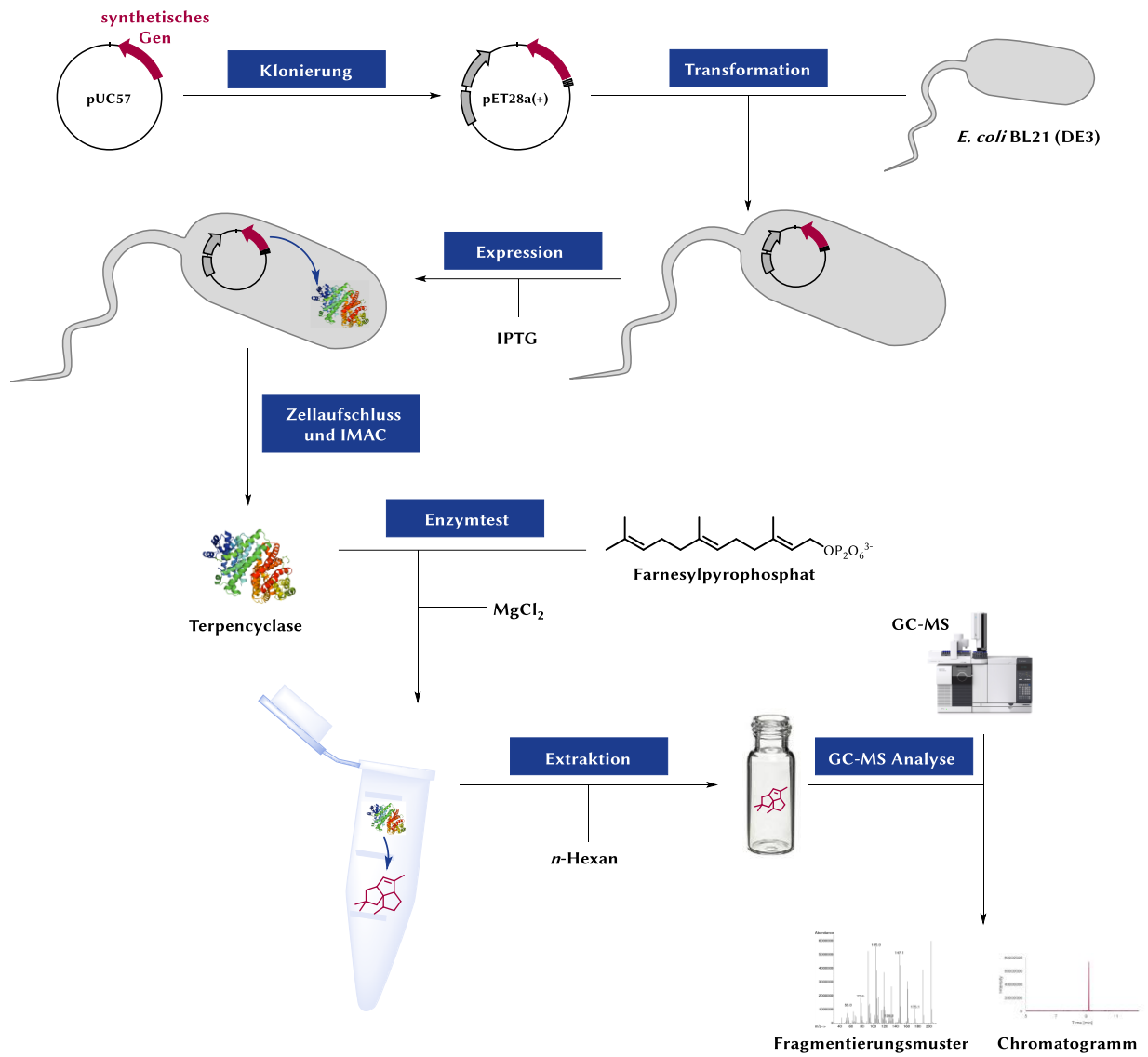
Da Terpencyclasen weder kommerziell erhältlich sind, noch in größeren Mengen aus natürlichen Quellen isoliert werden können, soll die Herstellung der Terpencyclasen durch heterologe Expression erfolgen. Dafür sollen synthetische Gene in einen Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* exprimiert werden.

Insgesamt sollen acht Sesquiterpencyclasen hergestellt werden, die aus FPP nicht nur höchst divergente Produkte generieren, sondern auch sonst unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Während es sich bei der Cubebolsynthase Cop4, der *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 und der Trichodien-synthase Tri5 um mehr oder weniger promiske Enzyme handelt, die verschiedene Nebenprodukte bilden, sind die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2 und die Pentalenensynthase PenA für die zielgerichtete Bildung eines einzigen Produktes bekannt. Promiskuität wird bei Terpencyclasen dem Vorhandensein einer vergrößerten Enzymtasche zugeschrieben.^[11,20,23–26] Da einige der verwendeten Substrate zusätzliche Methylgruppen oder Heteroatome beinhalten und demnach einen höheren sterischen Anspruch aufweisen, könnte sich die Größe der Enzymtasche als essentiell für deren Akzeptanz herausstellen.

Die Produktdiversität der gewählten Terpencyclasen steht unter anderem in Zusammenhang mit stark unterschiedlichen Zyklisierungsmechanismen. Die Mechanismen der *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1, der Trichodien-synthase Tri5 und der Cubebolsynthase Cop4 erfolgen über Nerolidylpyrophosphat (25) als Intermediat, wobei Cop4 anschließend eine 1,10-Zyklisierung katalysiert, während Cyc1 und Tri5 eine 1,6-Zyklisierung bewirken. Die übrigen Enzyme beginnen die erste Zyklisierung über das transoide Farnesylkation, wobei die Vetispiradiensynthase Hvs1 eine 1,10-Zyklisierung und die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2, die Pentalenensynthase PenA und die Caryolan-1-ol-Synthase GcoA eine 1,11-Zyklisierung katalysieren. Weitere Unterschiede finden sich in der Domänenarchitektur der Sesquiterpencyclasen. Während alle Sesquiterpencyclasen die typische α -Domäne aufweisen, besitzen die pflanzlichen Sesquiterpencyclasen Hvs1 und Tps32 zudem eine inaktive β -Domäne.

Nach erfolgreicher Expression soll die Aktivität der Enzyme durch *in vitro* Enzymtests mit FPP verifiziert werden, welche mittels GC-MS analysiert werden können (Schema 17).

Zielsetzung



Schema 17: Arbeitsablauf zur Herstellung von Terpenylcyclasen und ihrem Einsatz in Enzymtests.

2.2 Synthese von Farnesyl-Derivaten

Zusätzlich zu den bereits vorhandenen Farnesyl-Derivaten mit modifiziertem Methylierungsmuster, veränderter Doppelbindung oder zusätzlicher Ether- oder Methylaminofunktion sollen Derivate mit Thioetherfunktion dargestellt werden (Abbildung 12). Die Syntheseroute soll sich an der Synthese der etherfunktionalisierten Farnesyl-Derivate durch SEIDEL orientieren, welche den modularen Aufbau der Terpene nutzt.^[87]

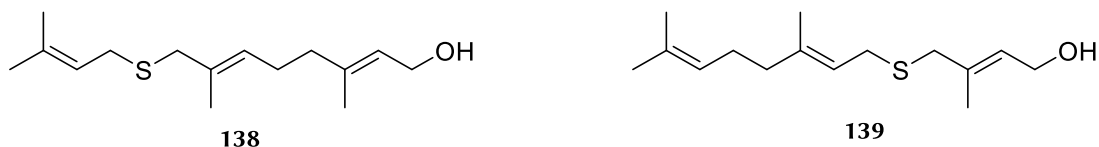


Abbildung 12: Thioetherfunktionalisierte Farnesyl-Derivate.

Anschließend sollen die erhaltenen thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivate 138 und 139 in die Pyrophosphate überführt und ihre Umsetzung mit verschiedenen Sesquiterpencyclasen getestet werden.

2.3 Untersuchung der Substratazeptanz und Identifizierung neuer Terpenoide

Die verschiedenen Farnesylpyrophosphat-Analoga sollen *in vitro* mit den acht Sesquiterpencyclasen, dessen Erzeugung im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* erfolgt, getestet werden. Diese Tests sollen zunächst, ebenso wie die Aktivitätstests, in einem kleinen Maßstab stattfinden, der eine Analyse mittels GC-MS ermöglicht. Da die Umsetzung und die massenspektrometrische Analyse allein noch keinen eindeutigen Hinweis auf die Struktur der erzeugten Terpenoide liefern, sollen die erfolgreichen Biotransformationen anschließend so angepasst und optimiert werden, dass diese im semi-präparativem Maßstab durchgeführt werden können. Die Struktur der dabei erzeugten Terpenoide soll dann mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Des Weiteren soll die Güte der Substratazeptanz und der Biotransformation eingeschätzt werden, indem die Ausbeute der Reaktionen mit den unnatürlichen FPP-Derivaten durch GC-FID ermittelt und mit den Ausbeuten des natürlichen Substrats verglichen wird. Die Ergebnisse könnten bereits erste Aussagen über die Substrattoleranz von Sesquiterpencyclasen zulassen.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Herstellung und Reinigung der Sesquiterpencyclasen

3.1.1 Klonierungsarbeiten

Die synthetischen Gene für die acht zu untersuchenden Sesquiterpencyclasen (STCn) wurden als Konstrukt mit pUC57 erhalten. Nach dessen Amplifikation in *E. coli* TOP10 wurden die synthetischen Sesquiterpencyclasengene (STCn-Gene) mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten und mit dem Expressionsvektor pET28a(+) ligiert. Bei *penA* erfolgte dieser Restriktionsverdau durch *Hind*III und *Bam*HI. Nach der Ligation wurde das Konstrukt in *E. coli* TOP10 integriert und seine korrekte Zusammensetzung nach einer Plasmidpräparation mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert. Dieser Restriktionsverdau erfolgte ebenfalls mit *Hind*III und *Bam*HI und führte zur Bildung von zwei Fragmenten: *penA* (1017 bp) und pET28a(+) (5344 bp), welche durch eine Separation im Agarosegel nachgewiesen wurden (Abbildung 13).

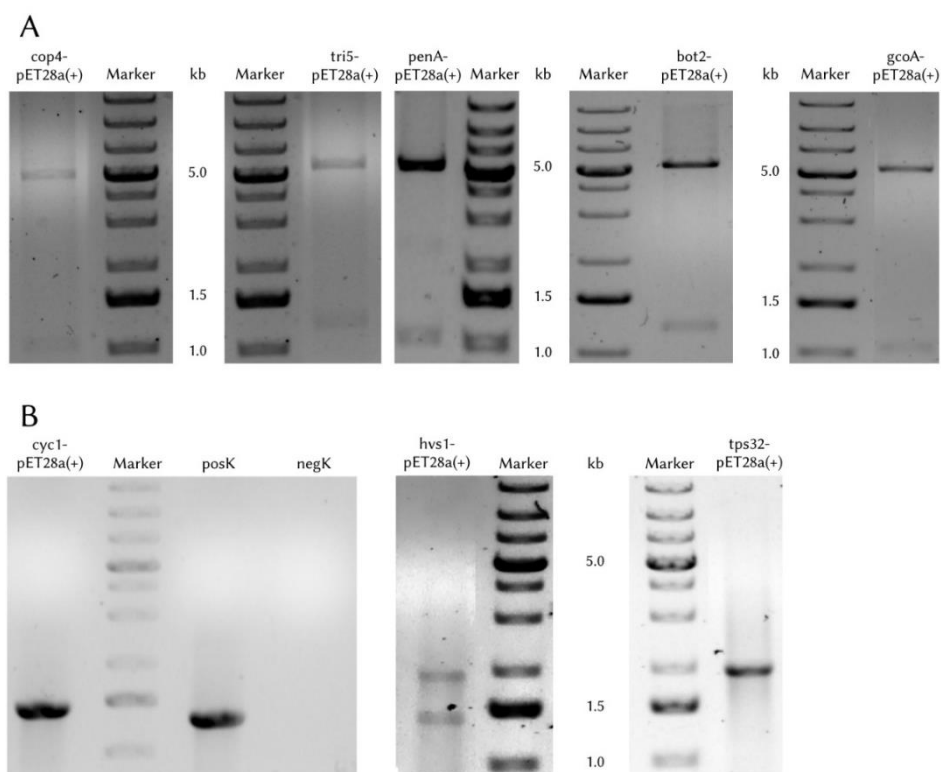


Abbildung 13: Agarosegele zur Kontrolle der pET28a(+)-Konstrukte. Zur Kontrolle der Konstrukte mit *bot2*, *gcoA*, *cop4*, *tri5* und *penA* erfolgte zuvor ein Restriktionsverdau (A), während für *hvs1*-pET28a(+), *tps32*-pET28a(+) und *cyc1*-pET28a(+) eine Kolonie-PCR Verwendung fand (B). Für letztere wurden zusätzlich eine Positiv- (posK) und eine Negativkontrolle (negK) mitgeführt. Zudem wurde ein Marker als Größenstandard verwendet.

Der Restriktionsverdau aller anderen Gene erfolgte mit *Nde*I und *Hind*III. Der ebenso linearisierte pET28a(+)-Vektor wurde anschließend mit den Genfragmenten ligiert und zur Transformation von *E. coli* TOP10 verwendet. Die korrekte Konstruktion dieser Plasmide wurde bei *bot2*, *gcoA*, *cop4* und *tri5* nach einer Plasmidpräparation durch Restriktionsverdau mit *Nde*I und *Hind*III und anschließender Agarosegelelektrophorese (Abbildung 13, A) nachgewiesen. Dabei wurden jeweils zwei Fragmente

gebildet: das STC-Gen (ca. 1 kb)³ und das Vektorrückgrad von pET28a(+) (5305 bp). Zum Nachweis der korrekten Ligation fand hingegen bei *cyc1*-pET28a(+), *tps32*-pET28a(+) und *hvs1*-pET28a(+) eine Kolonie-PCR Verwendung. Im Agarosegel (Abbildung 13, B) ist das dabei entstandene Amplifikat (ca. 1.5 kb) mit dem jeweiligen STC-Gen zu sehen. Die Negativkontrolle wurde ohne DNA durchgeführt, um Fehler durch Verunreinigungen auszuschließen. Als Positivkontrolle diente der Vektor *penA*-pET28a(+).

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau bzw. erfolgreicher Kolonie-PCR wurden alle pET28a(+)-Konstrukte zudem durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend erfolgten Plasmidpräparationen aus den zuvor transformierten *E. coli* TOP10 sowie die Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) mit den bei der Klonierung generierten pET28a(+)-Konstrukten.

3.1.2 Heterologe Expression der Sesquiterpencyclasengene in *E. coli*

Die heterologe Expression der Sesquiterpencyclasegene (STCn-Gene) wurde mit *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Die Ermittlung geeigneter Expressionsbedingungen erfolgte anhand der Expression von *penA*. Dabei zeigte sich, dass die Expression bei 37 °C zu großen Mengen unlöslichem Protein führte, so dass die Temperatur gesenkt wurde, um durch eine langsamere Expression die Ausbildung der korrekten Proteinfaltung zu bewirken. Infolgedessen erwies sich die Genexpressionen durch Induktion bei einer OD₆₀₀ von 0.5 mit IPTG (0.5 mM) mit anschließender Inkubation für 20 – 24 h bei 16 °C und 180 – 200 Upm als angemessen.

Zur Überprüfung der korrekten Expression wurde vor der Induktion und am Ende der Kultivierung jeweils eine Probe genommen, um die Bildung der Sesquiterpencyclasen (STCn) nachzuvollziehen. Zudem erfolgte die parallele Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+), welches ein Plasmid ohne integriertes STC-Gen trägt, mit identischer Induktion und Probennahme als Negativkontrolle. Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dieser Proben konnte die Expression aller STCn-Gene während der Inkubation bei 16 °C nachgewiesen werden, da die Induktion in allen acht Kulturen zur Bildung eines Proteins mit der zu erwartenden Größe⁴ geführt hat (Abbildung 14). In den Proben, die vor der Induktion entnommen worden waren, sowie in der Negativkontrolle mit leerem Vektor sind im Gegensatz dazu keine STC zu erkennen.

Nach dem Zellaufschluss der Hauptkulturen erfolgte die Abtrennung der löslichen Proteine mittels Zentrifugation. SDS-Gele (Abbildung 15) mit Proben aus Pellet und Lysat zeigen, dass die STCn größtenteils in löslicher Form vorliegen. Zur weiteren Verbesserung der Löslichkeit wäre die Reduktion der IPTG-Konzentration sowie die Verwendung eines Glutathion-S-Transferase-Tags möglich, welcher ein schnell faltendes und stabiles Fusionsprotein darstellt. Während die Verringerung der IPTG Menge in einfachen Experimenten untersucht werden könnte, wäre für die Anwendung eines Fusionsproteins eine Klonierung des STC-Gens in einen neuen Vektor nötig. Zudem könnte das Fusionsprotein, wie jeder andere größere Tag, die Faltung der STC verändern und somit dessen Aktivität beeinflussen, so dass eine Abspaltung erforderlich sein könnte.

³ Die exakten Größen der STCn-Gene sind in Kapitel 7.1, Tabelle 45 aufgelistet.

⁴ Die theoretischen Größen der STCn sind in Kapitel 7.1, Tabelle 46 aufgelistet.

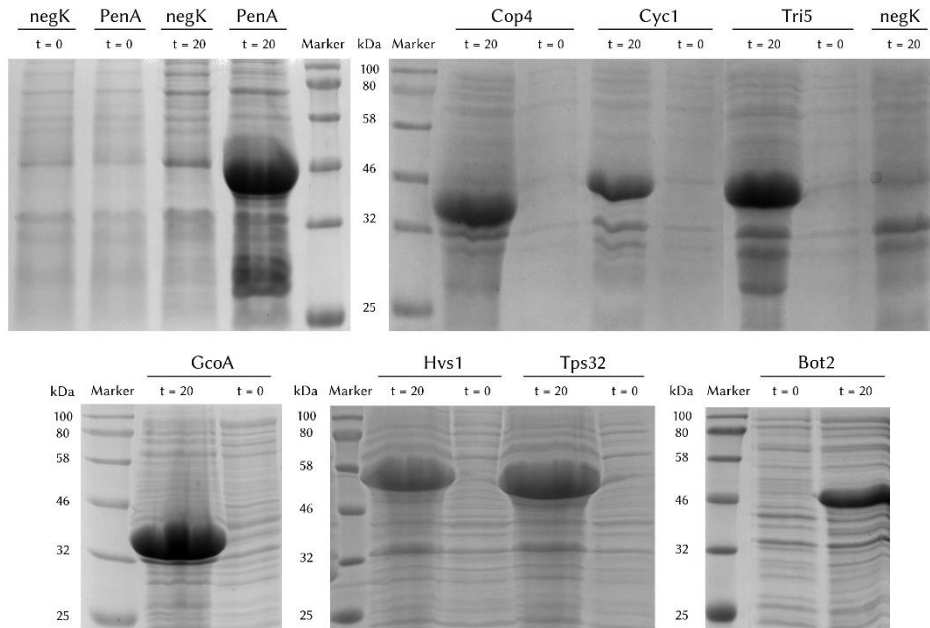


Abbildung 14: SDS-Gele mit Proben der heterologen Expression der STCn-Gene sowie Negativkontrollen. Aufgetragen wurden Marker [M] und Proben der *E. coli*-BL21-(DE3)-Hauptkulturen mit den Vektoren penA-pET28a(+), cop4-pET28a(+), cyc1-pET28a(+), tri5-pET28a(+), gcoA-pET28a(+), hvs1-pET28a(+), tps32-pET28a(+), bot2-pET28a(+), sowie pET28a(+) als Negativkontrolle (negK) zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG [t = 0] und nach etwa 20 h Kultivierung [t = 20]. Zur Orientierung sind die Größen der Markerbanden in kDa angegeben.

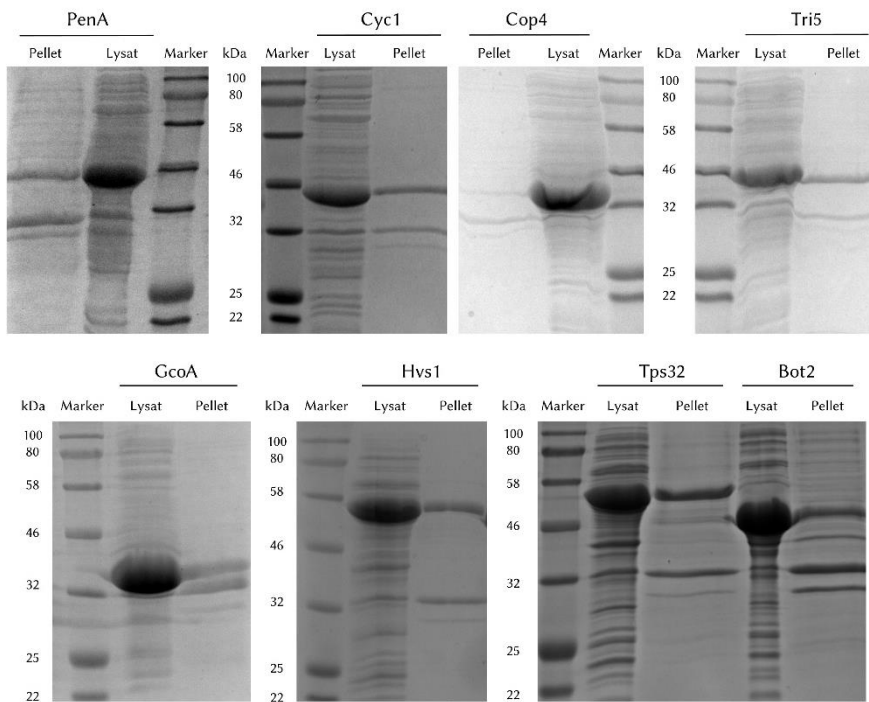


Abbildung 15: SDS-Gele mit Proben von Lysat und Pellet nach Zellaufschluss der acht Hauptkulturen mit STCn. Aufgetragen wurden Marker und Proben von Lysat und Pellet von den Hauptkulturen zur Expression der jeweiligen STC bei 16°C für etwa 22 h. Zur Orientierung sind die Größen der Markerbanden in kDa angegeben.

3.1.3 Proteinreinigung mittels Metallchelatchromatographie

Da die Expression in pET28a(+) erfolgte, besitzen die entstandenen Sesquiterpencyclasen (STCn) einen N-terminalen 6xHis-Tag, welcher die Reinigung der im Lysat enthaltenen, löslichen Proteine durch Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht. Diese erfolgte über eine mit Nickelionen beladene Nitrilotriessigsäure-Agarosematrix (Ni-NTA) als stationäre Phase, indem zunächst die STC mit dem 6xHis-Tag an die komplexierten Nickelionen binden und nach einigen Waschschritten mittels Imidazol eluiert werden, da dieses die Histidinseitenketten verdrängt. Dafür wurde bei kleineren Volumina (4 – 10 mL Lysat) eine manuelle Ni-NTA-Säule eingesetzt, während zur Reinigung von bis zu 50 mL Lysat eine FPLC Verwendung fand.

Bei der Reinigung mittels manueller Säule wurde das Lysat zu Beginn zweimal über die Säule gegeben, um die Proteine zu binden. Mittels FPLC wurde das Lysat hingegen nur einmal über die Säule gegeben und zudem ein Probenreservoir verwendet. Dann folgten in beiden Fällen Waschschritte mit 25 mM Imidazol und die Elution mit schrittweise oder kontinuierlich steigender Imidazolkonzentration bis 500 mM. Dabei wurden verschiedene Fraktionen aufgefangen und Proben für eine SDS-PAGE präpariert (Abbildung 16), um die Reinigung nachzuvollziehen. Dies zeigte, dass die meisten unerwünschten Proteine nicht oder nur leicht an der Säule binden und mit dem zweiten Durchfluss des Lysats oder der ersten Waschfraktion heruntergespült werden. Die STCn hingegen werden gut gebunden und vorwiegend mit 100 mM Imidazol eluiert. Cop4 zeigt allerdings schon bei 50 mM Imidazol eine moderate Elution, während PenA sogar erst mit 250 mM Imidazol die Säule verlässt. Die Stärke der Bindung ist bei PenA dadurch zu erklären, dass das Protein einen zweiten, C-terminalen 6xHis-Tag besitzt. In anderen Fällen könnte die Faltung der STCn den 6xHis-Tag partiell abschirmen, so dass keine optimale Interaktion zwischen allen Histidinseitenketten und Nickelionen möglich und die Bindung daher schwächer ist.

Obwohl die Reinigung in allen Fällen wirksam war, lässt sich feststellen, dass meist nur ein Teil der heterolog hergestellten STCn an die Säule bindet, während der andere Teil der STCn direkt mit den anderen Proteinen von der Säule eluiert. Erklärungen dafür könnten das geringe Säulenvolumen oder die Notwendigkeit der Säulenregeneration sein. Vor allem ersteres wird durch die Tatsache unterstützt, dass nur ein geringer Anteil von Cyc1 bei der Reinigung mittels FPLC in Fraktion 3 auszumachen ist, weshalb diese Reinigungsstrategie für die Produktion von größeren Enzymmengen, wie sie beispielsweise für präparative Biotransformationen benötigt werden, zu empfehlen ist.

Auch wenn es aufgrund unterschiedlicher Proteinkonzentration und Färbungsintensität nicht in jedem SDS-Gel sichtbar ist, sollte davon ausgegangen werden, dass in allen Fällen weitere Proteine an die Säule binden und erst mit der rekombinanten STC eluieren, so dass keines der gereinigten Enzyme vollkommen frei von weiteren Proteinen ist. Dies ist insbesondere dann entscheidend, wenn die unerwünschten Proteine mit dem Substrat oder anderen Komponenten des Reaktionsgemisches interagieren. So könnten z. B. verbliebene Phosphatasen das Pyrophosphat des Substrats hydrolysieren.

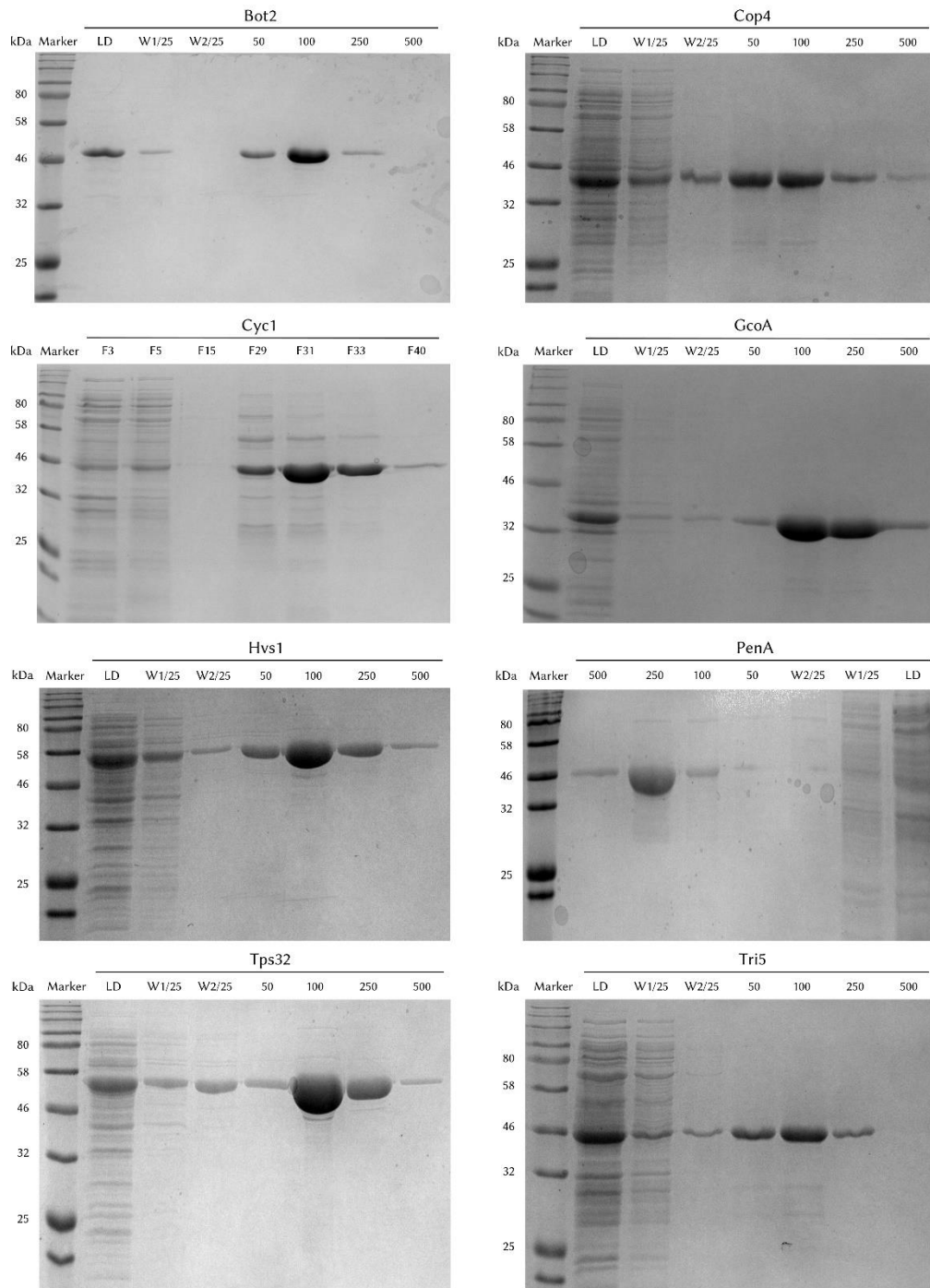


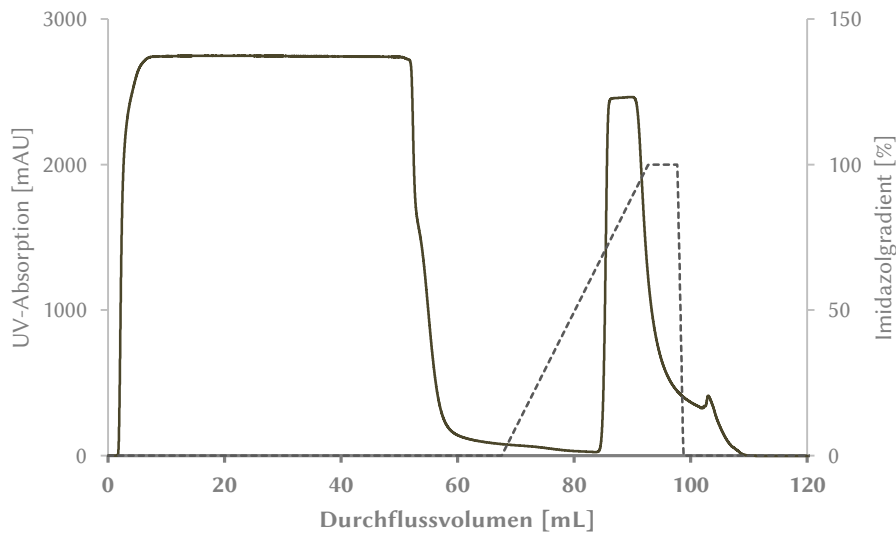
Abbildung 16: SGS-Gele mit Fraktionen der STCN-Reinigung mittels IMAC. Aufgetragen wurden Marker, Durchfluss [LD], zwei Waschschritte [W] mit jeweils 25 mM Imidazol und mehrere Elutionsschritte, deren jeweilige Imidazolkonzentration in mM angegeben ist. Die Reinigung von Cyc1 erfolgte beispielhaft mittels FPLC, weshalb nur repräsentative Fraktionen der Reinigung aufgetragen wurden: Durchfluss [F3], Waschen [F5, F15] und Elution [F29, F31, F33]. Zudem sind die Größen relevanter Markerbanden in kDa angegeben.

Die Reinigung von Cyc1, Tps32, Bot2, GcoA und Cop4 wurde zudem bereits mit Hilfe einer FPLC-Apparatur mit Ni-NTA-Säule getestet, um größere Mengen der STC für präparative Biotransformationen erhalten zu können. Währenddessen wurden 40 – 50 verschiedenen Fraktionen gesammelt. Dabei erfolgte die Detektion der Proteinkonzentration des Eluats mittels Leitfähigkeit und UV-Absorption (Abbildung 17), welche durch die π - π^* -Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm bzw. durch die Absorption von Peptidbindungen bei 205 nm möglich ist. Das Chromatogramm zeigt zunächst einen stark verbreiteten Peak ($t_R = 2 - 55$ min für Bot2 bzw. $t_R = 2 - 30$ min für Tps32),

welcher durch die Proteine zustande gekommen ist, die nicht oder nur leicht an der Säule binden. Anschließend folgte ein linearer Anstieg der Imidazolkonzentration bis 500 mM, welcher die Elution der an die Säule gebundenen Proteine bewirkt.

Durch heterologe Expression und unter Verwendung der FPLC konnten Cop4, Bot2 und Tps32 mit einer Ausbeute von 200 mg/L Flüssigkultur erhalten werden. Die Aubeute an Cyc1, GcoA, PenA und Hvs1 betrug hingegen maximal 100 mg/L Flüssigkultur bei automatisierter Reinigung und maximal 20 mg/L mit manueller Reinigung.

A Reinigung von Bot2 mittels FPLC



B Reinigung von Tps32 mittels FPLC

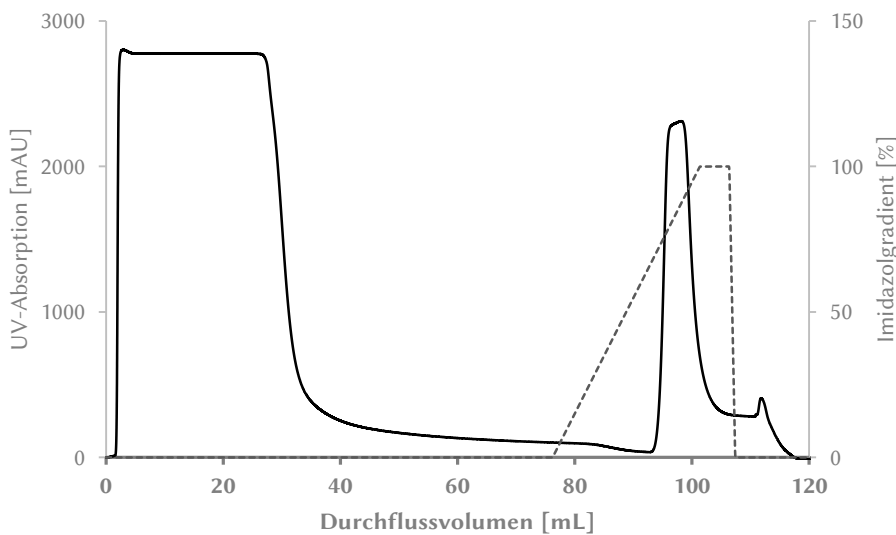


Abbildung 17: UV-Absorption (durchgezogene Linie) und Imidazolgradient (gepunktete Linie) bei der Reinigung von Bot2 (A) und Tps32 (B) mittels FPLC. Bei den gezeigten Beispielen beginnt die Elution der STCn bei einer Imidazolkonzentration von etwa 400 mM.

3.2 Analytische *In Vitro* Enzymtests mit Farnesylpyrophosphat

Die Aktivität der Sesquiterpencyclasen (STCn) wurde mittels analytischer *in vitro* Enzymtests nachvollzogen, in denen die Biotransformation von Farnesylpyrophosphat (8, FPP) betrachtet wurde. Vor der Durchführung der Enzymtests, wurden die STCn in einen geeigneten Puffer überführt. Dieser enthielt DTT, welches einerseits die Oxidation der Proteine unterbindet und andererseits durch die reduzierenden Bedingungen förderlich für die Aktivität von STCn sein könnte.^[38] Frühere Studien, bei denen die STCn charakterisiert wurden, lieferten zunächst Anhaltspunkte für einen geeigneten pH-Wert.^[27,28,42,57,58,62,65] Für die meisten Enzyme bzw. falls kein pH-Optimum bekannt war wurde HEPES-Puffer (pH 7.5) verwendet. Für PenA und Cop4 erwies sich hingegen TRIS-Puffer mit pH 8.0 als günstig, wobei LÓPEZ-GALLEGRO schon feststellte, dass der pH-Wert auf die Aktivität von Cop4 keinen großen Einfluss zu haben scheint, sondern nur eine Änderung der Produktpalette bewirkt.^[20] Für Cyc1 wurde ein pH-Wert von 6.7 eingestellt, da der in der Literatur beschriebene pH-Wert von 6.5 dem isoelektrischen Punkt des rekombinanten Proteins entspricht, wodurch sich die negativen Ladungen ausgleichen und es zur Aggregation kommen kann.^[24,58]

3.2.1 Aktivität von Terpencyclasen

Zur Feststellung der Enzymaktivität wurden die STCn mit FPP (8) inkubiert (Abbildung 18). Dabei erwiesen sich Proteinkonzentrationen von 0.01 – 0.05 mg/mL als günstig. Als Negativkontrolle dienten analoge Ansätze in Abwesenheit von FPP bzw. einer STC. Die Extraktion erfolgte mit 100 μ L *n*-Pentan oder *n*-Hexan, an die sich eine GC-MS-Analyse anschloss.

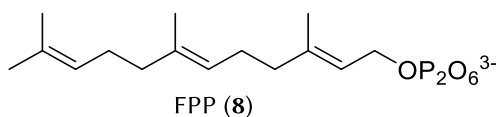


Abbildung 18: Farnesylpyrophosphat (FPP, 8) ist das natürliche Substrat der STCn.

In den Chromatogrammen der Biotransformationen mit FPP zeigen sich ein oder mehrere Peaks mit Retentionszeiten zwischen 7 min und 11 min. Durch vorangegangene Messungen mit Farnesol konnte angenommen werden, dass dies der Retentionsbereich ist, bei dem unter den gegebenen Bedingungen die Elution von Sesquiterpenen bzw. Sesquiterpenalkoholen zu erwarten ist. Da diese Peaks in den Negativkontrollen nicht auszumachen sind, konnte eine *in vitro* Aktivität der rekombinanten STCn somit bewiesen werden. Dies beinhaltet jedoch keine Bewertung der Aktivität, auf die im Rahmen der Optimierungsexperimente und Ausbeutebestimmungen näher eingegangen wird.

Die entstandenen Hauptprodukte weisen entweder ein für Sesquiterpenene typisches $m/z = 204$ oder ein für Sesquiterpenalkohole typisches $m/z = 222$ auf. Eine Übersicht über die Hauptprodukte der analytischen Enzymtests mit FPP ist in Tabelle 2 aufgelistet. Die vorläufige Identifizierung der Produkte erfolgte hier lediglich über die Masse des literaturbekannten Produkts. Ein Vergleich mit einem analytischen Standard anhand von Retentionszeit und Fragmentierungsmuster bzw. durch Koinjektion konnte nicht erfolgen, da die meisten Produkte weder kommerziell erhältlich, noch synthetisch gut zugänglich sind. Da die Identifizierung der Produkte an dieser Stelle nicht essentiell ist, sollte zunächst nur die Aktivität der STCn nachgewiesen werden. Die Verifizierung der vorläufigen Produktzuordnung erfolgte für ausgewählte STCn nach Durchführung von präparativen Biotransformationen durch NMR-Analyse (Kapitel 3.6).

Tabelle 2: Hauptprodukte und ausgewählte Nebenprodukte durch Biotransformation von FPP (8) durch STCn. Die zugehörigen Strukturen sind in Abbildung 20 dargestellt.

STC	t_R	m/z	Produkt (nach Literatur)	Literaturquelle
Bot2	9.755 min	222	Presilphiperfolan-8- β -ol (61)	[42]
Cop4	8.885 min	222	Cubebol (37)	[20]
	8.685 min	204	(-)-Germacren D (64)	
Cyc1	8.874 min	204	<i>Epi</i> -Isozizaen (92)	[61]
GcoA	10.056 min	222	(+)-Caryolan-1-ol (95)	[62]
	8.664 min	204	(+)- β -Caryophyllen (94)	
Hvs1	9.186 min	204	Vetispiradien (34)	[66]
PenA	7.460 min	204	Pentalenen (33)	[57]
Tps32	9.196 min	204	Vetispiradien (34) ⁵	[27]
Tri5	8.985 min	204	Trichodien (35)	[31]

Das in Abbildung 19 beispielhaft dargestellte Chromatogramm der Cop4-katalysierten Reaktion mit FPP zeigt unverkennbar ein Hauptprodukt ($t_R = 8.885$ min) mit $m/z = 222$ und ein Nebenprodukt ($t_R = 8.685$ min) mit $m/z = 204$. Trotz der hohen Promiskuität von Cop4 wurde davon ausgegangen, dass Cubebol (37) als Hauptprodukt gebildet wurde, da dies der einzige literaturbekannte Sesquiterpenalkohol ist. Da unter den verwendeten Bedingungen Cubebol und (-)-Germacren D (64) als Hauptprodukte genannt wurden, und das Fragmentierungsmuster von (-)-Germacren D in Datenbanken hinterlegt ist, erfolgte die Annahme, dass es sich bei dem Nebenprodukt mit $t_R = 8.685$ min um (-)-Germacren D handelt. Weitere Nebenprodukte wurden nur in geringen Mengen gebildet. Dabei dürfte es sich unter anderem um die in der Literatur beschriebenen Nebenprodukte δ -Cadinen (68), β -Copaen (69), Sativen (70) und β -Cubeben (71) handeln. Eine Zuordnung dieser Nebenprodukte erfolgte nicht. Zudem konnte die Bildung weiterer bisher nicht identifizierter Nebenprodukte mit $m/z = 204$ und $m/z = 222$ beobachtet werden. Die prozentuale Verteilung der Cop4-Produkte deckt sich allerdings nicht mit den publizierten Ergebnissen. Dies lässt sich vermutlich auf die von LÓPEZ-GALLEGO verwendete Headspace-Analytik, die höhere Mg-Konzentration oder andere, geringfügige Änderungen in der Durchführung der Biotransformation zurückzuführen.^[20]

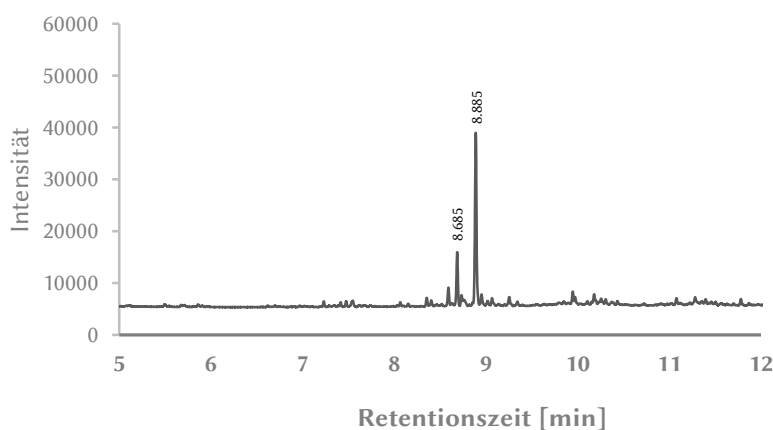


Abbildung 19: FID-Chromatogramm der Biotransformation von FPP (8) durch Cop4.

⁵ Die vorläufige, literaturbegründete Annahme, dass Tps32 Viridifloren bildet, konnte durch spätere NMR-spektroskopische Analysen korrigiert werden (Kapitel 3.6.2).

Ebenso erfolgte die Zuordnung der GcoA-Produkte (+)-Caryolan-1-ol (95) und (+)-Caryophyllen (94) mit Hilfe der Molekülmasse, wobei letzteres entsprechend der Literaturangaben nur in geringen Mengen beobachtet wurde.^[62] Zudem zeigen sich bei $t_R = 8.737$ min und $t_R = 8.885$ min Spuren weiterer Nebenprodukte mit $m/z = 204$ und bei höherer Retentionszeit ($t_R = 9.434$ min, $t_R = 9708$ min und $t_R = 10.320$ min) Spuren von Nebenprodukten mit $m/z = 222$.

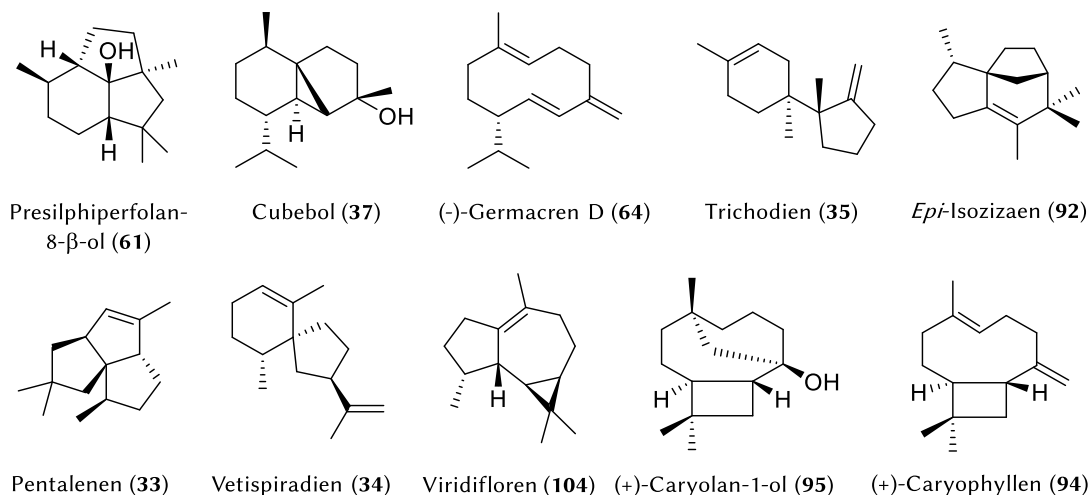


Abbildung 20: Hauptprodukte und ausgewählte Nebenprodukte der acht STCN nach Literaturangaben.

Die Tri5-katalysierte Biotransformation von FPP führte zur Bildung des Hauptprodukts Trichodien (35) sowie zu geringen Mengen von mindestens neun Nebenprodukten mit $m/z = 204$ im Bereich zwischen $t_R = 8.2$ min und $t_R = 9.1$ min. Diese dürften unter anderem den in der Literatur beschriebenen Sesquiterpenen β -Farnesen (40), α -Acoradien (43), β -Acoradien (42), α -Bisabolen (45), β -Bisabolen (44), α -Barbaten (49), Cuprenen (54) und Isochamigren (55) entsprechen.^[31] Beim Produktgemisch von Cyc1 zeigten sich im Bereich zwischen $t_R = 8.2$ min und $t_R = 8.9$ min zusätzlich zum Hauptprodukt *Epi*-Isozizaen (92) ebenfalls Spuren von Nebenprodukten mit $m/z = 204$, wobei es sich um die in der Literatur beschriebenen Sesquiterpene (+)-Zizaen (91), (-)- α -Cedren (87), Sesquisabinen-A (84), Sesquiphellandren (82) und β -Farnesen (40) handeln könnte.^[61]

Der Extrakt der PenA-katalysierten Biotransformation weist neben dem Hauptprodukt Pentalenen (33) weitere Spuren von Sesquiterpenen auf, z. B. bei $t_R = 8.806$ min mit $m/z = 222$. Da die Existenz von Nebenprodukten von PenA bisher nicht bekannt ist, könnte es sich hierbei allerdings auch um ein Oxidationsprodukt durch Reaktion mit Luftsauerstoff handeln. Verunreinigungen können hingegen ausgeschlossen werden, da dieses Produkt in den Negativkontrollen nicht auftaucht. Spuren von Nebenprodukten finden sich außerdem im Produktgemisch von Bot2. Zusätzlich zum Hauptprodukt Presilphiperfolan-8- β -ol enthält es ein Produkt mit $m/z = 222$ und $t_R = 9.286$ min sowie mindestens drei Nebenprodukte mit $m/z = 204$ bei $t_R = 7.968$ min, $t_R = 8.047$ min bzw. $t_R = 8.337$ min.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Hauptprodukte der beiden Terpencyclasen Tps32 und Hvs1 sehr ähnliche Retentionszeiten aufweisen und identische Fragmentierungsmuster hervorbringen. Dies könnte ein Indiz für eine strukturelle Ähnlichkeit der beiden Produkte sein, was jedoch bei Vetispiradien und Viridifloren nicht der Fall ist. Außerdem können bei Tps32 Spuren weiterer Nebenprodukte mit $m/z = 204$ sowie $t_R = 8.838$ min bzw. $t_R = 9.112$ min ausgemacht werden, welche sich ebenso bei Hvs1 nachweisen lassen. Nachdem ausgeschlossen wurde, dass es zu einer Verwechslung der STCN gekommen ist, wurden aufgrund dieser Beobachtungen weitere Untersuchungen durchgeführt. Diese umfassten den genauen Vergleich der Retentionszeiten mittels

Koinjektion (Kapitel 3.2.2) sowie eine Produktcharakterisierung nach semipräparativer Biotransformation (Kapitel 3.6).

Es ist außerdem anzumerken, dass einige Chromatogramme Spuren von Weichmacher oder anderen Materialzusätzen mit $t_R > 13$ min aufweisen, die bereits zu beobachten sind, wenn das verwendete Lösungsmittel lediglich mit den Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen in Kontakt kommt. Da sich diese Signale weit außerhalb des betrachteten Bereichs befinden und zudem durch Negativkontrollen leicht identifiziert werden können, haben sie keinerlei Einfluss auf die Ergebnisse der *in vitro* Enzymtests.

3.2.2 Koinjektionsexperimente mit Tps32 und Hvs1

Aufgrund der Säulenabnutzung kann es bei den Messungen zur Feststellung der Enzymaktivität zu einer leichten Verschiebung der Retentionszeit kommen, so dass die Retentionszeiten identischer Verbindungen voneinander abweichen. Daher wurden zum Vergleich der natürlichen Produkte der STCn Hvs1 und Tps32, welche ein identisches Fragmentierungsmuster sowie eine ähnliche Retentionszeit aufwiesen, Koinjektionsexperimente mittels GC-MS durchgeführt. Dafür erfolgten zunächst zwei Biotransformationen von FPP mit Tps32 und Hvs1 im analytischen Maßstab. Nach der ersten GC-FID-Messung zur Ermittlung der Produktmenge wurden dessen Extrakte so vereint, dass die Hauptprodukte in gleichen Mengen vorlagen. Anschließend folgte eine zweite Messung, welche im Fall von Tps32 und Hvs1 nur zu einem einzelnen Peak mit dem entsprechenden Fragmentierungsmuster führte. Dies unterstützt die These, dass die gebildeten Produkte identisch sind. Eine Charakterisierung des Produkts erfolgte mittels NMR-Spektroskopie nach semipräparativer Biotransformation (Kapitel 3.6).

3.2.3 Optimierungsexperimente mit Tps32, GcoA und Cop4

Die Optimierung der Biotransformation erfolgte mit den Sesquiterpencyclasen Tps32, Cop4 und GcoA und diente dem Zweck, geeignete Bedingungen für die semipräparativen Biotransformationen zu ermitteln. Dafür wurde zunächst der Einfluss der Temperatur, des pH-Werts sowie des aus Schütteln resultierenden Lufteintrag bzw. der Scherkräfte auf die Aktivität und Stabilität der STCn untersucht. Des Weiteren wurde die Ausbeute der natürlichen Produkte in Abhängigkeit von der Substrat-, Enzym- und Mg-Konzentration bewertet. Die Experimente erfolgten im analytischen Maßstab (500 μ L) und wurden mittels GC-MS semiquantitativ analysiert. Dabei wurde neben der Ausbeute des Hauptprodukts auch häufig die Ausbeute von Nebenprodukten bestimmt. Letztere wurden jedoch, zur Übersichtlichkeit der Diagramme, nur in relevanten Fällen dargestellt.

Einfluss von Temperatur und Schüttelfrequenz auf die Stabilität und Aktivität von STCn

Während eine geringe Temperatur die Geschwindigkeit einer Reaktion herabsetzt, kann eine zu hohe Temperatur zur Denaturierung der Enzyme führen, welche üblicherweise mit Aktivitätseinbußen einhergeht. Neben den auftretenden Scherkräften, kann auch der Kontakt zu Luftsauerstoff durch Oxidation die Enzymstabilität minimieren, weshalb starkes Schütteln ebenfalls zur Präzipitation führen kann. Zur Ermittlung der optimalen Temperatur der GcoA-katalysierten Biotransformation von FPP (8) wurde ein Temperaturbereich von 20 °C – 40 °C untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit von GcoA bei der Bildung des Hauptprodukts (+)-Caryolan-1-ol (95), dessen Optimum mit 30 °C – 33 °C den Literaturangaben entspricht (Abbildung 21).^[62] Da die Inkubation der Testreaktionen nur für 30 min erfolgte, sollte die Ausbeute nicht nennenswert durch

temperaturbedingte Enzympräzipitation beeinflusst werden. Langfristigere Untersuchungen zeigten jedoch, dass GcoA bei Temperaturen über 25 °C und leichtem Schütteln zur Präzipitation neigt. Außerdem zeigte sich, dass eine Lagerung bei 30 °C schon nach etwa 2 h zu Aktivitätseinbußen führen kann. Die Temperatur bei späteren semipräparativen Biotransformationen sollten daher ein Kompromiss aus der idealen Temperatur für die enzymatische Produktbildung und einer Temperatur, bei der die STC über mehrere Stunden hinweg stabil ist, darstellen. Zudem könnte die Konzentration an DTT erhöht werden, um die Oxidation des Proteins zu verhindern.

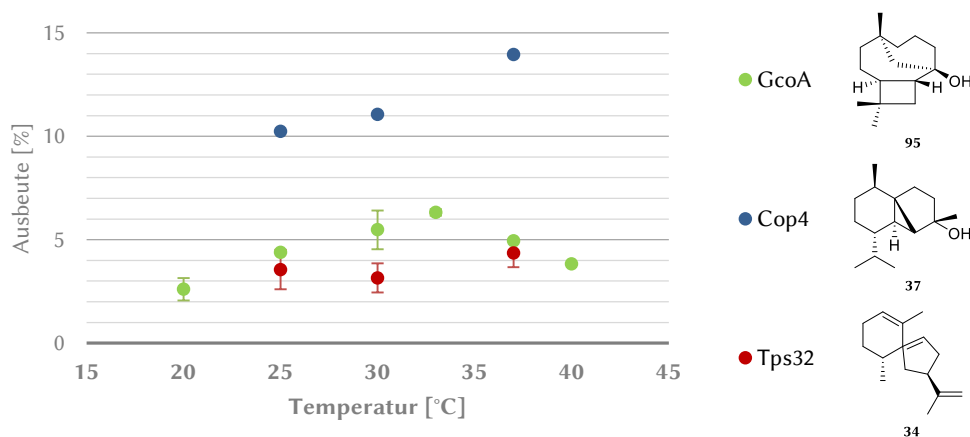


Abbildung 21: Ausbeute der Hauptprodukte von GcoA ((+)-Caryolan-1-ol (95)), Cop4 (Cubebol (37)) und Tps32 (Vetispiradien (34)) bei verschiedenen Temperaturen. Die Enzymtests mit Cop4 wurden mit 50 μ M FPP durchgeführt, während für die anderen Tests 150 μ M FPP (8) verwendet wurde. Da starke Ausreißer nicht in die Quantifizierung einfließen, konnte in manchen Fällen aufgrund fehlender Vergleichswerte keine Standardabweichung angegeben werden. In diesen Fällen beruht die durchschnittliche Ausbeute nur auf zwei Werten.

Bei Cop4 wurde der Einfluss der Temperatur auf die Bildung des komplexen Hauptprodukts Cubebol (37) und des makrozyklischen Nebenprodukts Germacren D (64) untersucht. Während die Entstehung von Germacren D unabhängig von der Temperatur war, zeigte Cop4 die größte Aktivität zur Bildung von Cubebol bei 37 °C. Eine höhere Temperatur wurde nicht untersucht, da höhere Temperaturen die Denaturierung von Enzymen fördert und Cop4 daher vermutlich nicht mehr ausreichend stabil für mehrstündige Reaktionen wäre. Obwohl Cop4 zunächst unter möglichen semipräparativen Bedingungen bei 30 °C und 150 Upm keine Präzipitation zeigte, kam es nach 3 h Lagerung bei 30 °C zu signifikanten Aktivitätseinbußen. Im Gegensatz zu Cop4 und GcoA konnte bei Tps32 im Bereich zwischen 25 °C und 37 °C kein signifikanter Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Vetispiradien (34) beobachtet werden. Obwohl zumindest nach 2 h Lagerung bei 30 °C keine Aktivitätseinbußen zu beobachten sind, legten Experimente zum Einfluss der Schüttelfrequenz und der Temperatur auf die Enzymstabilität nahe, dass die Kombination aus hoher Temperatur und hoher Schüttelfrequenz vermieden werden sollte, da die Proteinpräzipitation ansonsten begünstigt ist.

Einfluss des pH-Werts auf die Enzymaktivität

Aufgrund der pH-abhängigen Struktur von Enzymen und der pH-abhängigen Ladung der Aminosäuren hat der pH-Wert meist einen großen Einfluss auf die Aktivität von Enzymen. Zur Ermittlung des optimalen pH-Werts für GcoA-katalysierte Biotransformationen wurde ein pH-Bereich von 6.2 – 10 untersucht (Abbildung 22). Da die Werte der Dreifachbestimmung häufig schwankten, konnte zwar kein eindeutiges Optimum für die Bildung des Hauptprodukts (+)-Caryolan-1-ol (95) ermittelt werden, allerdings deuten die Ergebnisse auf ein Optimum bei pH 7.5 hin, was mit den Literaturangaben übereinstimmt.^[62] Die beobachtete Erhöhung der Ausbeute bei pH 10 wurde nicht

näher untersucht. Eine Erklärung könnte das verwendete Puffersystem darstellen, welches entweder einen positiven Einfluss auf die Umsetzung von FPP hat oder einfach nur die Produktextraktion begünstigt. Die mit zunehmenden pH-Wert steigende Ausbeute des Nebenprodukts β -Caryophyllen (94) wurde ebenfalls durch NAKANO beschrieben. Der Anteil am Gesamtprodukt ist jedoch so gering, dass es keinen nennenswerten Einfluss auf die Bildung von (+)-Caryolan-1-ol haben sollte.

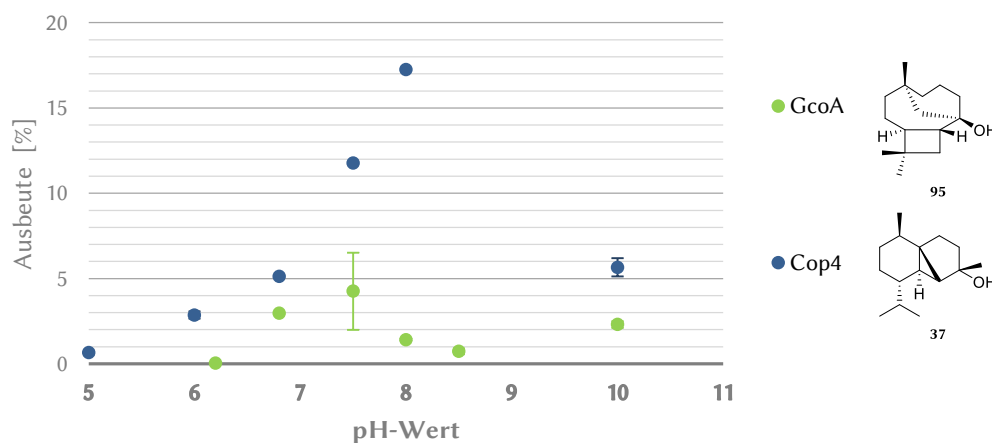


Abbildung 22: Ausbeute an Hauptprodukt von GcoA ((+)-Caryolan-1-ol (95)) und Cop4 (Cubebol (37)) bei verschiedenen pH-Werten. Die Enzymtests mit Cop4 wurden mit 25 μ M bzw. 30 μ M FPP durchgeführt, während für GcoA 150 μ M FPP (8) verwendet wurden. Da starke Ausreißer nicht in die Quantifizierung einfließen, konnten in manchen Fällen aufgrund fehlender Vergleichswerte keine Standardabweichungen angegeben werden. In diesen Fällen beruht die durchschnittliche Ausbeute nur auf zwei Werten.

Da bereits gezeigt wurde, dass Cop4 auch bei pH 5 und 10 aktiv ist^[20], erfolgte die Ermittlung des optimalen pH-Werts von Cop4 in einem breiten Bereich von pH 5 – 10. Dabei zeigte sich für die Bildung des Hauptprodukts Cubebol (37) ein Optimum bei pH 8. Da keine Messung bei pH 9 erfolgte, könnte das pH-Optimum auch etwas höher liegen. Allerdings fällt die Ausbeute bei pH 10 wieder deutlich ab, so dass unter Annahme einer symmetrischen Kurve von einem Optimum bei pH 8 ausgegangen wird. Das am stärksten vertretene Nebenprodukt von Cop4, (-)-Germacren D (64), wird bevorzugt bei pH 5 gebildet. Diese Beobachtung stimmt mit vorherigen Studien zur pH-Abhängigkeit von Cop4 überein.^[20] Die Ausbeute an (-)-Germacren D sinkt bis pH 6.8 und steigt ab pH 8 wieder leicht an. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass das Optimum für die Bildung von Cubebol im neutralen pH-Bereich liegen muss, da Germacren D ein Intermediat bei der Cubebol-Bildung darstellt. Zur Optimierung des pH-Werts von Tps32 konnten bisher keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden.

Einfluss der Substratkonzentration

Der Einfluss der Substratkonzentration der drei STCN wurde untersucht, um eine Substrathemmung zu prüfen (Abbildung 23). Diese konnte zwar letztendlich bei allen drei Enzymen beobachtet werden, eine Substratkonzentration, bei der eindeutig keine Hemmung mehr zu beobachten ist, wurde allerdings nicht ermittelt. Dafür hätten die Enzymtests in größerem Maßstab wiederholt und mit weniger als 5 mM Substrat durchgeführt werden müssen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Solche geringen Konzentrationen sind für präparative Biotransformationen jedoch als nicht relevant anzusehen. Aufgrund der Substrathemmung wurden 10 μ M Substrat als eine geeignete Konzentration für Biotransformationen mit GcoA und Tps32 angenommen. Da die Hemmung bei Cop4 nur in Bezug

auf das Nebenprodukt Germacren D (64) beobachtet werden konnte, dürfte eine präparative Biotransformation hingegen auch mit einer höheren Konzentration von 50 μM Substrat gelingen.

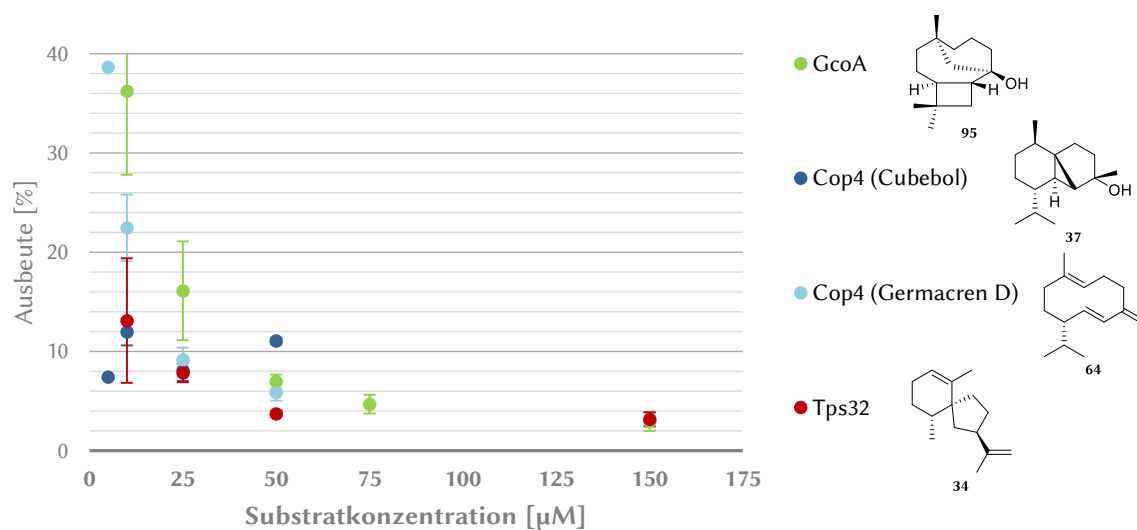


Abbildung 23: Ausbeute der Hauptprodukte von GcoA ((+)-Caryolan-1-ol (95)), Tps32 (Vetispiradien (34)) und Cop4 (Cubebol (37)) sowie des Nebenprodukts von Cop4 ((-)-Germacren D (64)) bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Enzym- und Mg-Konzentration

Um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der Enzymkonzentration mit einer Verbesserung der Ausbeute einhergeht, wurden verschiedene Enzymkonzentrationen untersucht. Da eine größere Enzymmenge auch eine größere Menge an Cofaktor benötigt, wurde parallel dazu verschiedene Mg-Konzentration erprobt. Enzymtests mit Cop4 und Tps32 zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied bei der Variation der Mg- und Enzym-Konzentrationen (Abbildung 24). Für Biotransformationen mit GcoA konnten aufgrund von starken Schwankungen ebenfalls keine Ergebnisse erhalten werden, die für eine deutliche Erhöhung der Mg- und Enzym-Konzentrationen sprechen.

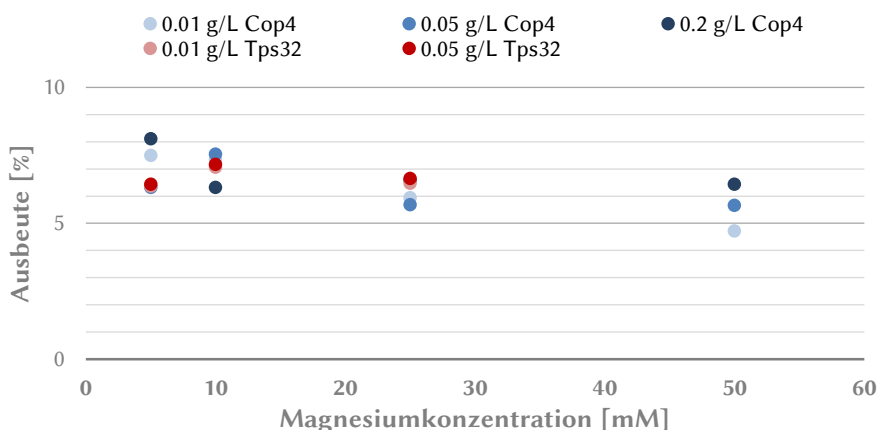


Abbildung 24: Ausbeute an Hauptprodukt von Cop4 (Cubebol (37)) und Tps32 (Vetispiradien (34)) bei verschiedenen Protein- und Magnesiumkonzentrationen.

3.3 Synthese von Farnesylpyrophosphat-Derivaten

Analog zu den bereits vorhandenen Farnesyl-Derivaten mit Ether- oder Methylaminofunktion^[87,88] sollten zwei thioetherfunktionalisierte Farnesyl-Analoga (138 und 139) dargestellt werden. Die Vorgehensweise orientierte sich dabei an der Synthese der etherfunktionalisierten Farnesyl-Derivate durch SEIDEL.^[87] Anschließend erfolgte die Überführung in die entsprechenden Pyrophosphate.

3.3.1 Darstellung von thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivaten

Entsprechend der Retrosynthese der Farnesyl-Derivate 138 und 139 (Abbildung 25) soll die Einführung eines Schwefel-Atoms in das Farnesyl-Grundgerüst durch eine nukleophile Substitution zwischen einem allylischen Thiol (140 oder 144) und einem Bromid (141 oder 145) erfolgen. Dabei wird der modulare Aufbau der Terpene genutzt, indem ein C₁₀-Körper mit einem C₅-Körper verknüpft wird.

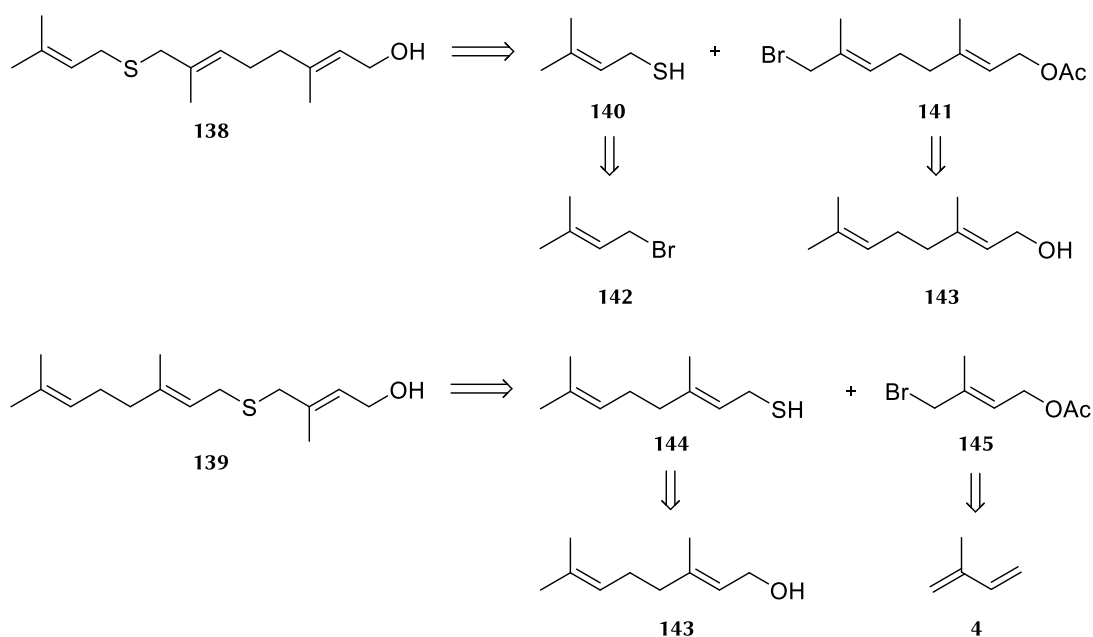
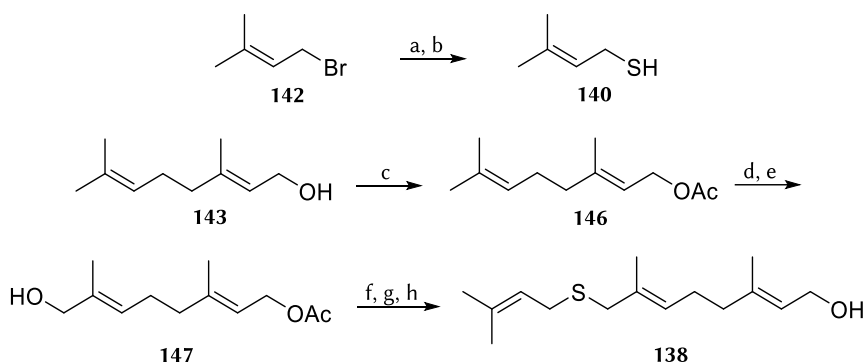


Abbildung 25: Retrosynthese der Farnesyl-Derivate 138 und 139 ausgehend von Prenylbromid (142), Geraniol (143) und Isopren (4).

Die Synthese des Farnesyl-Derivats 138 erfolgte ausgehend von Prenylbromid (142) und Geraniol (143). Das Bromid 142 wurde zunächst mit Thioharnstoff umgesetzt. Das dabei entstandene Salz wurde anschließend unter basischen Bedingungen hydrolysiert, wobei das Thiol 140 gebildet wurde (Schema 18).



Schema 18: Darstellung des thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivats **138**. Reaktionsbedingungen: a) Thioharnstoff, Ethanol, 3 h, Rückfluss; b) NaOH, 3 h, 70 °C, 83 % (über zwei Stufen); c) K₂CO₃, 4-DMAP, Essigsäureanhydrid, EtOAc, RT, 1 h, 98 %; d) SeO₂, tBuOOH, Salicylsäure, H₂O, CH₂Cl₂, 0 °C, 42 h; e) NaBH₄, MeOH, -5 °C, 1 h, 47 % (über zwei Stufen); f) NBS, PPh₃, CH₂Cl₂, -20 °C, 2 h, 66 %; g) NaH, DMF, 0 °C → RT, 30 min, dann **140**, TBAI, 0 °C → RT; 18 h h) MeONa, MeOH, 0 °C → RT, 2 h, 69 % (über zwei Stufen).

Geraniol (**143**) wurde mit einer Acetatschutzgruppe versehen und durch eine Selendioxid-katalysierte RILEY-Oxidation hydroxyliert.^[89] Dabei unterstützt die Acetat-Schutzgruppe eine allylische Oxidation des Geranylacetats, bei der das *E*-Isomer durch Stabilisierung des Übergangszustands als Hauptprodukt entsteht. (Abbildung 26). Dennoch kommt es zur Entstehung von Nebenprodukten, da weitere allylische Positionen zur Oxidation zur Verfügung stehen. Des Weiteren kann es zur Bildung des Aldehyds kommen, weshalb direkt im Anschluss mit Natriumborhydrid reduziert wurde. Die Ausbeute der Oxidation von Geranylacetat (**146**) zu Hydroxygeranylacetat (**147**) ist mit der Literaturausbeute konform.^[90]

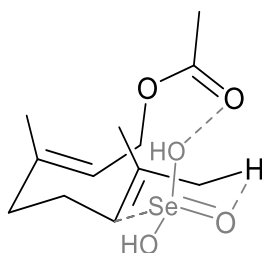


Abbildung 26: Übergangszustand der Selendioxid-katalysierten RILEY-Oxidation von Geranylacetat (**146**).

Nach der Überführung des Alkohols **147** in das Bromid **141** durch *N*-Bromsuccinimid (NBS) sollte eine nukleophile Substitution mit dem Thiol **140** durchgeführt werden um Thioether **148** zu erhalten (Abbildung 27).

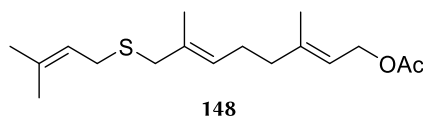


Abbildung 27: Acetat-geschützter Thioether **148**.

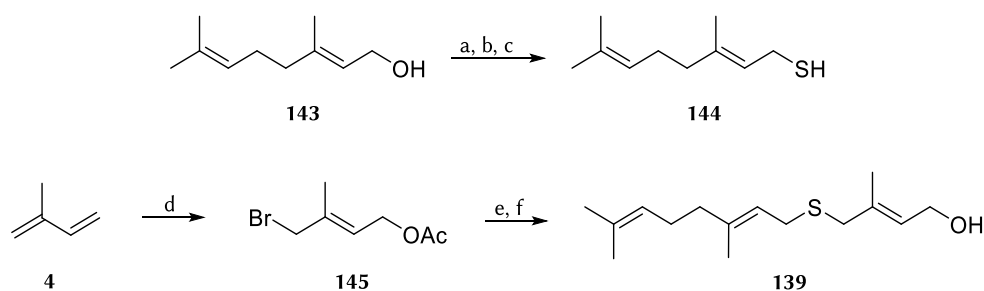
Dafür wurden verschiedene Bedingungen getestet (Tabelle 3) und zunächst mittels GC-MS analysiert. Die anfängliche Verwendung verschiedener Basen in THF erbrachte nur eine geringe Bildung des Thioethers **148** mit starken Verunreinigungen (Tabelle 3, Einträge 1-6). Erst der Einsatz von Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) in DME führte zu einer selektiven Bildung des Thioethers (Tabelle 3, Eintrag 7). Mittels TBAI konnte die Reaktivität des primären Kohlenstoffes gegenüber der vinylogenen Position durch eine *in situ* Finkelsteinreaktion erhöht werden. Die Ausbeute konnte durch

die Verwendung von DMF zusätzlich gesteigert werden (Tabelle 3, Eintrag 8). Eine anschließende Entfernung der Schutzgruppe lieferte das thioetherfunktionalisierte Farnesyl-Derivat **138** in einer Gesamtausbeute von 21 % über sechs lineare Stufen.

Tabelle 3: Bedingungen für die nukleophile Substitution zur Bildung von Thioether **148**.

Eintrag	Reagenzie n	Lösungsmittel l	Temperatur	Zeit	Ergebnis
1	NaH	THF	RT	2 h	148 + Verunreinigungen
2	NaH	THF	0 °C → RT	18 h	148 + Verunreinigungen
3	n-BuLi	THF	-78 °C → RT	18 h	148 + Verunreinigungen
4	LiHMDS	THF	-40 °C → RT	18 h	Spuren von 148 + Verunreinigungen
5	KHMDS	THF	-40 °C → RT	18 h	Kein Umsatz
6	NaHMDS	THF	-40 °C → RT	18 h	Spuren von 148 + Verunreinigungen
7	NaH, TBAI	DME	0 °C → RT	18 h	85 %
8	NaH, TBAI	DMF	0 °C → RT	18 h	quant.

Die Synthese des Farnesyl-Derivats **139** erfolgte ausgehend von Isopren (**4**) und Geraniol (**143**). Letzteres wurde zunächst mittels Phosphortribromid in das entsprechende Bromid (**149**) überführt und dann ebenso, wie für das Farnesyl-Derivat **138**, mit Thioharnstoff zum entsprechenden Thiol **144** umgesetzt (Schema 19).

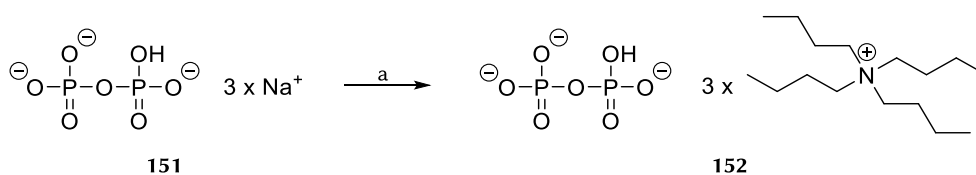


Schema 19: Darstellung des thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivats **139**. Reaktionsbedingungen: a) PBr₃, Et₂O, RT, 2 h, 99 %; b) Thioharnstoff, Ethanol, 90 °C, 3 h; c) NaOH, 80 °C, 5 h, 54 % (über zwei Stufen); d) Essigsäure, NBS, 0 °C → RT, 17 h, 27 %; e) NaH, DMF, 0 °C → RT, 30 min, dann **144**, TBAI, 0 °C → RT; f) MeONa, MeOH, 0 °C → RT, 2 h, 55 % (über zwei Stufen).

An Isopren (**4**) wurde eine Bromoacetylierung mit *N*-Bromsuccinimid und Essigsäure durchgeführt. Aufgrund diverser Nebenreaktionen wurde das Bromid **145** dabei nur in einer Ausbeute von 27 % erhalten, welche minimal geringer ist, als die in der Literatur angegebene. Diese Reaktion ist dennoch der mehrstufigen Darstellung des Bromids **145** aus Prenol vorzuziehen, da angenommen werden kann, dass diese alternative Route, vergleichbar mit der Bildung von Bromid **141**, eine ähnlich geringe Ausbeute liefern würde. Die nukleophile Substitution zur Bildung des entsprechenden Acetatgeschützten Thioethers erfolgte unter den zuvor ermittelten Bedingungen mit TBAI und DMF zur Erzeugung des Derivats **148**. Nach Entschützung konnte das thioetherfunktionalisierte Farnesyl-Derivat **139** in einer Ausbeute von 29 % über fünf lineare Stufen erhalten werden.

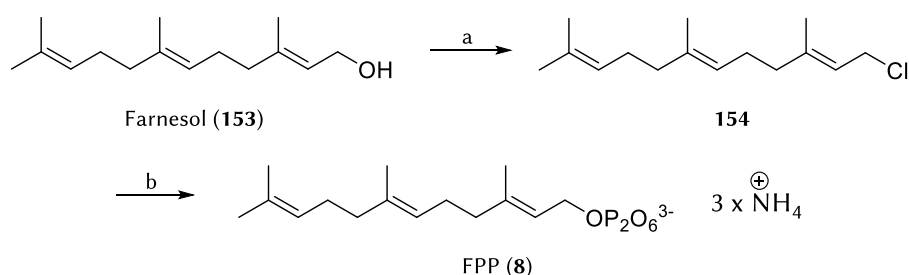
3.3.2 Synthese der Pyrophosphate

Nach der Synthese der thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivate **138** und **139** wurden diese in die entsprechenden Pyrophosphate (**155b** und **156b**) überführt, welche als Substrate für Sesquiterpencyclasen (STCn) dienen. Dafür wurde die Methode nach DAVISSON *et al.* verwendet, welche bereits zur Synthese anderer Farnesyl-Derivate genutzt wurde und sich dabei gegenüber der Methode von KELLER als geeigneter erwiesen hatte.^[87,88,91] Die Darstellung des Pyrophosphorylierungsreagenz Tris(tetra-butylammonium)hydrogenpyrophosphat (**152**) erfolgte ausgehend von dem entsprechenden Natriumphosphatsalz **151** durch Ionenaustausch ($\text{Na}^+ \rightarrow \text{H}^+$) und anschließender Titration mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (Schema 20).



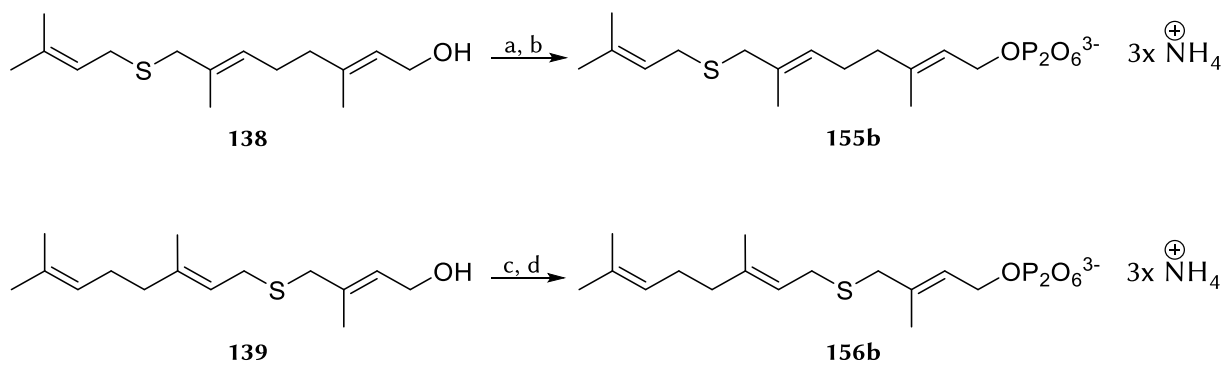
Schema 20: Darstellung des Pyrophosphorylierungsreagenz **152**. Reaktionsbedingungen: a) NH_3 , H_2O , Dowex AG 50W-X8 (H^+ -Form), dann Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid, 92 %.

Die Pyrophosphorylierung wurde zunächst an (*E,E*)-Farnesol (**153**) getestet, da das resultierende FPP (**8**) ebenfalls als Substrat für die Sesquiterpencyclasen benötigt wurde. Dafür wurde Farnesol mittels COREY-KIM-Oxidation mit *N*-Chlorsuccinimid und Dimethylsulfid in das Chlorid **154** überführt (Schema 21). Testreaktionen zeigten, dass diese Methode gegenüber der Variante nach MUKAIYAMA mit *N*-Chlorsuccinimid und Triphenylphosphan sowie gegenüber der Umsetzung mit Phosphortribromid in das entsprechende Bromid bevorzugt ist. Anschließend wurde das Chlorid **154** ohne weitere Reinigung mit dem Pyrophosphorylierungsreagenz **152** umgesetzt. Es folgten ein Ionenaustausch in das entsprechende Ammonium-Salz (**8**) sowie eine Reinigung durch Fällung von anorganischen Salzen. Dabei konnte FPP mit einer Ausbeute von 79 % über zwei Stufen erhalten werden.



Schema 21: Darstellung von FPP (**8**) aus Farnesol (**153**). Reaktionsbedingungen: a) NCS , SMe_2 , CH_2Cl_2 , $-40\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2 h; b) $\text{P}_2\text{O}_7(\text{NBu}_4)_3$ (**152**), MeCN , RT , 2 h, dann Dowex AG 50W-X8 (NH_4^+ -Form), 79 % (über zwei Stufen).

Die Überführung der thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivate in die entsprechenden Pyrophosphate erfolgte nach dem gleichen Prinzip (Schema 22). Dabei konnte Derivat **155b** in einer Ausbeute von 81 % und Derivat **156b** in einer Ausbeute von 61 %, jeweils über zwei Stufen, erhalten werden.



Schema 22: Darstellung der Pyrophosphate **155b** und **156b**. Reaktionsbedingungen: a) NCS, SMe₂, CH₂Cl₂, -40 °C → RT, 2 h; b) P₂O₇(NBu₄)₃ (**152**), MeCN, RT, 3 h, dann Dowex AG 50WX8 (NH₄⁺-Form), 81 % (über zwei Stufen); c) NCS, SMe₂, CH₂Cl₂, -40 °C → RT, 2 h; d) P₂O₇(NBu₄)₃ (**152**), MeCN, RT, 3 h, dann Dowex AG 50WX8 (NH₄⁺-Form), 61 % (über zwei Stufen).

3.4 Akzeptanz von allylischen Pyrophosphaten mit zusätzlichen Heteroatomen

Die sechs FPP-Analoga **155a-c** und **156a-c** wurden als mögliche Substrate für die mittels heterologer Expression hergestellten Sesquiterpencyclasen (STCn) untersucht (Abbildung 28). Diese wurden zuvor im Rahmen der vorliegenden Arbeit bzw. durch SCHRÖDER und SEIDEL synthetisiert.^[87,88] Die *in vitro* Tests zur Substratakzeptanz erfolgten im analytischen Maßstab und die Analytik mittels GC-MS. Zur Identifizierung ausgewählter Produkte wurden im Anschluss Biotransformationen im semi-präparativen Maßstab durchgeführt und die Produkte durch NMR-spektroskopische Untersuchungen charakterisiert (Kapitel 3.6).

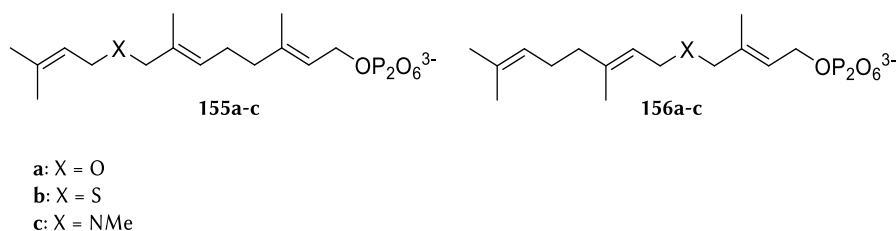


Abbildung 28: Heteroatomfunktionalisierte FPP-Derivate.

Die *in vitro* Tests mit den FPP-Derivaten **155a-c** und **156a-c** erfolgten unter den gleichen Bedingungen, wie der zuvor beschriebene Nachweis der Enzymaktivität (Kapitel 3.2), d.h. in einem Volumen von 500 μL mit 0.01 g/L STC, 5 mM MgCl_2 und 150 μM Substrat. Als Reaktionspuffer diente ebenfalls der gleiche Puffer, der bereits für die Aktivitätstests verwendet wurde. Die Enzymtests wurden bei 37 $^\circ\text{C}$ für 30 min inkubiert und anschließend mit 100 μL *n*-Hexan oder *n*-Pentan extrahiert.

Die verhältnismäßig hohe Temperatur wurde in der Erwartung, dass diese die Substrattoleranz erhöht, gewählt. Diese Annahme begründet sich auf Studien zu Cyc1 und Cop4, welche bei hohen Temperaturen eine Steigerung der Produktpromiskuität zeigten.^[20,61] Da höhere Temperaturen die Proteinstruktur flexibler machen, ist es naheliegend, dass dabei auch die Substratspezifität steigt.

Die Auswertung der Enzymtests erfolgte durch massenspektrometrische Analyse. Dabei wurden üblicherweise Signale mit den entsprechenden Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z), welche nicht in den Negativkontrollen detektierbar sind, als Produkte gewertet. Negativkontrollen wurden äquivalent, jedoch in Abwesenheit der STC, durchgeführt und aufgearbeitet. Anhand dieser initialen Tests erfolgte in einigen Fällen bereits eine ungefähre Einschätzung der Substratakzeptanz anhand der Peakfläche der detektierten Produkte, welche im späteren Verlauf mittels semiquantitativer Ausbeutebestimmung konkretisiert wurde.

Terpenoide mit identischem Fragmentierungsmuster und ähnlicher Retentionszeit wurden zunächst vorläufig als identisch zugeordnet bis ein Vergleich durch Koinjektionsexperimente erfolgte. Aufgrund der Säulenalterung kann es im Verlauf der Messungen zu einer leichten Verschiebung der Retentionszeit kommen, so dass die Retentionszeiten identischer Verbindungen voneinander abwichen. Daher sind die Retentionszeiten der identischen Produkte nicht grundsätzlich deckungsgleich, weshalb vor allem die Fragmentierungsmuster für den initialen Vergleich verwendet wurden.

Für die Koinjektionsexperimente wurden zunächst einzelne analytische Enzymtests durchgeführt und der Produktgehalt der Extrakte anschließend mittels GC-FID ermittelt. Die Extrakte aus jeweils zwei Enzymtests wurden dann so vereint, dass die zu vergleichenden Produkte in gleichen Mengen vorlagen. Es folgte eine zweite Messung, welche bei identischen Produkten nur zu einem einzelnen

Peak des entsprechenden Produkts führt, während unterschiedliche Produkte im Idealfall zwei Peaks hervorbringen sollten.

Die semiquantitative Bestimmung der Ausbeuten erfolgreicher Biotransformationen erfolgte mittels GC-FID-Analyse in Drei- oder Vierfachbestimmung und unter Verwendung eines molaren Responsefaktors. Als interner Standard fanden dafür Farnesol (153) oder β -Caryophyllen (94) Verwendung.

Die Enzymtests zur Ausbeutebestimmung erfolgten analog zu den bisherigen analytischen Enzymtests mit einer STCn-Konzentration von 0.01 g/L und 5 mM MgCl₂. Da vorherige Optimierungsexperimente mit FPP eine Substrathemmung bei Cop4, GcoA und Tps32 zeigten (Kapitel 3.2.3), wurde eine Substratkonzentration von 10 μ M verwendet, um den Einfluss der Substrathemmung so gering wie möglich zu halten. Zwar könnte bei dieser Konzentration noch eine geringe Substrathemmung vorliegen, jedoch sind niedrigere Produktmengen mittels GC-FID nur schwer detektierbar.

Um die Detektion durch Steigerung der injizierten Produktmenge zu verbessern, wurde das Volumen der Enzymtests auf 1 mL erhöht, während die Extraktion jedoch weiterhin mit 100 μ L *n*-Hexan erfolgte. Außerdem wurde die Inkubationstemperatur der Enzymtests variiert, um den Einfluss der Temperatur auf die Ausbeute zu untersuchen, da die Kenntnis über eine bevorzugte Temperatur für die Durchführung von semipräparativen Biotransformationen von Vorteil sein dürfte.

3.4.1 Analytische Enzymtests mit den etherfunktionalisierten Derivaten 155a und 155b

Die Biotransformation der FPP-Derivate 155a und 156a wurde mit acht verschiedenen STCn getestet und mittels GC-MS-Analyse ausgewertet. Dabei zeigten die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2, die Cubebolsynthase Cop4, die Pentalenensynthase PenA sowie die Vetispiradiensynthesen Hvs1 und Tps32 die Akzeptanz und Transformation der Derivate durch einen oder mehrere signifikante Peaks. Die Umsetzung der etherfunktionalisierten FPP-Analoga durch die (+)-Caryolan-1-ol-Synthase GcoA konnte hingegen nur in sehr geringen Mengen detektiert werden. Die entstandenen Produkte weisen ein $m/z = 220$ oder $m/z = 238$ auf, je nachdem, ob die Zyklisierungskaskade durch Deprotonierung oder Addition von Wasser beendet wurde. Allerdings ist die massenspektrometrische Bestimmung der Molekülmasse mit Elektronensprayionisation nicht besonders zuverlässig, da häufig Wasser eliminiert wird und somit nicht im vermeintlichen Molekülpeak erscheint.

Aus dem FPP-Derivat 155a bildeten alle STCn, mit Ausnahme der *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 und der Trichodiensynthase Tri5, welche 155a nicht als Substrat akzeptierten, das Produkt 160 (Tabelle 4). Dieses entstand in Hvs1- und Tps32-katalysierten Biotransformationen als alleiniges Hauptprodukt, während durch Bot2 und Cop4 zusätzlich ein oder mehrere Nebenprodukte gebildet wurden (Abbildung 29). Das Nebenprodukt 162 von Cop4 konnte bisher nicht als Produkt anderer STCn detektiert werden, wohingegen das Nebenprodukt 161 von Bot2 identisch mit dem Hauptprodukt von PenA war. Außerdem fand sich das Nebenprodukt 158 in beiden Produktgemischen. Weitere Nebenprodukte von PenA und Bot2 (157, 159 und 164) sowie das Hauptprodukt 163 von GcoA ließen sich nicht in Produktgemischen anderer STCn detektieren.

Tabelle 4: Produkte aus der Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Derivats 155a durch verschiedenen STCn. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 155a				
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
Bot2	157	9.471	2	220
	158	9.668	11	220
	159	9.755	4	220
	160	9.813	55	238 ⁶
	161	10.937	28	220 ⁷
Cop4	162	9.288	39	220
	160	9.474	61	238
GcoA	160	9.808	17	238
	163	10.636	83	238
Hvs1	160	9.808	100	238
PenA	158	9.307	26	220
	160	9.444	11	238
	164	9.882	4	220
	161	10.583	59	220
Tps32	160	9.808	100	238

Die GC-MS-Analyse der Biotransformationen mit 155a und 156a offenbarte zudem mehrere sehr schwache Signale, deren Masse-Ladungs-Verhältnis und deren Fragmentierungsmuster typisch für etherfunktionalisierte Sesquiterpenoide sind. Da die geringe Produktmenge allerdings keine genaue Analyse der Fragmentierungsmuster zuließ, konnte nicht immer eindeutig zwischen Nebenprodukt und Verunreinigung unterschieden werden. Dementsprechend wurde auf die detaillierte Auswertung der in Spuren vorliegenden Nebenprodukte verzichtet. Die Schwierigkeiten der Unterscheidung

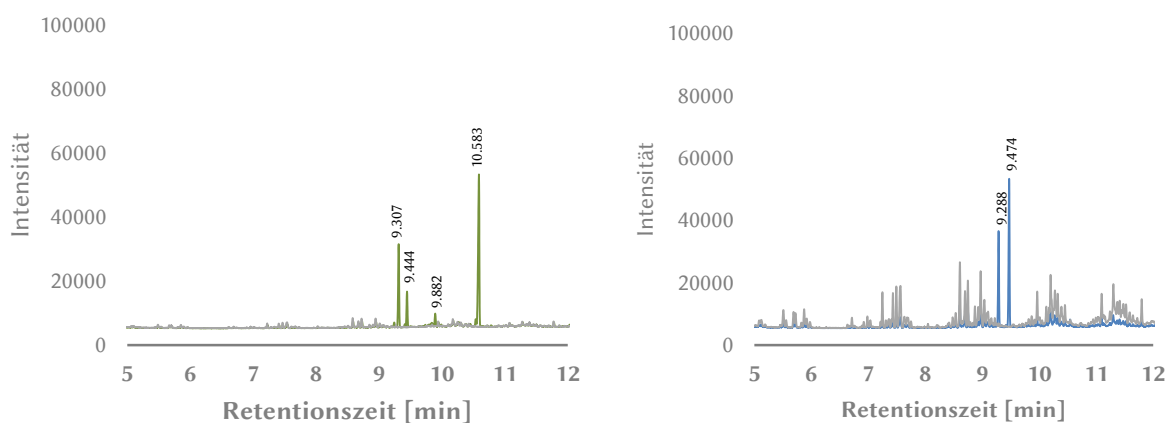


Abbildung 29: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von 155a durch PenA (grün) und Cop4 (blau) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau).

⁶ Erste massenspektrometrische Untersuchungen des Produkts 160 wiesen auf ein $m/z = 220$ hin. Diese Annahme konnte nach NMR-spektroskopischer Analyse korrigiert werden. Die anfängliche Fehleinschätzung beruht auf der Eliminierung von Wasser und lässt sich bei anderen etherfunktionalisierten Produkten nicht ausschließen.

⁷ Ebenso wie bei Produkt 160 lässt sich bei massenspektrometrischer Untersuchung von 161 ein $m/z = 220$ beobachten. Aufgrund der hohen Retentionszeit könnte es sich bei dem Produkt jedoch ebenfalls um einen Alkohol handeln.

Zwischen Produkt und Verunreinigung begründet sich in verschiedenen Signale in allen Negativkontrollen, deren Ursache auf Rückstände aus der Derivat-Synthese zurückzuführen sein dürfte.

Zum Vergleich der aus dem etherfunktionalisierten FPP-Derivat **155a** gebildeten Produkte wurden Koinjektionsexperimente mittels GC-MS durchgeführt. Dabei wurden die Verbindungen verglichen, die ein identisches Fragmentierungsmuster aufweisen, um zu überprüfen, ob es sich um identische Produkte handeln könnte. Die beiden Produkte **160** und **161** werden sowohl von PenA als auch von Bot2 aus dem etherfunktionalisierten FPP-Derivat **155a** erzeugt, weisen jedoch aufgrund der Säulenalterung im Chromatogramm unterschiedliche Retentionszeiten auf (Tabelle 4). Die durch Vergleich der Fragmentierungsmuster aufgestellte Vermutung, dass es sich dennoch um identische Produkte handelt, wurde durch die Ergebnisse der Koinjektion unterstützt. Weitere Koinjektionsexperimente bekräftigen zudem die These, dass **160** nicht nur von PenA und Bot2 sondern auch von Cop4, Tps32 und Hvs1 gebildet wird. Die Übereinstimmung mit dem Nebenprodukt von GcoA (**160**) konnte aufgrund der geringen Ausbeute nicht verifiziert werden, so dass diese Annahme weiterhin nur auf einem identischen Fragmentierungsmuster basiert.

Um ein besseres Verständnis für die Biotransformationen der unnatürlichen FPP-Analoga zu erhalten, wurden die Ausbeuten der Enzymtests im analytischen Maßstab bestimmt. Die Ausbeute des Sesquiterpenoids **160** als Hauptprodukt von Bot2, Cop4 und Tps32 lag im Mittel bei 5 % (Abbildung 30), mit Ausnahme von Hvs1, welches das etherfunktionalisierte Derivat **155a** nur zu 1 % umsetzte. Für die Durchführung semipräparativer Biotransformationen gab es keine Hinweise auf eine STC, die eine signifikant höhere Ausbeute als andere Enzyme lieferte, so dass diese mit Cop4, Tps32 und Bot2 ähnliche Ergebnisse liefern sollten. Die Ausbeute des Cop4-Nebenprodukts **162** war mit durchschnittlich 5 % in Biotransformationen bei 30 °C nur unwesentlich geringer als die Ausbeute des Hauptprodukts.

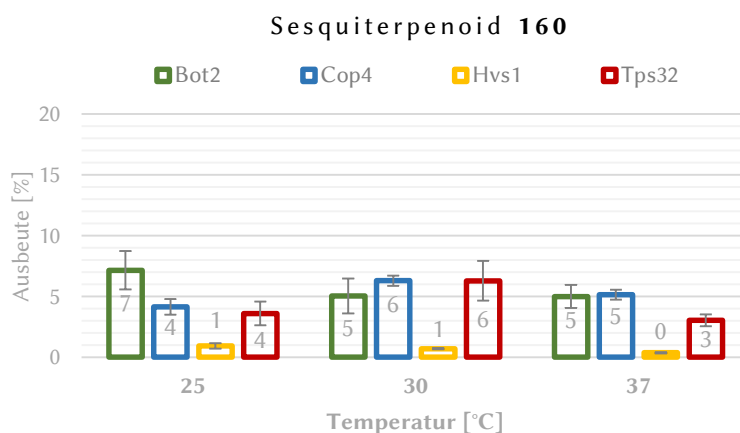


Abbildung 30: Ausbeute des Sesquiterpenoids **160** durch Tps32-, Cop4-, Hvs1- und Bot2-katalysierte Biotransformationen des etherfunktionalisierten Derivats **155a** bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Ausbeute des Sesquiterpenoids **160** als Nebenprodukt der PenA- und GcoA-katalysierten Biotransformationen lag bei maximal 1 % und wurde daher nicht näher bestimmt. Gleiches gilt für das Hauptprodukt **163** von GcoA und das Hauptprodukt **161** von PenA. Letzteres wurde zudem als Nebenprodukt der Bot2-katalysierten Biotransformation von **155a** in weniger als 2 % Ausbeute gebildet. Die geringe Ausbeute der Biotransformationen von **155a**, ist vermutlich in Teilen auf die lange Lagerung des Substrats zurückzuführen, welches im Rahmen von NMR-spektroskopischer Untersuchungen geringe Zersetzungserscheinungen zeigte.

Das zweite etherfunktionalisierte FPP-Derivat **156a** wurde von Hvs1, Tps32, Bot2, GcoA, PenA und Cop4 zu Produkt **166** umgesetzt (Tabelle 5). Auch hier katalysierten Hvs1 und Tps32 nur die Bildung eines einzelnen Hauptprodukts, so dass beide STCn daher gut für eine biokatalytische Darstellung geeignet erschienen. Cop4 bildete hingegen neben dem Hauptprodukt **166** noch das Nebenprodukt **167**.

Tabelle 5: Produkte aus der Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Derivats **156a** durch verschiedenen STCn. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 156a				
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
Bot2	168	9.879	84	220
	166	10.282	16	220
Cop4	167	10.197	13	220
	166	10.282	87	220
GcoA	166	10.277	44	220
Hvs1	166	10.293	100	220
PenA	169	9.868	35	220
	170	9.929	28	220
	171	10.187	9	220
	172	10.236	24	220
	166	10.277	4	220
Tps32	166	10.288	100	220

Bot2 katalysierte die Bildung des Sesquiterpenoids **168** als Hauptprodukt und des Sesquiterpenoids **166** als Nebenprodukt (Abbildung 31). Überdies zeigten die Enzymtests mit Cop4 und Bot2 Spuren weiterer Nebenprodukte. Das Cop4-Nebenprodukt **167** und das Bot2-Hauptprodukt **168** konnten nicht in Produktgemischen anderer STCn detektiert werden.

Ebenso wie mit dem ersten etherfunktionalisierten FPP-Derivat **155a** war die Akzeptanz und Transformation von **156a** durch GcoA gering, wobei hier ebenfalls die Bildung des Hauptprodukts **166** beobachtet werden konnte. Geringe Mengen von vermutlich drei Nebenprodukten überlagerten zudem im Bereich 9.72 – 9.77 min, so dass die Feststellung ihrer einzelnen Anteile nicht möglich war. Die Trichodiensynthase Tri5 und die *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 akzeptierten auch das etherfunktionalisierte FPP-Derivat **156a** nicht als Substrat.

Die Transformation des FPP-Derivats **156a** durch die Pentalenensynthase PenA führte zu den fünf Produkten **169-172** und **166** mit moderaten Anteilen am Gesamtproduktgemisch. Während die meisten Produkte nicht in Produktgemischen anderer STCn detektiert werden konnten, handelte es sich bei dem Nebenprodukt bei $t_R = 10.277$ min um das Sesquiterpenoid **166**, welches auch das Hauptprodukt von Tps32, Cop4 und Hvs1 darstellte.

Mit Hilfe von Koinjektionen konnte festgestellt werden, dass das Produkt **166** im Falle von Bot2, Cop4, Tps32 und Hvs1 identisch ist. Eine Überprüfung mit den Produkten von GcoA und PenA konnte aufgrund der geringen Ausbeute nicht vorgenommen werden.

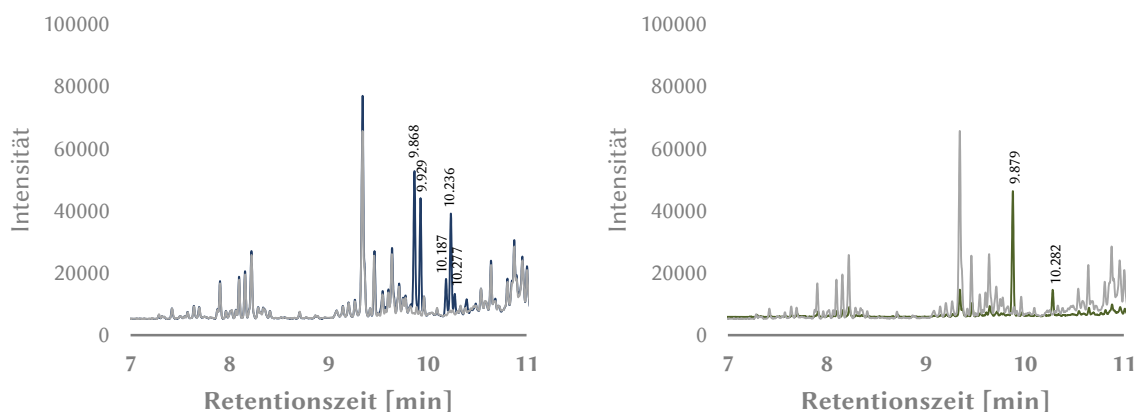


Abbildung 31: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von 156a durch PenA (dunkelblau) und Bot2 (dunkelgrün) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau). Der Peak bei 9.35 min resultiert aus Plastikzusätzen der Probengefäßdeckel. Seine Peakfläche variiert daher abhängig von der Verweildauer der Probe im Probengefäß vor Beginn der Messung.

Die semiquantitative Ausbeutebestimmung zeigte, dass die Vetispiradiensynthasen Hvs1 und Tps32 in der Biotransformation von 156a das Sesquiterpenoids 166 in signifikant größerer Menge als die anderen STCn bilden (Abbildung 36). Insbesondere zeigte Tps32 durch Ausbeuten bis 34 % eine relativ große Aktivität und war daher für die katalytische Herstellung des Sesquiterpenoids 166 zu bevorzugen.

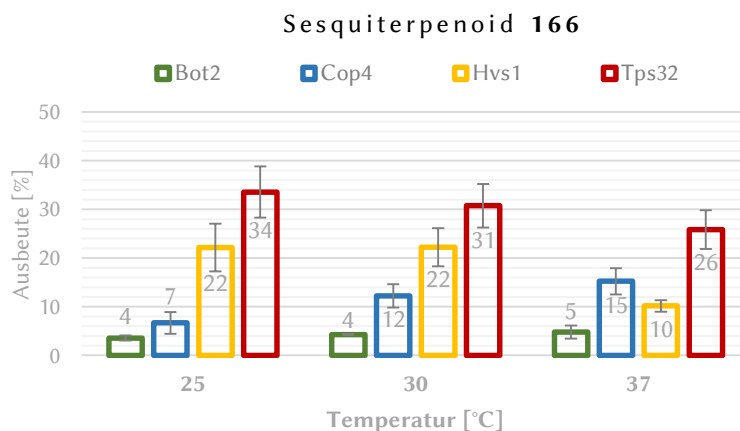


Abbildung 32: Ausbeute des Sesquiterpenoids 166 durch Tps32-, Cop4-, Hvs1- und Bot2-katalysierte Biotransformationen des etherfunktionalisierten Derivats 156a bei unterschiedlichen Temperaturen.

Bot2 katalysierte die Entstehung des Sesquiterpens 166 als Nebenprodukt lediglich in einer Ausbeute von 4 – 5 %, während das Hauptprodukt 168 in einer Ausbeute von 31 % gebildet wurde. Dabei zeigte sich die Biotransformation weitestgehend unabhängig von der Temperatur. Diese Ausbeute lässt anzunehmen, dass die Bot2-katalysierte Biotransformation des Derivats 156a zur Bildung des Sesquiterpenoids 168 auch im semipräparativen Maßstab erfolgreich durchführbar sein sollte.

Aufgrund der geringen katalytischen Aktivität konnten die Ausbeuten der PenA- und GcoA-katalysierten Biotransformationen des Derivats 156a zum Sesquiterpenoid 166 nicht ermittelt werden. Die Ausbeuten des PenA-Hauptprodukts 169 sowie der Nebenprodukte 170 und 172 wiesen zudem mit jeweils 1-2 % Ausbeute auf einen äußerst geringen Umsatz hin (Abbildung 33). Die PenA-katalysierte, semipräparative Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Analogons 156a zur

anschließenden Charakterisierung der Sesquiterpene 169, 170 und 172 scheint daher erst nach umfassenden Optimierungsexperimenten erfolgversprechend.

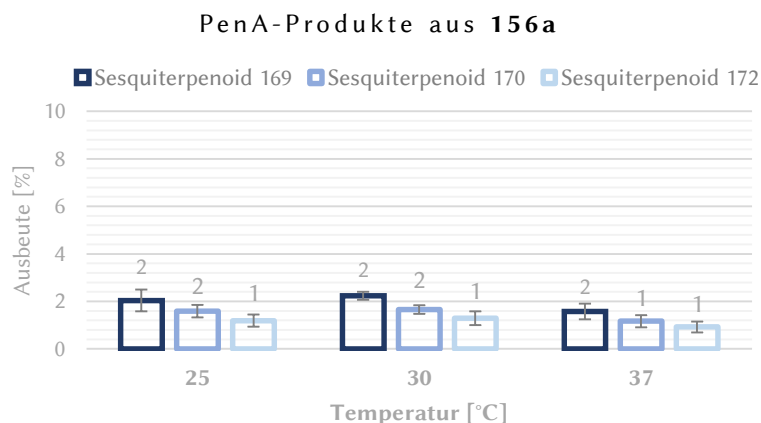


Abbildung 33: Ausbeuten der PenA-Produkte 169, 170 und 172 durch Biotransformationen des etherfunktionalisierten Derivats 156a bei unterschiedlichen Temperaturen.

3.4.2 Analytische Enzymtests mit den thioetherfunktionalisierten Derivaten 155b und 156b

Die thioetherfunktionalisierten FPP-Derivate 155b und 156b wurden von den meisten Enzymen, die auch die etherfunktionalisierten FPP-Derivate 155a und 156a transformieren, akzeptiert. Die Produkte weisen entweder ein $m/z = 236$ oder $m/z = 254$ auf. Im Gegensatz zu den etherfunktionalisierten Produkten scheint hier die Eliminierung von Hydroxygruppen bei der Fragmentierung geringer zu sein, da mehrere Massenspektren einen Molekülpeak mit $m/z = 254$ aufweisen.

Aus Derivat 155b katalysierten Bot2, Cop4, PenA und Tps32 die Bildung des Hauptprodukts 173, während einzig GcoA das Hauptprodukt 174 erzeugte (Tabelle 6). Letzteres konnte auch nicht als Nebenprodukt der anderen STCN detektiert werden. Zudem war die Bildung von zahlreichen Nebenprodukten 175-182 bei Bot2- und PenA-katalysierten Biotransformationen zu beobachten (Abbildung 34). Die beiden Nebenprodukte 176 und 177 wurden in den Produktgemischen beider STCN gefunden. Während die Charakterisierung der meisten Nebenprodukte aufgrund des geringen Anteils kaum möglich ist, sollte das von PenA gebildete Sesquiterpenoid 176 aufgrund des hohen Anteils, bei gutem Umsatz der semipräparativen Biotransformation, ausreichend für eine NMR-spektroskopische Analyse sein.

Zum Vergleich des thioetherfunktionalisierten Produkts 173 aus FPP-Derivat 155b erfolgte die Koinjektion der Produktgemische von Bot2, Cop4 und Tps32. Die Ergebnisse stützten die These, dass es sich bei 173 in allen drei Fällen um dasselbe Produkt handelt. Die Koinjektion mit dem Produktgemisch von PenA konnte nicht erfolgen, da nicht ausreichende Mengen des Produkts erhalten werden konnte. Ein Vergleich der möglicherweise identischen Nebenprodukte von Bot2 und PenA erfolgte daher auch nicht.

Tabelle 6: Produkte aus dem thioetherfunktionalisierten FPP-Derivat **155b** durch Katalyse mit verschiedenen STCn. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 155b				
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
	175	10.140	2	236
	176	10.667	3	236
	173	10.812	82	236
	177	10.910	0.9	254
Bot2	178	10.986	2	236
	179	11.184	0.3	236
	180	11.208	0.7	254
	181	11.365	0.4	254
	182	11.667	9	254
Cop4	183	10.661	4	237
	173	10.785	96	236
GcoA	184	10.672	1	236
	174	10.705	99	236
	176	10.655	31	236
PenA	173	10.781	51	236
	177	10.895	7	254
Tps32	173	10.604	100	236

Die semiquantitativen Ausbeutebestimmungen der Tps32-katalysierten Biotransformationen der thioetherfunktionalisierten FPP-Derivate **155b** und **156b** erfolgten zunächst mit einer Substratkonzentration von 25 μM . Dabei zeigte sich bereits eine Temperaturpräferenz von 37 °C für beide Biotransformationen.

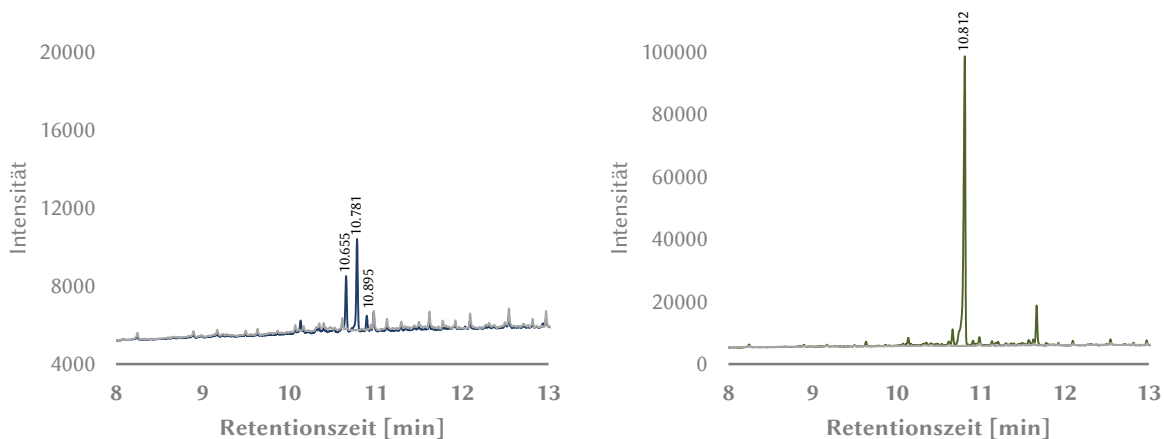


Abbildung 34: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von **155b** durch PenA (dunkelblau) und Bot2 (dunkelgrün) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau).

Enzymtests mit 10 μM des Derivats wurden mit Tps32 daher lediglich bei 37 °C wiederholt, um einen Vergleich mit anderen STCn zu gewährleisten. Dieser zeigte, dass Cop4 und Bot2 im Vergleich zu den beiden Vetispiradiensynthasen Hvs1 und Tps32 das Sesquiterpenoid 173 mit einer erheblich höheren Ausbeute bildeten (Abbildung 35). Insbesondere die Cop4-katalysierte Biotransformation scheint aufgrund der geringen Menge von Nebenprodukten für eine biokatalytische Herstellung des Sesquiterpens 173 gut geeignet. Mit Bot2 wurde hingegen eine Vielzahl an Nebenprodukten erzeugt.

Darunter fand sich auch das Sesquiterpenoid **182**, welches von Bot2 in einer Ausbeute von 5 % gebildet wurde. Generell zeigte die Bot2-katalysierte Biotransformation des Pyrophosphats **155b** eine Steigerung der Ausbeute bei Temperaturen ab 30 °C.

Während die meisten STCN das Analogon **155b** zum Sesquiterpenoid **173** umsetzten, katalysierte GcoA die Entstehung des Produkts **174** in einer Ausbeute von 26 % bei 30 °C. Damit wurde das Derivat **155b** von GcoA ähnlich effizient akzeptiert und transformiert wie das natürliche Substrat FPP (**8**). Zudem erfolgte die Biokatalyse sehr zielgerichtet zur Bildung des Hauptproduktes, so dass die semipräparative Biotransformation von Pyrophosphat **155b** durch GcoA ebenfalls aussichtsreich erschien.

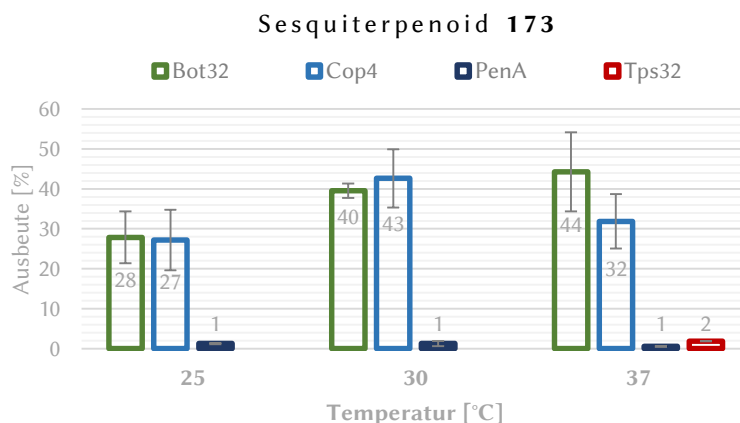


Abbildung 35: Ausbeute des Sesquiterpenoids **173** durch Tps32-, Cop4-, Hvs1- und Bot2-katalysierte Biotransformationen des thioetherfunktionalisierten Derivats **155b** bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Ausbeutebestimmung mit Tps32 erfolgte nur bei 37 °C.

Das zweite thioetherfunktionalisierte Analogon (**156b**) wurden hauptsächlich in die Produkte **185** und **186** transformiert. Bei dem Sesquiterpenoid **185** handelt es sich um das Hauptprodukt der Biotransformationen durch Bot2, PenA und Tps32 mit $m/z = 236$, welches zudem als Nebenprodukt in der GcoA-katalysierten Biotransformation von Derivat **156b** in Erscheinung tritt (Tabelle 7, Abbildung 36).

Tabelle 7: Produkte aus dem thioetherfunktionalisierten FPP-Derivat **156b** durch Katalyse mit verschiedenen STCN. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 156b				
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
Bot2	187	10.663	7	236
	185	10.913	74	236
	188	11.410	19	254
Cop4	189	10.576	7	236
	186	10.745	72	254
	190	10.878	21	236
GcoA	186	10.759	86	236
	185	10.904	14	236
PenA	186	10.750	19	236
	185	10.894	66	236
	191	11.048	15	236
Tps32	185	10.225	100	236

Das Hauptprodukt der Cop4- und GcoA-katalysierten Biotransformationen stellt hingegen das Sesquiterpenoid **186** dar, dessen Masse-Ladungs-Verhältnis aufgrund der starken Fragmentierung schwer zu ermitteln war. Da sich Spuren des Sesquiterpenoids **186** jedoch auch in der Negativkontrolle fanden, konnte die Bildung des Sesquiterpenoids **186** als Nebenprodukt, aufgrund einer signifikant größeren Peakfläche, nur bei PenA eindeutig festgestellt werden.

Hingegen wurde bei der Trichodiensynthese Tri5, der *Epi*-Isozizaensynthese Cyc1 und der Vetispiradiensynthese Hvs1 davon ausgegangen, dass die Anwesenheit von Spuren des Sesquiterpenoids **186** nicht auf katalytische Aktivität der STC zurückzuführen ist. Während demnach bei Tri5 und Cyc1 keinerlei Akzeptanz des FPP-Derivats **156b** als Substrat beobachtet werden konnte, fanden sich im Extrakt des Enzymtests mit Hvs1 zumindest geringe Spuren des Sesquiterpenoids **185**. Da im Produktgemisch dieses Enzymtests jedoch keine weiteren Produkte detektiert wurden, ist von einer äußerst geringen Akzeptanz des Pyrophosphats **156b** durch Hvs1 auszugehen.

Bei Cop4-, PenA- und Bot2-katalysierten Biotransformationen konnte zudem die Bildung von vielen weiteren Nebenprodukten in geringen Mengen beobachtet werden. Allerdings zeigt sich bereits bei der Analyse der Peakflächen, dass der Umsatz von **156b** durch PenA deutlich geringer ist als beispielsweise durch Bot2 und Tps32.

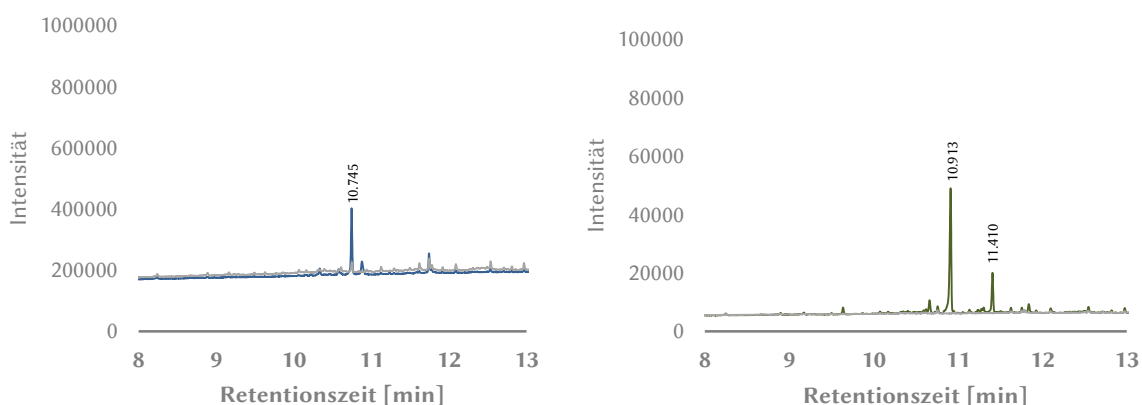


Abbildung 36: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von **156b** durch Cop4 (blau) und Bot2 (dunkelgrün) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau).

Bei dem Hauptprodukt **186** konnte mit Hilfe eines Koinjektionsexperiments bestätigt werden, dass das Produkt **186** von Cop4 identisch mit dem Produkt von GcoA ist. Die Koinjektionen der Produktgemische von Bot2, PenA und Tps32 wiesen zudem in allen Fällen darauf hin, dass alle drei STCn das gleiche Hauptprodukt **185** bilden. Ein Vergleich der Nebenprodukte erfolgte aufgrund der geringen Konzentrationen nicht.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Ausbeute der zwei Sesquiterpenoide **185** und **186**. Die Ausbeuten der Cop4- und GcoA-katalysierten Biotransformationen waren allerdings sehr gering und zudem noch von der Bildung von Nebenprodukten begleitet. Die signifikant beste Ausbeute des Sesquiterpenoids **186** zeigte sich in der Biotransformation durch Cop4 und betrug lediglich 5 % (Abbildung 37). Schon der Vergleich der Peakflächen deutete auf die ebenfalls schlechte Ausbeute der PenA-katalysierten Biotransformation des Analogons **156b** bei der Bildung des Sesquiterpenoids **185** hin, wohingegen Bot2 und Tps32 das Produkt in moderaten Ausbeuten zwischen 15 % und 25 % lieferten. Dementsprechend ist die biokatalytische Herstellung des Sesquiterpenoids **185** durch Tps32 vorzuziehen, da dieses im Vergleich zu Bot2 keine nennenswerten Nebenprodukte bildet. Für die

Identifizierung des PenA-Nebenprodukts **191** müssten hingegen erst die Bedingungen der Biotransformation optimiert werden.

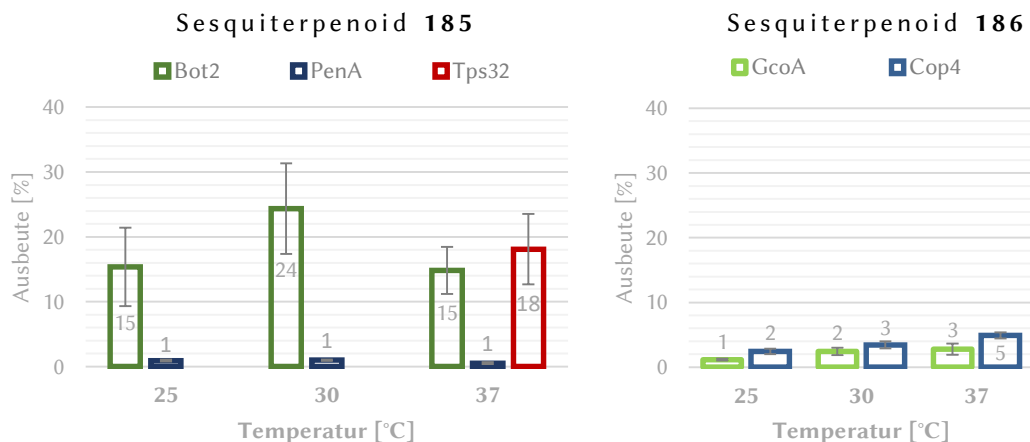


Abbildung 37: Ausbeuten des Sesquiterpenoide **185** und **186** durch Biotransformationen des thioetherfunktionalisierten Derivats **156b** bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Ausbeutebestimmung mit Tps32 erfolgte nur bei 37 °C.

3.4.3 Analytische Enzymtests mit den aminofunktionalisierten Derivaten **155c** und **156c**

Mit Hilfe von *in vitro* Enzymtests und GC-MS-Analyse der Extrakte wurde ebenfalls die Biotransformation der methylaminofunktionalisierten FPP-Derivaten **155c** und **156c** durch die acht STCN geprüft. Die massenspektrometrische Untersuchung offenbarte jedoch keine Terpene mit $m/z = 233$ bzw. $m/z = 251$. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten unnatürlichen Pyrophosphaten wurden die methylaminofunktionalisierten FPP-Derivate **155c** und **156c** demnach von keiner der acht STCN akzeptiert und transformiert. Um die Protonierung des Amins und eine infolgedessen verhinderte Erkennung des Substrats oder Hemmung des Zyklisierungsmechanismus auszuschließen wurden weitere Enzymtests mit Cop4 bei pH 10 durchgeführt, da in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden konnte, dass Cop4 im alkalischen Bereich noch signifikante Aktivität zeigt. Allerdings führte dies ebenfalls nicht zur Akzeptanz der methylaminofunktionalisierten FPP-Derivate **155c** und **156c**. Daher wäre zu vermuten, dass die *N*-Methylgruppe die Substraterkennung beeinträchtigt.

Bei amino- und methylaminofunktionalisierten FPP-Analoga wäre allerdings auch denkbar, dass diese zwar von den STCN erkannt werden, jedoch das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms eine Zyklisierung durch Angriff auf das Carbokation bewirkt und es dabei zur Inhibierung der STCN durch das quartäre Ammoniumion kommt (Abbildung 38). So würden beispielsweise aus den FPP-Derivaten **155c**, **156c**, **192** und **193** die Intermediate **194-197** entstehen, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu dem starken kompetitiven Inhibitor *R*-Aza-Bisabolon (**198**) aufweisen.^[92] Möglicherweise kommen amino- bzw. methylaminofunktionalisierte FPP-Derivate daher nicht als Substrate in Frage. Eine Ausnahme könnte das Anilino-FPP (**135**) darstellen, dessen Aminogruppe die *ortho*- und *para*-Positionen des Aromaten aktiviert, so dass diese bevorzugt den Ringschluss vollziehen.^[85]

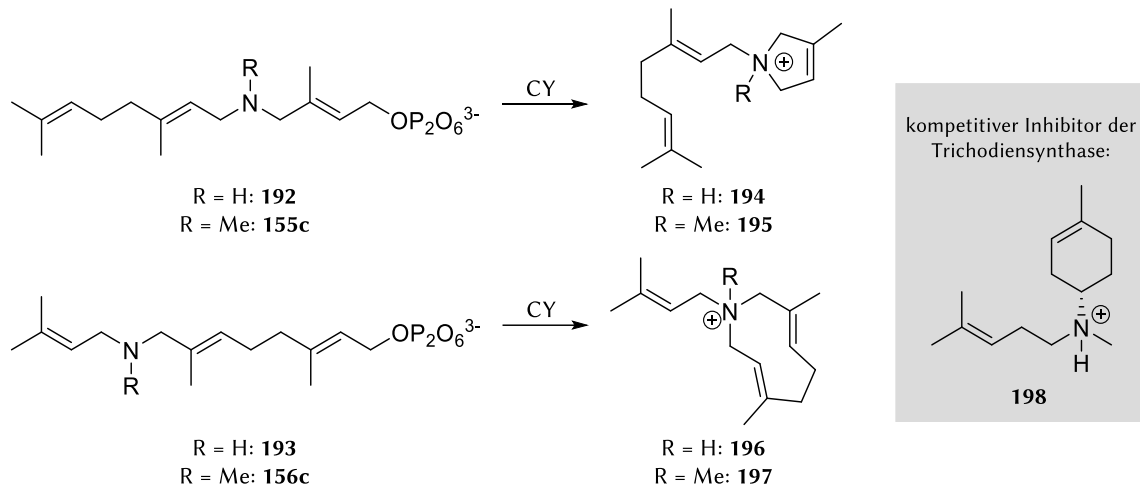


Abbildung 38: Die erste Zyklisierung der amino- bzw. methylaminofunktionalisierten FPP-Derivate 155c, 156c, 192 und 193 könnte zur Bildung der quartären Ammoniumionen 194-197 führen, welche Ähnlichkeit mit dem Inhibitor *R*-Aza-Bisabolen (198) aufweisen.

3.5 Akzeptanz von Pyrophosphaten mit alternativem Methylierungsmuster oder Doppelbindungsmodifikationen

Im weiteren Verlauf der Studien wurden zudem die fünf Pyrophosphate **201-205** mit verändertem Methylierungsmuster als Substrate für Sesquiterpencyclasen (STCn) getestet (Abbildung 39). Die Synthese dieser Pyrophosphate erfolgte im Rahmen der Dissertation von SCHRÖDER.^[88] Die Pyrophosphate **201** und **202** sind im Vergleich zu FPP (**8**) lediglich an der endständigen Doppelbindung verändert. Während in Derivat **201** eine Methylgruppe dieser endständigen Doppelbindung von C11 nach C10 verschoben ist, trägt Pyrophosphat **202** dort keinerlei Methylgruppen. Die drei FPP-Derivate **203-205** weisen an zwei Doppelbindungen jeweils eine um eine Position verschobene Methylgruppe auf. Die endständige Doppelbindung trägt entweder keine Methylgruppen (Derivat **204**), eine von C11 auf C10 verschobene Methylgruppe (Derivat **203**) oder ist dort analog zu FPP substituiert (Derivat **205**).

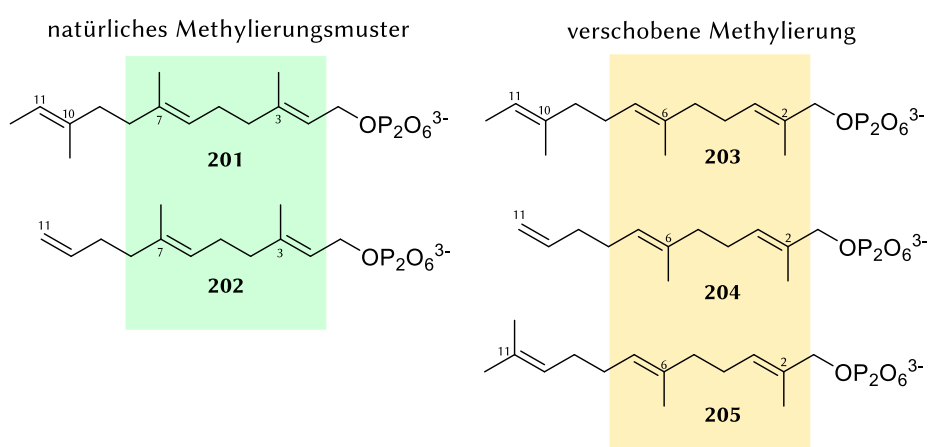


Abbildung 39: Die FPP-Analoga **201-205** mit Methylierungsmodifizierungen lassen sich in Pyrophosphate mit natürlichem Methylierungsmuster an C7 und C3 (grün) und in allylische Pyrophosphate mit Methylgruppen an C2 und C6 (gelb) unterteilen.

Des Weiteren wurde das doppelbindungsmodifizierte *E,Z*-FPP (**121**), welches von DICKSCHAT bereit gestellt wurde, als Substrat getestet (Abbildung 40). Dieses ist bis auf die *Z*-konfigurierte Doppelbindung an C2 analog zu FPP.

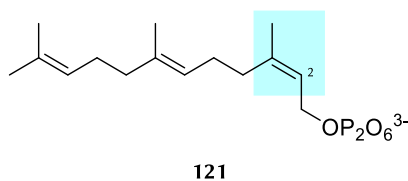


Abbildung 40: *E,Z*-Farnesylpyrophosphat (**121**) weist im Vergleich zum natürlichen Substrat *E,E*-FPP (**8**) eine *Z*-Doppelbindung an C2 auf.

Die *in vitro* Tests zur Prüfung der Substratakzeptanz mit den Pyrophosphaten **201-205** und **121** erfolgten im analytischen Maßstab und wurden, ebenso wie vorherige Enzymtests, mit 0.01 g/L STC, 5 mM MgCl₂ und 150 μM Substrat durchgeführt. Die Tests wurden bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend mit 100 μL *n*-Hexan extrahiert. Der Nachweis der Produkte erfolgte massenspektrometrisch durch Vergleich der Chromatogramme mit denen von Negativkontrollen, welche äquivalent, jedoch ohne Zugabe einer STC, durchgeführt und aufgearbeitet wurden.

Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben, erfolgte bei ausgewählten Produkten zunächst eine ungefähre Einschätzung der Substratakzeptanz durch Analyse der Peakflächen. Diese wurde anschließend durch

semiquantitative Bestimmung der Ausbeuten für erfolgreiche Biotransformationen mittels GC-FID konkretisiert. Bei der Evaluierung der Ergebnisse wurde außerdem auf die Angabe von geringen Mengen und Spuren von Produkten verzichtet, da diese oftmals nicht eindeutig voneinander bzw. von Verunreinigungen unterschieden werden konnten. Anschließend erfolgten Koinjektionsexperimente ausgewählter Haupt- und Nebenprodukte, um die anfänglich mittels Retentionszeit und Fragmentierungsmuster durchgeführte Zuordnung zu überprüfen. Dafür wurden zunächst einzelne analytische Enzymtests durchgeführt und der Produktgehalt der Extrakte anschließend mittels GC-FID ermittelt. Die Extrakte aus jeweils zwei Enzymtests wurden dann in der Weise vereint, dass die zu vergleichenden Produkte in gleichen Mengen vorlagen. Es folgte eine zweite Messung, welche bei identischen Produkten nur zu einem einzelnen Peak des entsprechenden Produkts führt, während unterschiedliche Produkte im Idealfall zwei Peaks hervorbringen sollten.

Da die *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 im Rahmen der folgenden Enzymtests keine Aktivität mit den unnatürlichen Pyrophosphaten und nur äußerst geringe Aktivität mit FPP zeigte, lassen die Ergebnisse keine genaue Aussage über die Substratazeptanz von Cyc1 zu und sollten nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wiederholt werden. Die Bewertung der Substratazeptanz erfolgte daher nur für die anderen sieben STCn.

3.5.1 Analytische *in vitro* Enzymtests mit Pyrophosphat 201

Aufgrund der geringen Abweichung zum natürlichen Substrat FPP (8), wurde das Pyrophosphat 201 von allen sieben STCn akzeptiert und in relativ guter Ausbeute umgesetzt. Da das Analogon 201 dieselbe Masse aufweist wie FPP, wurden auch hier Produkte mit $m/z = 204$ und $m/z = 222$ erwartet. Die *in vitro* Enzymtests zeigten, dass sowohl die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2 als auch die Pentalenensynthase PenA das Pyrophosphat 201 in das Hauptprodukt 206 transformierten (Tabelle 8). Zusätzlich bestand das Produktgemisch von PenA noch zu 43 % aus dem Sesquiterpen 216, welches auch im Produktgemisch von Hvs1 und Tps32 als Nebenprodukt detektiert wurde. Außerdem fanden sich im Produktgemisch von PenA sehr geringen Mengen von Nebenprodukten, bei denen die Unterscheidung zu Verunreinigungen, die sich auch in der Negativkontrolle befinden, schwierig war. Dahingegen produzierte Bot2 nur geringe Mengen diverser Nebenprodukte und erschien Pyrophosphat 201 insgesamt sehr gut umzusetzen.

Im Gegensatz zu den heteroatomfunktionalisierten FPP-Derivaten (155a-b und 156a-b) wurde das Pyrophosphat 201 auch durch die Trichodiensynthase Tri5 akzeptiert, welche die Entstehung zahlreicher Produkte (210, 219-226) katalysierte, deren Bildung durch andere STCn bisher nicht nachgewiesen wurde (Abbildung 41). Eine Ausnahme bildete das mit 24 % anteilmäßig stark vertretene Nebenprodukt 210, welches dem Hauptprodukt der Cubebolsynthase Cop4 nach Biotransformation des Pyrophosphats 201 entsprach. Unter den Nebenprodukten von Cop4 fanden sich zudem moderate Mengen der Sesquiterpene 211-214, deren Anteil am Gesamtproduktgemisch jedoch aufgrund der Überlagerung der Peaks nicht eindeutig festgestellt werden konnte. Das Produkt 211 konnte wiederum als Hauptprodukt der Vetispiradiensynthasen Hvs1 und Tps32 beobachtet werden. Aufgrund des geringen Umsatzes des Pyrophosphats 201 durch Hvs1 konnten viele Nebenprodukte nicht eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 8: Produkte aus FPP-Derivat **201** durch Katalyse mit verschiedenen STCN. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und die Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 201				
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
Bot2	206	8.846	90	204
	207	8.940	3	204
	208	9.291	2	204
	209	9.836	1	222
Cop4	210	8.612	30	204
	211	8.823	19 ⁸	204
	212	8.855	9	204
	213	8.902	26	204
	214	9.960	6	204
GcoA	215	9.994	75	204
Hvs1	211	8.865	85	204
	216	9.129	15	204
PenA	206	8.978	57	204
	216	9.229	43	204
Tps32	211	8.857	80	204
	217	9.038	2	204
	216	9.118	9	204
	218	9.992	7	204
Tri5	219	8.357	2	204
	210	8.667	24	204
	220	8.699	5	204
	221	8.897	2	204
	222	8.968	5	204
	223	9.004	15	204
	224	9.061	28	204
	225	9.112	5	204
	226	9.206	2	204

Bei der Biotransformation von **201** durch die Caryolan-1-ol-Synthase GcoA wurde das Hauptprodukt **215** gebildet, welches bisher nicht in Produktgemischen anderer STCN detektiert wurde. Des Weiteren sind mehrere Sesquiterpene als Nebenprodukte mit einer Retentionszeit von 8.8 – 8.9 min entstanden, deren Signale im Chromatogramm überlagerten und daher weder mit anderen Produkten verglichen werden konnten, noch ihr Anteil am Gesamtproduktgemisch bestimmt werden konnte.

Um die aus Pyrophosphat **201** durch Bot2, PenA, Tps32 und Hvs1 gebildeten Hauptprodukte (**206**, **211**) zu vergleichen, erfolgten Koinjektionsexperimente mittels GC-MS. Koinjektionen mit dem Cop4-Produktgemisch erfolgten nicht, da eine korrekte Auswertung des Chromatogramms aufgrund der Überlagerung von **210** und **211** mit weiteren Nebenprodukten sehr fehleranfällig war. Die Koinjektionsexperimente offenbarten, dass das Produkt **206** sowohl durch Bot2 als auch durch PenA gebildet wird, während die Bildung von **211** durch die Vetispiradiensynthesen Tps32 und Hvs1 katalysiert wird.

⁸ Der Anteil am Gesamtproduktgemisch ließ sich aufgrund von Überlagerungen von **211-213** nicht eindeutig bestimmen und stellt demnach eine grobe Schätzung dar.

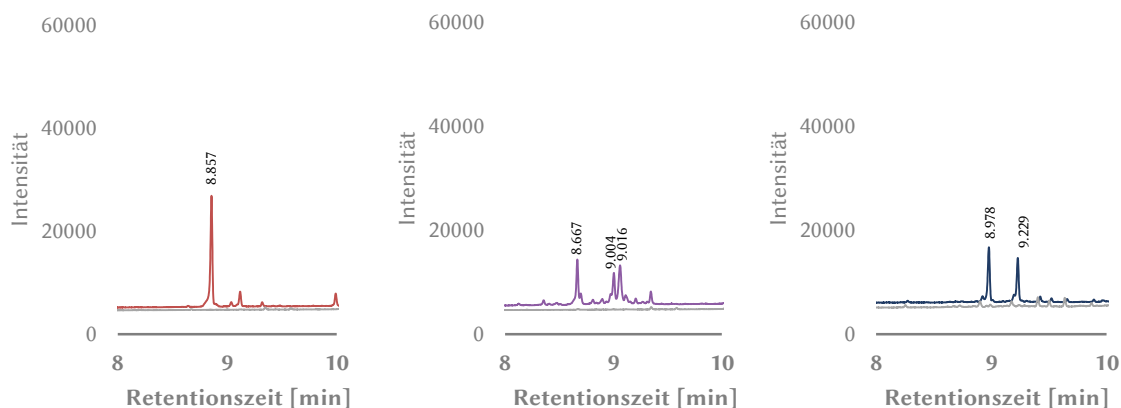


Abbildung 41: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von 201 durch Tps32 (rot), Tri5 (violett) und PenA (dunkelblau) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau).

Semiquantitative Ausbeutebestimmungen zeigten zudem, dass Bot2 und PenA das Sesquiterpen 206 mit deutlichen Unterschieden in der Ausbeute bildeten, welche nicht ausschließlich darauf zurückzuführen sind, dass PenA mit Sesquiterpen 216 ein Nebenprodukt mit hohem Anteil am Gesamtproduktgemisch erzeugt (Abbildung 42). Die semipräparative Biotransformation des Pyrophosphats 201 zur biokatalytischen Erzeugung von Sesquiterpen 206 könnte daher mit PenA nur nach umfangreichen Optimierungen erfolgen.

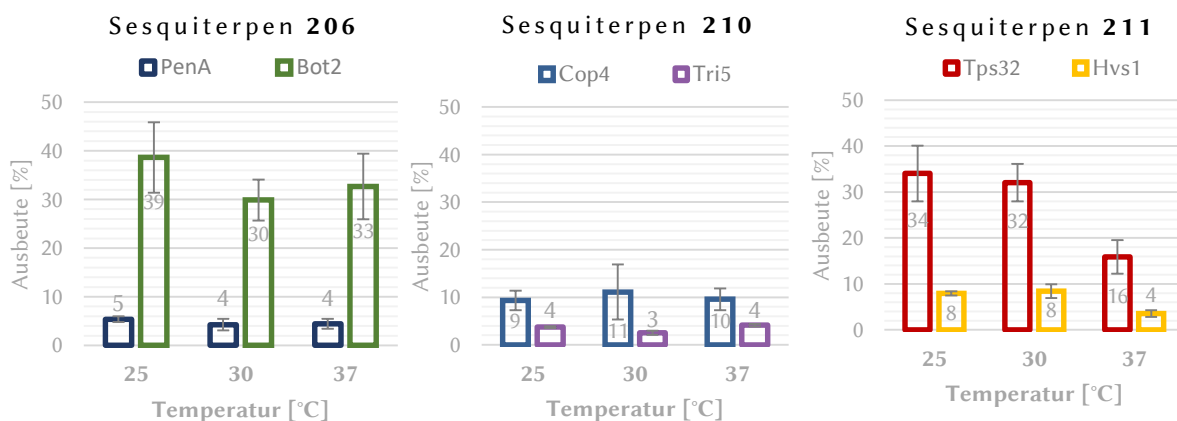


Abbildung 42: Ausbeuten des Sesquiterpenoide 206, 210 und 211 durch Biotransformationen des Derivats 201 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Bei der Ausbeutebestimmung des von Tps32 und Hvs1 erzeugten Hauptprodukts 211 zeigte sich erneut die katalytische Überlegenheit von Tps32 gegenüber Hvs1, welche die semipräparative Biotransformation des Analogons 201 gut durchführbar erscheinen ließ. Das Hauptprodukt von Cop4 und Nebenprodukt von Tri5 (210) wurde durch keines der Enzyme in relevanter Ausbeute erzeugt, was jedoch zumindest im Fall von Cop4 in Teilen auf die hohe Produktion von Nebenprodukten, wie z. B. Sesquiterpen 211, zurückzuführen war. Auf die Ausbeutebestimmung der Cop4-Nebenprodukte wurde aufgrund der mangelnden Trennung mittels Gaschromatographie und des ohnehin geringen Umsatzes verzichtet.

Da einige Haupt- und Nebenprodukte der Tri5-katalysierten Biotransformationen mit dem Pyrophosphat 201 einen relativ hohen Anteil am Gesamtproduktgemisch aufweisen, erfolgte ebenfalls eine Ausbeutebestimmung ausgewählter Produkte von Tri5 (Abbildung 43). Das Hauptprodukt 225

konnte bei 25 °C in einer Ausbeute von 7 % generiert werden, so dass nach wenigen Optimierungsversuchen eine semipräparative Biotransformation von Pyrophosphat 201 durch Tri5 möglich erscheint. Im Idealfall könnte dann zeitgleich das Nebenprodukt 224 identifiziert werden.

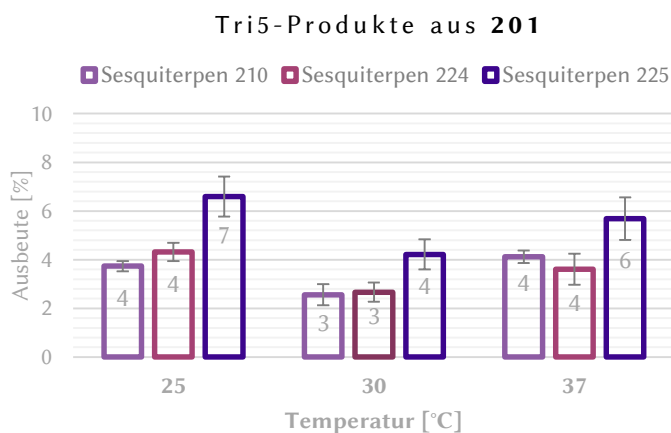


Abbildung 43: Ausbeuten der Tri5-Produkte 210, 224 und 225 durch Biotransformationen des Derivats 201 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Das Hauptprodukt 215 der GcoA-katalysierten Biotransformation von Pyrophosphat 201 konnte nicht in Produktgemischen anderer STCn detektiert werden, so dass eine semipräparative Biotransformation für die anschließende Charakterisierung nur mit GcoA durchgeführt werden kann. Bei 37 °C erzeugte GcoA das Sesquiterpen 215 in einer Ausbeute von 9 %. Da eine hohe Temperatur jedoch aufgrund der geringen Enzymstabilität vermieden werden sollte (Kapitel 3.2.3), ist eine Temperatur von 30 °C vorzuziehen. Die Ausbeute des Sesquiterpens 215 lag mit etwa 7% nur etwas niedriger als bei höherer Temperatur.

Des Weiteren wurden die Ausbeuten des Nebenprodukts 216 der Hvs1-, Tps32- und PenA-katalysierten Biotransformationen von 201 ermittelt. Während die Ausbeute des Hvs1-Produkts zu gering war, um über die verwendete Methode bestimmbar zu sein, konnte Sesquiterpen 216 mit PenA in einer Ausbeute von 4 % und mit Tps32 in einer Ausbeute von 3 % erzeugt werden. Während der Umsatz mit Tps32 wahrscheinlich kaum weiter gesteigert werden kann, könnten Optimierungen mit PenA einen Umsatz erzielen, der die Herstellung des Nebenprodukts 216 in ausreichender Menge gewährleistet, um eine strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie zu ermöglichen.

3.5.2 Analytische *in vitro* Enzymtests mit den Pyrophosphaten 202-205

Enzymtests mit dem FPP-Derivat 203, welches eine Methylgruppe an C2, C6, C10 und C11 aufweist, erbrachten, ebenso wie FPP (8) und Analogon 201, Produkte mit $m/z = 204$ und $m/z = 222$ (Tabelle 9). Allerdings wurde das Substrat nur von wenigen STCn akzeptiert.

Bot2 lieferte mit dem Hauptprodukt 232 und dem Nebenprodukt 231 zwei Sesquiterpene, die später mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden könnten, während die Anteile der zahlreichen Nebenprodukte für eine Charakterisierung nicht ausreichen (Abbildung 44). Unter den Nebenprodukten von Bot2 findet sich auch das Sesquiterpen 234, welches zudem das Hauptprodukt von PenA darstellt. Außerdem bildet PenA unter diversen Nebenprodukten auch 237, welches wiederum in Spuren durch Tps32 gebildet wurde, während Cop4 Spuren des Sesquiterpens 234 hervorbrachte. Auch GcoA erzeugte aus dem FPP-Derivat 203 geringe Mengen von zwei Produkten, von denen eines dem Sesquiterpen 234 entspricht. Bei allen anderen STCn konnte keinerlei

Produktbildung beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass alle Chromatogramme aus Tests mit FPP-Derivat 203, einschließlich der Negativkontrollen, bei $t_R = 10.2$ min einen Peak mit $m/z = 222$ zeigten, welcher eine nicht identifizierte Verunreinigung darstellt.

Tabelle 9: Produkte aus FPP-Derivat 203 durch Katalyse mit verschiedenen STCn. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 203				
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
Bot2	229	8.520	2	204
	230	8.602	1	204
	231	9.015	27	204
	232	9.065	50	204
	233	9.175	7	204
	234	9.226	2	204
	235	9.501	3	204
PenA	236	8.790	6	204
	237	9.060	28	204
	238	9.173	3	204
	234	9.214	44	204
	239	9.295	3	204
	240	9.490	8	204
	241	9.908	3	222
242	10.158	5	222	

Während die Umsätze durch GcoA, Tps32 und Cop4 zu gering für die Bestimmung der Ausbeute waren, wurde der beste Umsatz mit PenA und Bot2 bei 25 °C festgestellt. Das PenA-Hauptprodukt 234 konnte in einer Ausbeute von 2 % und das Nebenproduktes 237 in einer Ausbeute von 1 % erzeugt werden. Für das Bot2-Hauptprodukt 232 konnte ebenfalls nur eine Ausbeute von 2 % ermittelt werden. Die geringe Ausbeute der Bot2-katalysierten Biotransformation erscheint allerdings in Relation zu den Peakflächen der initialen PenA-katalysierten Biotransformation als fragwürdig und sollte für eine biokatalytische Herstellung der Bot2-Produkte wiederholt werden.

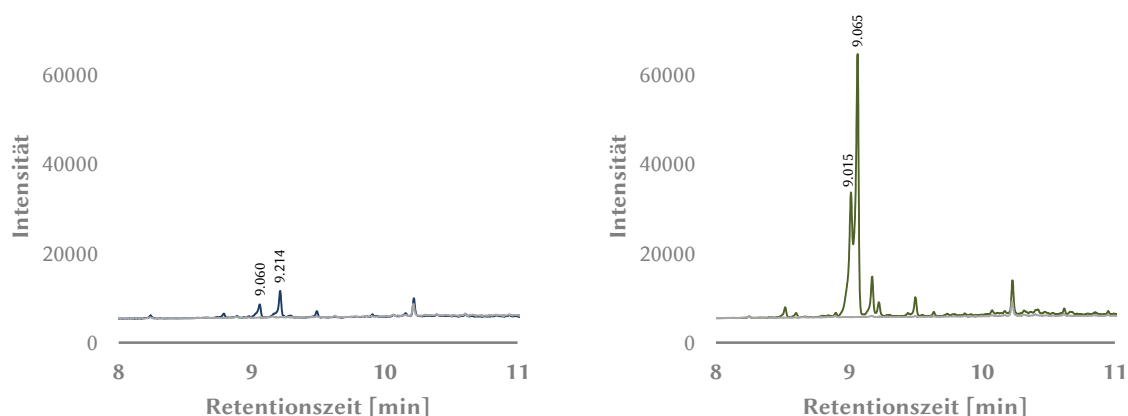


Abbildung 44: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von 203 durch PenA (dunkelblau) und Bot2 (dunkelgrün) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau).

Für den Vergleich des durch PenA- und Bot2-gebildeten Produktes 234 wurde trotz des geringen Anteils der Bot2-katalysierten Reaktion ein Koinjektionsexperiment durchgeführt. Die Vermutung, dass es sich um identische Produkte handelt, wurde durch das resultierende Chromatogramm, welches

nur ein einzelnes Signal mit dem Fragmentierungsmuster von 234 zeigte, unterstützt. Weitere Koinjektionsexperimente konnten aufgrund des geringen Umsatzes des FPP-Derivats 203 nicht durchgeführt werden.

Die FPP-Derivate 202 und 204 weisen keine Methylgruppe an der endständigen Doppelbindung auf und wurden nur von sehr wenigen STCN akzeptiert. Die Biotransformationen führten zu Produkten mit $m/z = 176$ und $m/z = 194$. Das Pyrophosphat 204, welches jeweils eine Methylgruppe an C2 und C6 besitzt, wurde aufgrund der geringen Ähnlichkeiten zu FPP (8) nur von Bot2 akzeptiert. In den Extrakten der PenA-, Tps32- und GcoA-katalysierten Biotransformationen waren hingegen lediglich Spuren von entsprechenden Sesquiterpenderivaten zu finden, bei denen es sich jedoch auch um Verunreinigungen handeln könnte. Bot2 transformierte das Pyrophosphat 204 zu einem Hauptprodukt mit $m/z = 176$ (Tabelle 10) sowie zu Spuren von Nebenprodukten. Da das Hauptprodukt 243 lediglich in einer Ausbeute von 3 % gebildet wurde, dürfte die semipräparative Biotransformation des Derivats 204 erst nach Optimierungsexperimenten gut durchführbar sein.

Tabelle 10: Produkt aus dem FPP-Derivat 204 durch Katalyse mit Bot2. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

Produkt aus 204				
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
Bot2	243	7.435	90	176

Die Enzymtests mit Pyrophosphat 202 zeigten einen guten Umsatz durch Bot2 sowie einen geringen Umsatz durch Cop4, Tri5, Tps32 und PenA. Dabei bildete Bot2 aus dem FPP-Derivat 202 eine große Anzahl unterschiedlicher Produkte (Tabelle 11). Darunter befand sich auch das Nebenprodukt 251, dessen Retentionszeit und Fragmentierungsmuster auf einen Alkohol hinweist, während die anderen Produkte Kohlenwasserstoffe darstellten.

Tabelle 11: Produkte des FPP-Derivat 202 durch Katalyse mit verschiedenen STCN. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben. Hauptprodukte sind grau hervorgehoben.

Produkte aus 202				
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
	244	7.282	16	176
	245	7.577	41	176
	246	7.681	14	176
Bot2	247	8.009	4	176
	248	8.069	11	176
	249	8.225	5	176
	250	8.236	2	176
	251	9.072	7	194
Cop4	244	7.261	100	176
PenA	244	7.266	100	176
Tps32	244	7.261	63	176
	247	7.989	37	176
	252	7.184	26	176
Tri5	244	7.257	18	176
	253	7.608	39	176
	254	7.652	17	176

Während das Hauptprodukt 245 nur von Bot2 gebildet wurde, resultierte das Nebenprodukt 244 auch aus Cop4-, PenA-, Tps32- und Tri5-katalysierten Biotransformationen. Außerdem fand sich das Sesquiterpenoid 247 als Nebenprodukt bei der Tps32-katalysierten Biotransformation des FPP-Derivats 202 wieder. Die Entstehung weiterer Nebenprodukte dieser STCN ist allerdings wegen der geringen Ausbeute und aufgrund starker Verunreinigungen in der Negativkontrolle nicht eindeutig nachzuvollziehen (Abbildung 45). In dem Zusammenhang wurde auch angenommen, dass die detektierten Signale im Chromatogramm der Tri5-katalysierten Biotransformation bei $t_R = 8.039$ min und $t_R = 9.054$ min Verunreinigungen darstellen, da sie ebenfalls in der Negativkontrolle zu beobachten waren. Aufgrund des geringen Umsatzes des FPP-Derivats 202 durch Cop4, PenA, Tps32 und Tri5 konnten keine Koinjektionsexperimente mit den Produkten 244 und 247 erfolgen.

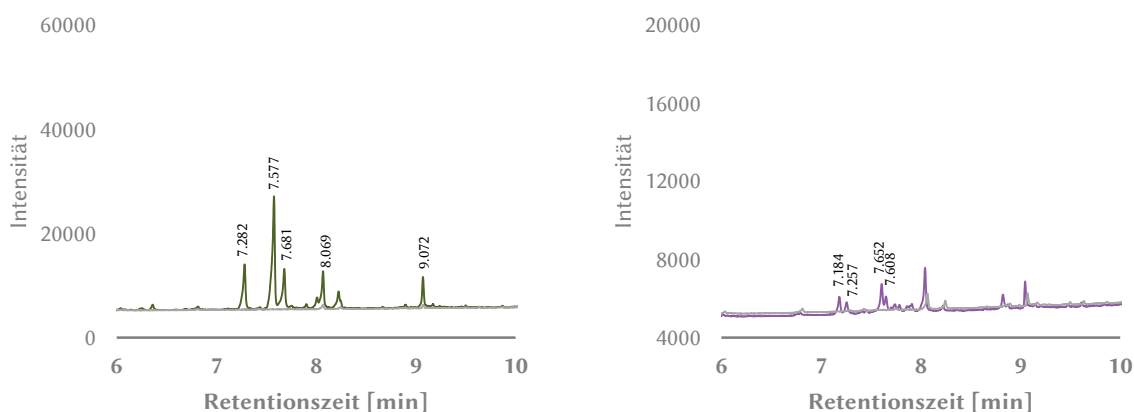


Abbildung 45: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von 202 durch Bot2 (dunkelgrün) und Tri5 (violett) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau).

Bei der Bot2-katalysierten Biotransformation des Derivats 202 konnte eine deutliche Temperaturabhängigkeit beobachtet werden. Während Biotransformationen bei 25 °C in Ausbeuten von durchschnittlich 10 % resultierten, konnte diese bei 37 °C auf durchschnittlich 18 % gesteigert werden. Eine Ausbeutebestimmung weiterer Biotransformationen mit Pyrophosphat 202 erfolgte nicht, da die Ausbeuten bei maximal 1 % lagen.

Das FPP-Derivat 205, welches bis auf das veränderte Methylierungsmuster an C2/3 und C6/7 identisch zu FPP (8) ist, wurde von Bot2, Cop4, Tps32 und PenA akzeptiert und führte ebenfalls zu Produkten mit $m/z = 204$ und $m/z = 222$. Dabei konnte bei der Tps32-katalysierten Biotransformation die Bildung von Spuren zweier Sesquiterpene beobachtet werden. Auch Cop4 setzte das Pyrophosphat 205 in geringen Mengen um. Dennoch waren der Alkohol 259 als Hauptprodukt sowie die Sesquiterpene 256-258 als Nebenprodukte zu erkennen (Tabelle 12).

Die Biotransformation des Analogons 205 durch PenA und Bot2 führte zu Produktgemischen, welche gaschromatographisch nicht getrennt werden konnten. Außerdem ist bei den Biotransformationen des Derivats 205 durch PenA und Bot2 das Sesquiterpen 255 als Nebenprodukt entstanden, während der Alkohol 260 lediglich von PenA gebildet wurde. Aufgrund des schlechten Umsatzes durch Tps32 und Cop4 und die unklare Produktbildung durch PenA und Bot2 ist derzeit nicht abzusehen, ob Biotransformationen von Pyrophosphat 205 im semipräparativen Maßstab zielführend sind. Aufgrund der unzureichenden gaschromatographischen Trennung konnte ebenfalls keine detaillierte Ausbeutebestimmung der Produkte durchgeführt werden.

Tabelle 12: Produkte aus FPP-Derivat 205 durch Katalyse mit verschiedenen STCn. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

Produkte aus 205				
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
Bot2	255	8.339	6	201
	Gemisch	8.4 – 9.0	94	204
Cop4	256	8.973	22	204
	257	9.031	4	204
	258	9.122	18	204
	259	10.066	56	222
PenA	255	8.333	2	204
	Gemisch	8.4 – 9.1	96	204
	260	10.201	2	222

Auf die Koinjektionsexperimente mit den Extrakten der PenA- und Bot2-katalysierten Biotransformationen des Derivats 205 wurde ebenfalls verzichtet, da das von PenA und Bot2 gebildete Gemisch nicht durch Gaschromatographie getrennt werden konnte, während das Nebenprodukt 255 nur in kleinsten Mengen gebildet wurde und daher nicht für ein Koinjektionsexperiment zur Verfügung stand.

3.5.3 Analytische *In vitro* Enzymtests mit *E,Z*-FPP

Neben den methylmodifizierten Pyrophosphaten (201-205) wurde das doppelbindungsmodifizierte *E,Z*-FPP (121) als Substrat für die sieben Sesquiterpencyclasen getestet. *E,Z*-FPP konnte durch Bot2, Cop4, Hvs1, Tps32 und Tri5 umgesetzt werden, während die Enzymtests mit PenA und GcoA keine Produktbildung zeigten. Die Auswertung erwies sich aufgrund der Verunreinigungen der Negativkontrolle, z. B. bei $t_R = 10.129$ min, als schwierig. Die Biotransformation von *E,Z*-FPP durch Bot2 führte zur Bildung des natürlichen Produkts Presilphiperfolan-8- β -ol (61) (Tabelle 13). Dieses Phänomen konnte ebenfalls bei der Tri5-katalysierten Biotransformation beobachtet werden, welches jedoch neben Trichodien (35) noch weitere Nebenprodukte bildete, die nicht nach Biotransformationen mit FPP (8) als Substrat detektiert wurden.

Tabelle 13: Hauptprodukte aus *E,Z*-FPP (121) durch Katalyse mit verschiedenen STCn. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

Hauptprodukte aus 121			
		Retentionszeit [min]	m/z
Bot2	61	9.629	222
Cop4	261	10.082	222
Hvs1	262	9.107	204
Tps32	262	9.086	204
Tri5	35	9.165	204

Im Gegensatz dazu bildete Cop4 aus *E,Z*-FPP, zusätzlich zu zahlreichen Nebenprodukten bei $t_R = 8.6$ min bis $t_R = 9.3$ min, das Hauptprodukt 261 mit $m/z = 222$, welches jedoch nicht Cubebol darstellt (Abbildung 46). In vorangegangenen Studien konnte LÓPEZ-GALLEGO bereits zeigen, dass Cop4 *E,Z*-FPP als Substrat akzeptiert. Dabei wurden verschiedene Produkte (43, 82, 126-128) beschrieben, welche jedoch durchweg keine Sesquiterpenalkohole umfassen.

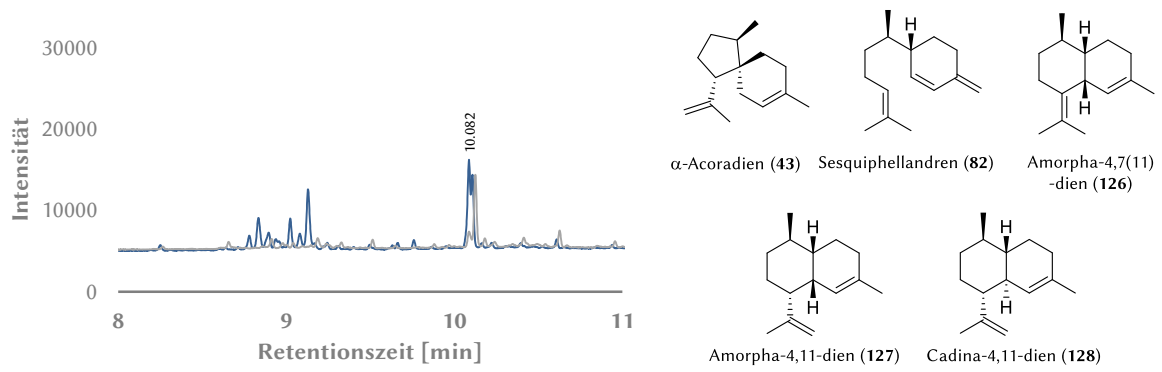


Abbildung 46: FID-Chromatogramme der Produktgemische der Biotransformationen von 121 durch Cop4 (blau) sowie des Extraktes der entsprechenden Negativkontrolle in Abwesenheit der STC (grau) und literaturbekannte Produkte.

Hvs1 und Tps32 erzeugten aus *E,Z*-FPP das Produkt 262, welches jedoch nicht mit anderen, in dieser Arbeit beschriebenen Produkten übereinstimmt. Diese Zuordnung konnte, ebenso wie die Beobachtung, dass Bot2 Presilphiperfolan-8- β -ol bildet, mittels Koinjektionsexperimenten unterstützt werden.

3.6 Semipräparative Biotransformationen und Produktcharakterisierung

3.6.1 Vorarbeiten

Zur Durchführung von Biotransformationen im präparativen Maßstab mussten die Bedingungen so gewählt werden, dass eine große Menge des Substrats in einem möglichst kleinen Volumen und mit möglichst wenig Protein umgesetzt wird. In Optimierungsexperimenten (Kapitel 3.2.3) konnte bereits beobachtet werden, dass Cop4, GcoA und Tps32 durch das Substrat gehemmt werden, wodurch hohe Substratkonzentrationen für die Biotransformation ungünstig sein können.

Für die präparativen Biotransformation der allylischen Pyrophosphate wurden zwei Strategien verfolgt: a) die Durchführung einer Batchreaktion mit einer hohen Substratkonzentration von 1.5 mM, trotz der beschriebenen Substrathemmung, und b) die Durchführung einer Fed-Batch-Reaktion mit kontinuierlicher Substratzugabe. Die Substratkonzentration von 1.5 mM für Batchreaktionen wurde gewählt, da diese in einem Volumen von 50 mL bei einer geringen Ausbeute von 10 – 15 % ausreichend Produkt für NMR-spektroskopischen Untersuchungen erzeugen sollte und im Vergleich zu 150 μ M Substrat keine stärkere Hemmung zu erwarten war. Bei der Fed-Batch-Reaktion wurde hingegen die Strategie verfolgt, die Substrathemmung zu vermeiden, wobei jedoch ein größeres Reaktionsvolumen und eine längere Reaktionszeit in Kauf genommen werden mussten.

Um geeignete Parameter zu ermitteln, wurden diese ausgehend von den zuvor durchgeführten analytischen Enzymtests und Optimierungen verändert. In initialen Experimenten, unter Verwendung des gut zugänglichen und natürlichen Substrats FPP (8), zeigte sich jedoch, dass Konzentrationserhöhungen zur Präzipitation einer oder mehrerer Reaktionskomponenten führten. Daher wurden fünf Zusätze in verschiedenen Konzentrationen getestet, welche die Löslichkeit der einzelnen Bestandteile erhöhen sollten. Diese umfassten Glycerin und DMSO sowie die Detergentien Tween® 20, Tween® 80 und Triton™ X-100 und wurden zunächst mit 500 μ L HEPES-Puffer und 1.5 mM FPP vermischt. Nach Zugabe von 10 mM MgCl₂ wurden die Gemische bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 3 h inkubiert. Die Bewertung der Trübung erfolgte visuell, wobei signifikante Unterschiede zwischen DMSO, Glycerin und den Detergentien erkennbar waren.

Während von den Zusätzen DMSO und Glycerin hohe Konzentrationen (10 % bzw. 20 %) benötigt wurden, um eine Präzipitation zu verhindern, bedurfte es weniger als 0.1 % der Detergentien zur Verbesserung der Löslichkeit. Um negative Einflüsse der Zusätze auf die Aktivität der STCN auszuschließen, wurden zunächst 20 % Glycerin, 10 % DMSO bzw. 0.1 % der Detergentien in analytischen *in vitro* Enzymtests verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels GC-FID, wobei die Peakflächen des gebildeten Produkts unter Verwendung verschiedener Zusätze mit einer Positivkontrolle verglichen wurden. Als Positivkontrolle diente ein analoger Enzymtest mit der jeweiligen STC ohne Zugabe des zu testenden Zusatzes. Die hohen Konzentrationen von Glycerin und DMSO führten zu einer signifikanten Verminderung der Enzymaktivität, während die Detergentien keinen erkennbaren Einfluss auf die Produktbildung zeigten. Da die Aufarbeitung der Enzymtests durch den Einsatz von Detergentien aufgrund der Schaumbildung schwierig war, wurde Tween® 20 als Zusatz ausgewählt, da dieser vergleichsweise wenig Schaumbildung verursachte. Zudem konnte dessen Konzentration in weiteren Enzymtests noch weiter reduziert werden.

Nachdem sich Tween® 20 als geeigneter Zusatz zur Verbesserung der Löslichkeit der Reaktionskomponenten erwiesen hatte, wurde dieser mit 0.02% in allen weiteren Enzymtests im Rahmen des Upscalings für Batchreaktionen mit Tps32 eingesetzt. Parallel zur Erhöhung der FPP-Konzentration auf 1.5 mM wurde die Proteinkonzentration auf bis zu 1 g/L und die Mg-Konzentration

auf 10 mM gesteigert. Eine weitere Erhöhung der Protein- und Mg-Konzentrationen erbrachte keine Steigerung der Ausbeute. Die Auswertung erfolgte mittels GC-FID, jedoch wurde aufgrund der größeren zu erwartenden Produktmenge eine kleinere Menge der Probe auf die Säule aufgetragen als es bei den Enzymtests üblich war. Die Bewertung der Enzymtests erfolgte anhand der Integration der Peakflächen der Hauptprodukte, wobei in einigen Fällen *n*-Decan als interner Standard Verwendung fand.

Da es nicht nur zur Substrathemmung kommen kann, sondern auch eine Inhibierung der STC durch das in der Reaktion entstehende, anorganische Pyrophosphat beschrieben wurde^[49], erfolgten Tests mit einer Pyrophosphatase (PPase), welche das anorganische Pyrophosphat hydrolysiert und somit eine Produkthemmung durch dieses unterbindet. Die analytischen Enzymtests mit PPase erfolgten bei 25 °C, dem Temperaturoptimum der PPase, während die Positivkontrolle in Abwesenheit der PPase regulär bei 37 °C durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich im analytischen Maßstab keine signifikante Steigerung der Ausbeute, dennoch wurde die PPase präventiv für alle semipräparativen Biotransformationen eingesetzt.

Des Weiteren wurden verschiedene Möglichkeiten zur Entfernung von *n*-Pentan erprobt, welches für die Extraktion der Produkte verwendet werden sollte, da diese durch ihre ausgeprägte Flüchtigkeit leicht koevaprieren können. Hingegen bleiben nach Entfernen des Lösungsmittels unter milden Bedingungen meist Spuren des *n*-Pentans zurück, welche die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie erschweren.

Um festzustellen, wie hoch der Terpenverlust bei der Entfernung von *n*-Pentan ist, wurden jeweils ca. 20 mg β -Caryophyllen (94) in 20 – 25 mL *n*-Pentan gegeben. Dabei wurde versucht das *n*-Pentan mittels Destillation mit Vigreuxkolonne bei 45 °C zu entfernen, wobei final CH₂Cl₂ zugegeben wurde, um eine Koevaporation des restlichen *n*-Pentans zu ermöglichen. Außerdem wurde die Evaporation in einer Kugelrohrdestille bei 43 °C und 60 °C sowie am Rotationsverdampfer bei 850 mbar und 40 °C erprobt. Als Abwandlung dieser Prozedur wurden zunächst ca. 70 – 80 % des *n*-Pentans am Rotationsverdampfer und das verbleibende *n*-Pentan unter einem Stickstoffstrom entfernt. Diese Prozedur wurde variiert, indem der Stickstoffstrom entweder bei Raumtemperatur oder bei –5 °C über die organische Phase geleitet wurde.

Das Destillat wurde stets mit einer Kühlfalle aufgefangen und mittels GC-MS auf β -Caryophyllen hin untersucht. Zudem wurde die Menge des verbliebenen β -Caryophyllens ermittelt und mit Hilfe von NMR-Spektroskopie auf Rückstände des *n*-Pentans untersucht. Dabei erwies sich die Entfernung des *n*-Pentans am Rotationsverdampfer als ein besonders schnelles Verfahren. Da dieses jedoch nicht zum vollständigen Entfernen des Lösungsmittels führte, ohne dass beachtliche Teile des Sesquiterpens verloren gehen, empfahl sich die Entfernung des verbliebenen *n*-Pentans mittels Verdampfen unter einem Stickstoffstrom. So wurde insbesondere bei –5 °C ein minimaler Verlust des β -Caryophyllens beobachtet.

Im Rahmen der Fed-Batch-Reaktionen wurde zudem die Verwendung eines Adsorbers für Terpene etabliert, dessen Nutzen bei der Terpenisolierung schon zuvor von FRISTER beschrieben wurde.^[93] Dieser ermöglicht nicht nur die Isolierung der Produkte durch einfaches Abtrennen und Eluieren, sondern entzieht die Produkte auch durch Adsorption aus dem Reaktionsgleichgewicht, so dass eine mögliche Produkthemmung, welche bereits am Beispiel der Pentalenensynthese beschrieben wurde^[49], durch die entstandenen Terpene verhindert wird.

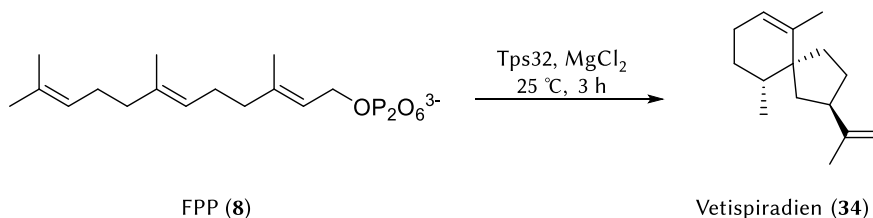
3.6.2 Batchprozesse mit Tps32

Biotransformation von FPP und Produktcharakterisierung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die Enzymaktivität unter Verwendung des natürlichen Substrats FPP (8) festgestellt (Kapitel 3.2.1). Dabei kamen jedoch Zweifel an der korrekten Produktcharakterisierung von Tps32 durch FALARA *et al.* auf,^[27] da das Fragmentierungsmuster und die Retentionszeit des Produkts große Ähnlichkeit mit dem Produkt der Vetispiradiensynthese Hvs1 offenbarte. Eine fehlerhafte Produktzuordnung durch BACK und CHAPPELL^[66] wurde zunächst ausgeschlossen, da sich mehrere ihrer Studien intensiv mit den Eigenschaften von Terpencyclasen wie Hvs1 sowie deren Produktbildung auseinandersetzen, während die Identifizierung von Tps32 durch FALARA *et al.* im Rahmen pflanzenphysiologischer und phylogenetischer Arbeiten erfolgt war.^[27] Weitere Untersuchungen durch Koinjektionsexperimente unterstützten bereits die Vermutung, dass die beiden STCN aus FPP (8) identische Produkte bilden (Kapitel 3.2.2).

Zur Identifizierung des natürlichen Produkts von Tps32 wurde eine Biotransformation im semipräparativen Maßstab durchgeführt, welche die sich anschließende Produktcharakterisierung mittels NMR-Spektroskopie ermöglichte. Die Biotransformation erfolgte mit 1.5 mM FPP und 0.5 g/L Tps32 in HEPES-Puffer (50 mL, pH 7.5) unter Verwendung von 10 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20 sowie einer PPase. Das Gemisch wurde für 3 h bei 25 °C und 130 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Proteinase K und CaCl₂ als Cofaktor zugegeben, gefolgt von weiterer Inkubation für 1 h bei 37 °C. Die Proteinase K dient dem Abbau von Tps32, da dieses bei der Extraktion durch den Kontakt mit organischem Lösungsmittel denaturiert. Die Denaturierung hat zur Folge, dass das Enzym seine Konformation verändert und hydrophobe Aminosäureseitenketten an die Proteinoberfläche gelangen. Diese bewirken einerseits die Aggregation der Proteine, wobei sich die Aggregate meist an der Grenzschicht zwischen wässriger und organischer Phase einfinden und somit die Phasentrennung erschweren. Andererseits können sich die hydrophoben Terpenprodukte an die exponierten hydrophoben Seitenketten der Proteine anlagern und sich dadurch der Extraktion entziehen.

Nach der Extraktion mit *n*-Pentan und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und unter einem Stickstoffstrom verblieb das Rohprodukt in einer Ausbeute von 31% (Schema 23). Das ¹H-NMR-Spektrum wies drei olefinische Protonen bei 5.30 ppm, 4.70 ppm und 4.74 ppm auf, so dass es sich bei dem Produkt nicht um Viridifloren, welche keine olefinischen Protonen besitzt, handeln konnte. Weitere NMR-spektroskopische Analysen mit anschließendem Literaturvergleich ermöglichten die Identifizierung von Vetispiradien (34). Die im Produktgemisch detektierten Spuren von Nebenprodukten wurden anhand eines Datenbankvergleichs der Fragmentierungsmuster den Sesquiterpenen Valencen (263), Eremophilen (264) und β-Selinen (265) zugeordnet.

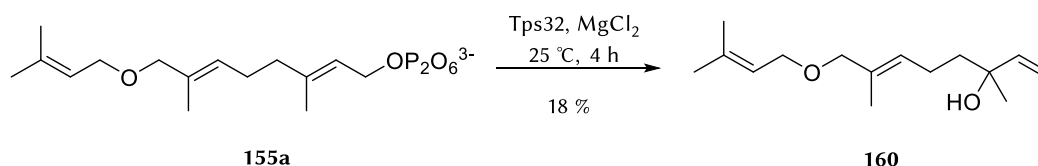


Schema 23: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation von FPP (8) führte zur Bildung von Vetispiradien (34) in einer Ausbeute von 31 %.

Biotransformation des Pyrophosphats 155a und Charakterisierung des Sesquiterpenoids 160

Die semipräparative Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Derivats 155a durch Tps32 erfolgte unter ähnlichen Bedingungen wie die Biotransformation von FPP (8). Allerdings wurde die Tween® 20-Konzentration, zwecks vereinfachter Extraktion, gesenkt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 3.0 mg des Rohprodukts 160 erhalten. Die Tps32-katalysierte Biotransformation des Pyrophosphats 155a erfolgte in einer Ausbeute von 18 % (Schema 24) und war damit sogar höher als die Biotransformation im analytischen Maßstab (Kapitel 3.4.1).

Aufgrund der erhöhten Substratkonzentration im präparativen Maßstab und der damit verbundenen Substrathemmung, wäre allerdings eine geringere Ausbeute als in den analytischen Enzymtests zu erwarten gewesen. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die unnatürlichen Pyrophosphate keine oder eine geringere Substrathemmung verursachen. Möglicherweise lassen sich auch die Ausbeuten vom analytischen generell nicht auf den präparativen Maßstab übertragen, da viele Bedingungen, wie z.B. eine längere Reaktionszeit, eine höhere Mg- und STC-Konzentration, der Zusatz der PPase sowie die Verwendung von Glas- anstelle von Plastikreaktionsgefäßen, von den analytischen Enzymtests abweichen.



Schema 24: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Derivats 155a führte zur Bildung des azyklischen Alkohols 160 in einer Ausbeute von 18 %. Die Konfiguration des stereogenen Zentrums wurde nicht bestimmt.

Die Strukturaufklärung des azyklischen Alkohols 160 erwies sich aufgrund von Verunreinigungen und Signalüberlagerungen im Bereich zwischen 1.0 ppm und 2.3 ppm als schwierig. Daher erfolgte die Strukturaufklärung überwiegend mit Hilfe von 2D-NMR-spektroskopischen Analysen (Abbildung 47). Insgesamt konnten fünf olefinische Protonen im ^1H -NMR-Spektrum identifiziert werden. Die Protonen der terminalen Doppelbindung wiesen markante Kopplungskonstanten auf, welche ihre Anordnung im Produkt offenbarten. Die vicinalen Kopplungen der *cis* bzw. *trans* Anordnung unterschieden sich dabei charakteristisch und wiesen Kopplungskonstanten von 17 Hz (*trans*) und 10 Hz (*cis*) auf. Während die allylischen Methylgruppen im ^1H -NMR-Spektrum zu Signalen bei 1.69 ppm und 1.77 ppm führten, zeigte die Methylgruppe am quartären Kohlenstoffatom eine signifikant geringere chemische Verschiebung von 1.32 ppm. Obwohl die massenspektrometrische Analyse kein $m/z = 238$ offenbart hatte, konnte durch das quartäre Kohlenstoffatom bei 73.3 ppm auf die Anwesenheit einer Alkoholfunktion geschlossen werden. Es ist davon auszugehen, dass die korrekte Masse durch Eliminierung des Alkohols als Folge der Elektronenstoßionisation nicht über die verwendete GC-MS-Analytik erkannt werden kann. Weitere Untersuchungen wie die GC-MS-Analyse gekoppelt mit chemischer Ionisierung oder eine Derivatisierung des Alkohols mit 1-Trimethylsilylimidazol bieten sich an, um die Hydroxygruppe zweifelsfrei zu detektieren.

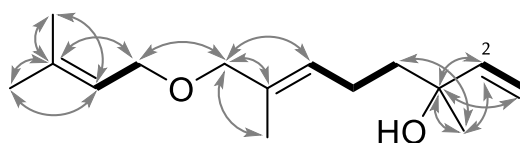
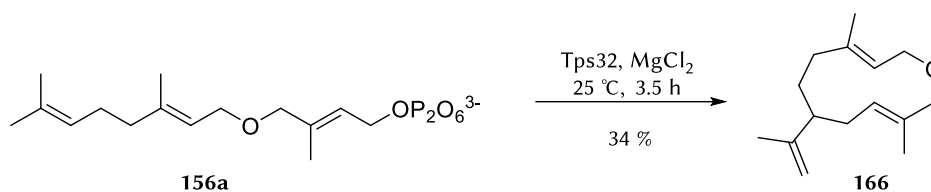


Abbildung 47: Ausgewählte C-H-Kopplungen (graue Pfeile) und H-H-Kopplungen (dicke Linien) des azyklischen Ethers 160, welche mit Hilfe von H-H-COSY- und HMBC-Experimenten ermittelt wurden.

Biotransformation des Pyrophosphats 156a und Charakterisierung des Sesquiterpenoids 166

Die Biotransformation des Derivats 156a durch Tps32 wurde ähnlich wie die zuvor beschriebenen Batchreaktionen durchgeführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden etwa 5.0 mg des Rohprodukts (166) erhalten, welches mittels NMR-Spektroskopie analysiert wurde. Dabei zeigte sich, dass Tps32 das etherfunktionalisierte FPP-Derivat 156a zu einem 11-gliedrigen makrozyklischen Ether zyklisiert (Schema 25).



Schema 25: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Derivats 156a führte zur Bildung des makrozyklischen Ethers 166. Die Konfiguration des stereogenen Zentrums wurde nicht bestimmt.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigten sich vier olefinische Protonen, wovon zwei an dasselbe Kohlenstoffatom gebunden sind. Zudem konnten relativ breite Signale von drei Methylgruppen bei 1.68 ppm, 1.69 ppm und 1.73 ppm festgestellt werden, welche auf allylische Methylgruppen hindeuten. Zusammen mit den sechs Signalen olefinischer Kohlenstoffatome konnte somit auf insgesamt drei Doppelbindungen geschlossen werden. Da es weder bei den massenspektrometrischen noch bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen Hinweise auf die Anwesenheit einer Hydroxyfunktion gab, war eine Zyklisierung des Farnesylykations unter Entstehung einer neuen C1-C10-Bindung durch die STC anzunehmen. Die detaillierte Strukturaufklärung des Makrozyklus 166 erfolgte weitestgehend durch 2D-NMR-Spektroskopie (Abbildung 48). Des Weiteren erfolgten NOE-Experimente zur Bestimmung der Konfiguration der C2-C3-Doppelbindung. Die Intensität der Wechselwirkung der Methylgruppe an C3 mit dem olefinischen Proton an C2 wies dabei keine signifikanten Unterschiede zu den Wechselwirkungen an der C6-C7-Doppelbindung, welche nicht in die Zyklisierung involviert war, auf, so dass für die C2-C3-Bindung ebenfalls eine *E*-konfigurierte Doppelbindung angenommen wurde. Eine Bestimmung des stereogenen Zentrums an C10 erfolgte nicht. Allerdings wurden von HARMS GC-FID-Messungen mit chiralen Säulen durchgeführt, welche die Vermutung, dass die Biotransformation ein enantiomerenreines Produkt liefert, unterstützen.^[94]

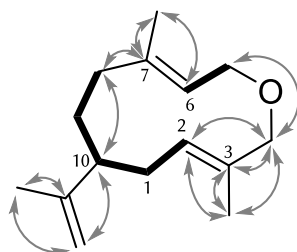


Abbildung 48: Ausgewählte C-H-Kopplungen (graue Pfeile) und H-H-Kopplungen (dicke Linien) des makrozyklischen Ethers 166, welche mit Hilfe von H-H-COSY- und HMBC-Experimenten ermittelt wurden.

Die Biotransformation des Pyrophosphats 156a erfolgte in einer Ausbeute von 34 %, welche entsprechend der analytischen Enzymtests, deutlich höher ausfiel als die Biotransformation des Pyrophosphats 155a. Außerdem wurde erneut eine höhere Ausbeute als im analytischen Maßstab gefunden. Die Diskussion über den Mechanismus der Tps32-katalysierten Bildung von 160 und 166 findet sich in Kapitel 3.7.

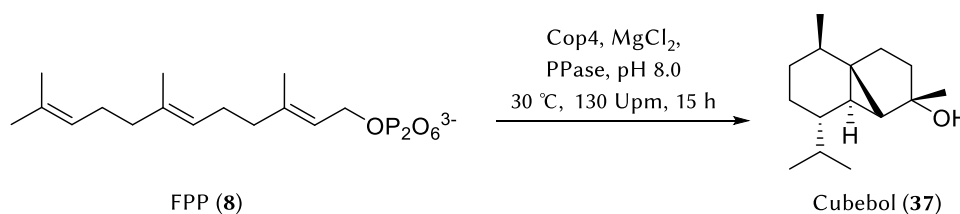
3.6.3 Biotransformation mit kontinuierlicher Substratzugabe

Im Gegensatz zu den erfolgreich durchgeführten Biotransformationen der etherfunktionalisierten FPP-Derivate **155a** und **156a** lieferten initiale Versuche zur Biotransformation von Derivat **156b** mit Tps32 als Batchreaktion zusätzlich zum Hauptprodukt **185** auch große Mengen des Alkohols **186**. Daher wurden die Biotransformationen der thioetherfunktionalisierten Derivate **155b** und **156b** sowie des Pyrophosphats **201** als Fed-Batch-Reaktion durchgeführt. Um möglichst ähnliche Bedingungen wie in den analytischen Enzymtests für die semipräparative Biotransformation zu schaffen, wurde ein Verfahren mit kontinuierlicher Zugabe des Substrats und geringerer STC-Konzentration als im Batchprozess entwickelt. Dies hat zudem den Vorteil, dass die Substrathemmung (Kapitel 3.2.3) minimiert wird.

Biotransformationen mit Cop4

Das Prinzip der Fed-Batch-Reaktion zur Biotransformation von FPP-Derivaten wurde zunächst mit Cop4 und FPP (**8**) getestet. Diese erfolgte in TRIS-Puffer (400 mL, pH 8.0) mit einer Startkonzentration von 50 μM FPP, da Versuche zur Optimierung der Substratkonzentration für die Bildung von Cubebol keine Substrathemmung bei 50 μM FPP zeigten⁹. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 30 °C, 130 Upm und mit kontinuierlicher Substratzugabe. Obwohl Cop4 nach mehrstündiger Inkubation bei 30 °C nicht präzipitierte, wurde etwa alle 3 h weiteres Enzym zugegeben, da bei Untersuchungen zur Enzymstabilität die Abnahme der Enzymaktivität nach 3 h beobachtet wurde (Kapitel 3.2.3). Um die Präzipitation der Reaktionskomponenten zu verhindern wurde 0.005 % Tween® 20 zugesetzt. Da sich eine Präzipitation, welche vermutlich auf das Substrat zurückzuführen ist, dennoch nicht verhindern ließ, wurde die Konzentration von Tween® 20 in nachfolgenden semipräparativen Biotransformationen verdoppelt. Nach der Extraktion mit *n*-Pentan und Entfernen des Lösungsmittels konnten 12.2 mg (30 %) eines Produktgemisches erhalten werden.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung offenbarte ein quartäres Kohlenstoffatom bei einer Verschiebung von 80.4 ppm sowie eine benachbarte Methylgruppe. Dessen Protonen weisen im ¹H-NMR-Spektrum aufgrund der Hydroxygruppe am quartären Kohlenstoffatom eine chemische Verschiebung von 1.28 ppm auf. Im Vergleich dazu ist die chemische Verschiebung der Protonen an den Methylgruppen von C12, C13 und C14 mit 0.92 ppm, 0.93 ppm und 0.97 ppm deutlich geringer. Weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten im Zusammenhang mit den vorangegangenen massenspektrometrischen Untersuchungen (Kapitel 3.2.1) Cubebol (**37**) als Produkt der Biotransformation von FPP durch Cop4 gemäß der Literatur^[20] bestätigen (Schema 26).

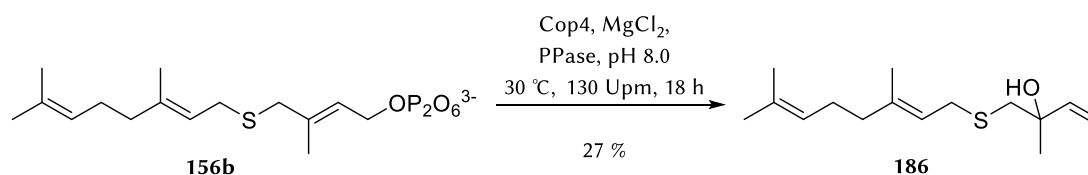


Schema 26: Die Cop4-katalysierte semipräparative Biotransformation von FPP (**8**) führte zur Bildung von Cubebol (**37**) als Hauptprodukt.

⁹ Unter Verwendung von 50 μM FPP konnte keine Substrathemmung im Vergleich zu einer Konzentration von 10 μM beobachtet werden. Geringere Substratkonzentrationen wurden nicht untersucht, da sie für eine semipräparative Biotransformation nicht in Frage kamen.

Anschließend wurde die Reinigung des Rohproduktes mittels präparativer GC durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch, dass Cubebol keine ausreichend hohe Stabilität aufweist, so dass der Sesquiterpenalkohol nicht in reiner Form erhalten wurde.

Nach der erfolgreichen Biotransformation von FPP (8) erfolgte die Umsetzung des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats **156b** mit Cop4 unter den etablierten Fed-Batch-Bedingungen. Nach der Extraktion mit *n*-Pentan und Entfernen des Lösungsmittels konnten 10.6 mg des Rohprodukts erhalten werden (Schema 27). Ebenso, wie bei den Biotransformationen der etherfunktionalisierten Derivate durch Tps32, liegt die Ausbeute im präparativen Maßstab mit 27 % deutlich höher als bei den zuvor durchgeführten Enzymtests (Kapitel 3.4.2). Das Produkt konnte ohne weitere Reinigung mittels NMR-Spektroskopie als azyklischer Alkohol **186** identifiziert werden.



Schema 27: Die Cop4-katalysierte semipräparative Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats **156b** führte zur Bildung des azyklischen Alkohols **186** in einer Ausbeute von 27 %. Die Konfiguration des stereogenen Zentrums wurde nicht bestimmt.

Das ¹H-NMR-Spektrum des Alkohols **186** zeigte ebenso wie beim azyklischen Alkohol **160** fünf olefinische Protonen, von denen drei an der terminalen Doppelbindung charakteristische Kopplungskonstanten von 10 Hz (*cis*) und 17 Hz (*trans*) erzeugten. Ebenfalls konnte das quartäre Kohlenstoffatom C3 mit einer chemischen Verschiebung von 72.4 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum ermittelt werden. Im Fall des Thioethers **186** wiesen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung mit *m/z* = 254 auf die Hydroxygruppe an C3 hin. Die Strukturaufklärung war aufgrund von Signalüberlagerungen im Bereich um 2 ppm aufwendig. Insbesondere die Aufnahme von 2D-heteronuklear korrelierten NMR-Spektren, trugen zur Verifizierung der gesamten Struktur des Alkohols **186** bei (Abbildung 49).

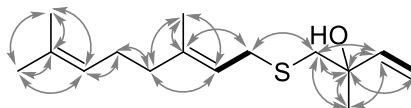
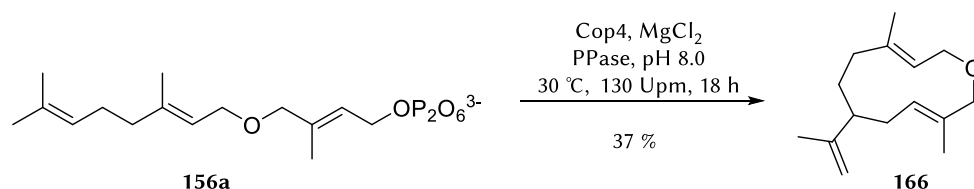


Abbildung 49: C-H-Kopplungen (graue Pfeile) des Alkohols **186**, welche mit Hilfe des HMBC-Experiments ermittelt wurden.

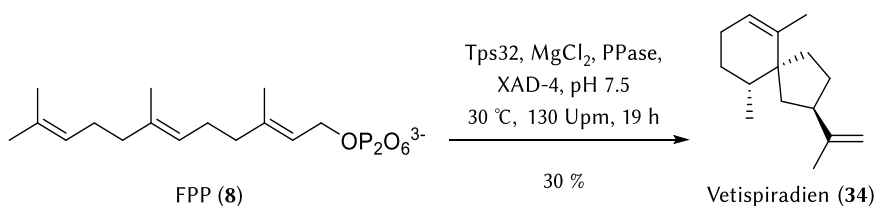
Des Weiteren erfolgte mit Cop4 die semipräparative Biotransformation des etherfunktionalisierten FPP-Derivats **156a** zum Makozyklus **166** (Schema 28). Dieser wurde zuvor bereits durch die Tps32-katalysierte Biotransformation im Batchprozess erhalten. Der Makrozyklus **166** konnte durch die Cop4-katalysierte Fed-Batch-Biotransformation in 37% Ausbeute erhalten werden. NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigten die anhand des Fragmentierungsmusters und des Koinjektionsexperiments getroffene Annahme, dass die Hauptprodukte der Tps32- und der Cop4-katalysierten Biotransformation von Derivat **156b** identisch sind. Ebenso wie im analytischen Maßstab war die Ausbeute der Cop4-katalysierten Biotransformation höher als bei der Tps32-katalysierten Biotransformation. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Cop4-katalysierte Biotransformation mehr Nebenprodukte erzeugte.



Schema 28: Die Cop4-katalysierte semipräparative Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats **156a** führte zur Bildung des Makrozyklus **166** in 37 % Ausbeute. Die Konfiguration des stereogenen Zentrums wurde nicht bestimmt.

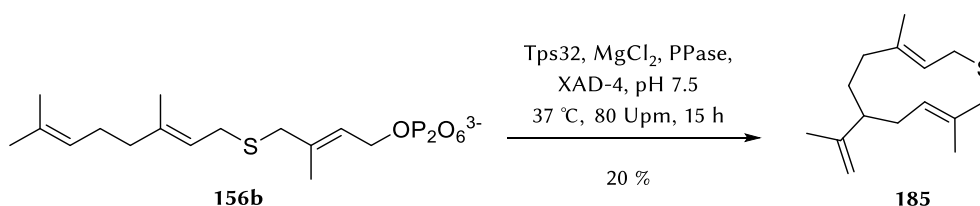
Biotransformationen mit Tps32

Im Gegensatz zu Cop4 zeigte Tps32 bei Optimierungsexperimenten eine starke Substrathemmung (Kapitel 3.2.3), weshalb semipräparative Biotransformationen nur mit einer Substratkonzentration von 10 μM durchgeführt wurden. Um die Löslichkeit des Substrats zu verbessern, wurde der Substratlösung, welche kontinuierlich zugeführt wurde, Tween® 20 zugesetzt. Zudem wurde die Verwendung des hydrophoben Adsorbers XAD-4 getestet. Dafür wurden parallel zwei Biotransformationen mit Tps32 und FPP (**8**) durchgeführt, welche sich lediglich in der Zugabe des hydrophoben Adsorbers bzw. der Isolierung des Produkts unterschieden. Dabei konnte das Rohprodukt unter Verwendung des Adsorbers nur in einer Ausbeute von 30 % erhalten werden (Schema 29), während die Ausbeute ohne Verwendung des Adsorbers 60 % betrug. Allerdings offenbarte die NMR-spektroskopische Analyse des extrahierten Produkts einen größeren Anteil an Verunreinigungen als bei Verwendung des hydrophoben Adsorbers. Da mittels Extraktion der wässrigen Phase überprüft wurde, ob das gesamte Produkt an den Adsorber gebunden war, ist die erhöhte Menge des Rohprodukts vermutlich den zusätzlichen Verunreinigungen zuzuschreiben. Allenfalls ist es denkbar, dass das Produkt nicht vollständig von Adsorber eluiert wurde. Um eine Reinigung der Produkte mittels präparativer GC zu vermeiden, ist die Isolierung eines möglichst sauberen Produktes vorteilhaft. Deshalb ist die Verwendung des hydrophoben Adsorbers für zukünftige Biotransformationen zu bevorzugen. Im Vergleich zur Batchreaktion konnte allerdings trotz Verminderung der Substrathemmung keine Steigerung der Ausbeute erreicht werden.



Schema 29: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation von FPP (**8**) führte als Fed-Batch-Prozess unter Verwendung des hydrophoben Adsorbers XAD-4 zur Bildung von Vetispiradien (**34**) in einer Ausbeute von 30 %.

Bei der Fed-Batch-Reaktion mit Tps32 und FPP (**8**) wurde eine starke Enzympräzipitation beobachtet, welche auf die hohe Temperatur und das Schütteln zurückgeführt werden konnte (Kapitel 3.2.3). Daher wurde die Schüttelfrequenz für weitere Tps32-katalysierte Biotransformationen verringert. Bei Biotransformationen der thioetherfunktionalisierten Analoga **155b** und **156b** wurde die Temperatur zudem auf 37 $^\circ\text{C}$ erhöht, da diese im analytischen Maßstab zu einer höheren Ausbeute der entsprechenden thioetherfunktionalisierten Produkte geführt hatte (Kapitel 3.4.2). Durch Tps32-katalysierte Biotransformation des Derivats **156b** konnten 2.5 mg des Produkts **185** erhalten und dessen Struktur mittels NMR-spektroskopischer Analyse aufgeklärt werden (Schema 30).



Schema 30: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats **156b** führte als Fed-Batch-Prozess zur Bildung des makrozyklischen Thioethers **185** in einer Ausbeute von 20 %.

Dabei zeigten sich vier olefinische Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, wovon zwei an dasselbe Kohlenstoffatom gebunden sind. Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigten sich zudem Signale von sechs olefinischen Kohlenstoffatomen, so dass drei Doppelbindungen im Produkt vorliegen mussten. Da die Anwesenheit einer Hydroxyfunktion aufgrund der massenspektrometrischen Analyse ausgeschlossen wurde, konnte auf ein zyklisches Produkt geschlossen werden. Mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte die gesamte Struktur des Makrozyklus aufgeklärt werden (Abbildung 50). Der dabei identifizierte, 11-gliedrige makrozyklische Thioether **185** ist demnach analog zu dem bereits identifizierten makrozyklischen Ether **166**. Die präparative Biotransformation erfolgte in einer Ausbeute von 20 % und entspricht in etwa dem mittels analytischen Enzymtests ermittelten Wert.

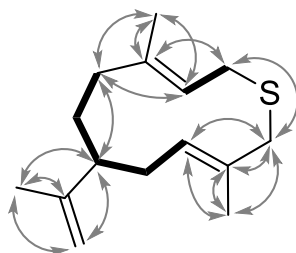
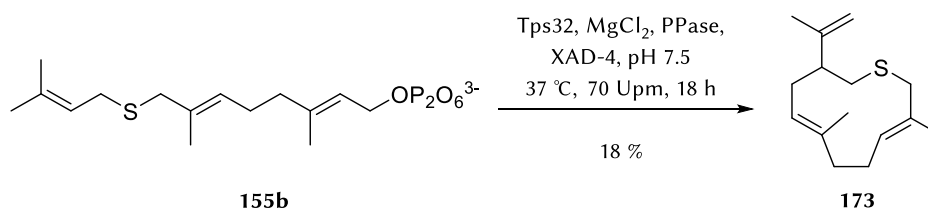


Abbildung 50: C-H-Kopplungen (graue Pfeile) und H-H-Kopplungen (dicke Linien) des makrozyklischen Thioethers **185**, welche mit Hilfe des HMBC-Experiments ermittelt wurden.

Die Tps32-katalysierte Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats **155b** erfolgte in zwei parallelen Ansätzen, welche ansonsten analog zu vorherigen Biotransformationen mit Tps32 durchgeführt wurden, da die Ausbeute im analytischen Maßstab deutlich geringer war, als mit anderen Substraten (Kapitel 3.4.2). Dennoch konnten 7.2 mg des Produkts **173** erhalten und die Ausbeute mit 18 % im Vergleich zum analytischen Enzymtest erneut deutlich übertroffen werden (Schema 31).



Schema 31: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats **155b** führte als Fed-Batch-Prozess zur Bildung des makrozyklischer Thioethers **173** in einer Ausbeute von 18 %.

Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte das Produkt **173** wiederum als makrozyklischer Thioether identifiziert werden. Dafür waren erneut die Art und Anzahl der olefinischen

Doppelbindungen markant. Durch HMBC-Experimente konnte die makrozyklische Struktur des Produkts nachgewiesen werden, während H-H-COSY-Experimente aufgrund der Signalüberlagerungen zwischen 1.8 ppm und 2.5 ppm nur wenig zur Strukturaufklärung beitragen konnten (Abbildung 51). Zudem zeigte sich das Kohlenstoffatom C7 weder im ^{13}C -NMR-Spektrum noch in den 2D-heteronuklear korrelierten NMR-Spektren.

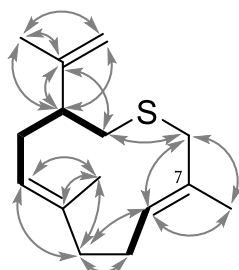
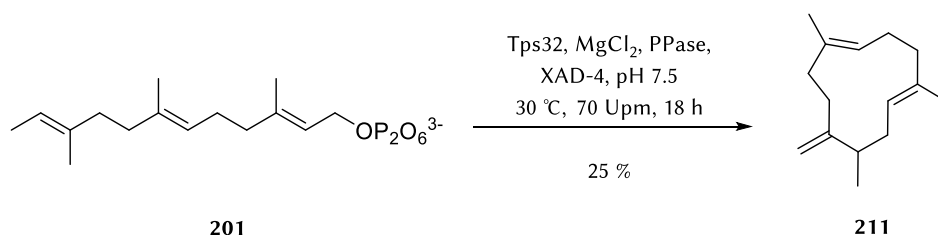


Abbildung 51: Ausgewählte C-H-Kopplungen (graue Pfeile) und H-H-Kopplungen (dicke Linien) des makrozyklischen Thioethers **185**, welche mit Hilfe von H-H-COSY- und HMBC-Experimenten ermittelt wurden.

Bei den Makrozyklus **173** und **185** wurde auf die Bestimmung des stereogenen Zentrums an C10 verzichtet. Stattdessen wurden von HARMS GC-FID-Messungen mit chiralen Säulen durchgeführt, welche die Vermutung, dass die Biotransformation ein enantiomerenreines Produkt liefert, unterstützen.^[94] Die Diskussion über den Mechanismus der Tps32-katalysierten Bildung von **173** und **185** findet sich in Kapitel 3.7.

Des Weiteren wurde die Tps32-katalysierte Biotransformation des FPP-Derivats **201** im semipräparativen Maßstab durchgeführt. Diese erfolgte analog zur Biotransformation der thioetherfunktionalisierten Derivate (Schema 32). Allerdings wurde die Temperatur aufgrund der durch semiquantitative Ausbeutebestimmungen gewonnenen Ergebnisse (Kapitel 3.5.1), auf 30 °C reduziert. Durch die Biotransformation konnte **211** in einer Ausbeute von 25 % erhalten werden, welche etwas geringer ist, als die in analytischen Enzymtests ermittelte Ausbeute. Da das ^1H -NMR-Spektrum noch deutliche Signale von Pentan offenbarte, wurde das Lösungsmittel ein zweites Mal unter einem Schickstoffstrom evaporiert. Anschließend konnte allerdings kein Produkt mehr zurückgewonnen werden, so dass keine weiteren NMR-spektroskopischen Messungen vorgenommen werden konnten.

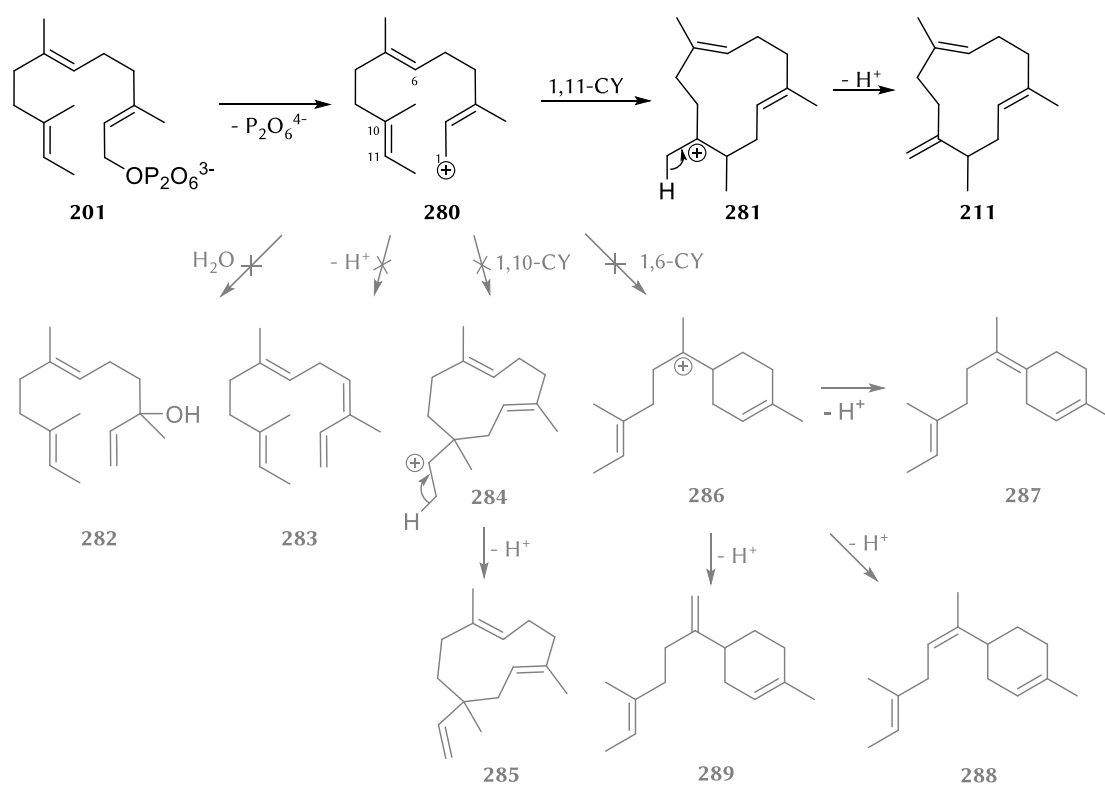


Schema 32: Die Tps32-katalysierte semipräparative Biotransformation des FPP-Derivats **201** führte als Fed-Batch-Prozess zur Bildung Sesquiterpens **211** in einer Ausbeute von 25 %. Der Strukturvorschlag für das Terpen **211** erfolgte lediglich anhand des ^1H -NMR Spektrens.

Anhand des ^1H -NMR-Spektrens wird vorgeschlagen, dass es sich bei dem Sesquiterpen **211** ebenfalls um einen 11-gliedrigen Makrozyklus handelt. Die Fähigkeit von Tps32 zur Bildung von 11-gliedrigen Makrozyklen konnte bereits anhand der Produkte **160**, **166** und **185** gezeigt werden, welche allesamt durch Zyklisierung mit anschließender Deprotonierung an C12 gebildet werden. Das vorliegende ^1H -NMR-Spektrum weist auf die Existenz von vier olefinische Protonen hin, welche maximal eine

Zyklisierung des Analogons **201** zur Bildung des Produkts **211** erlaubt. Die Entstehung des Farnesen-Derivats **282** sowie der Zyklisierungsprodukte **287** und **288** kann daher anhand der Anzahl der Doppelbindungsprotonen ausgeschlossen werden (Schema 33).

Des Weiteren zeigt das ¹H-NMR-Spektrum Signale von drei Methylgruppen. Zwei Signale weisen das typische breite Singulett bei ca. 1.5 ppm auf, welches allylische Methylgruppen kennzeichnet. Das dritte Signal ist hingegen ein Duplett bei 0.97 ppm, so dass die dazugehörige Methylgruppe mit einem tertiären Kohlenstoffatom verknüpft sein muss. Dies lässt sich weder bei Sesquiterpenen nach 1,10- noch nach 1,6-Zyklisierung beobachten, so dass die Entstehung der Makrozyklen **285** oder **289** ausgeschlossen wurde. Auch der azyklische Alkohol **283** erfüllt diese Anforderungen nicht. Lediglich das Produkt **211** der 1,11-Zyklisierung weist diese Eigenschaften auf. Zur Verifizierung dieser Struktur müssen allerdings noch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen erfolgen, da WAGNER-MEERWEIN-Umlagerungen, Hydrid- oder Methylshifts nicht vollends ausgeschlossen werden können.

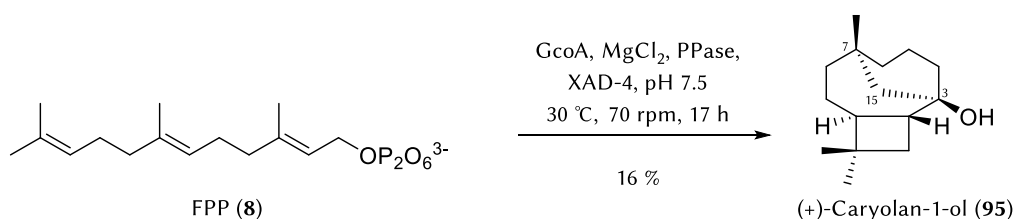


Schema 33: Mögliche Produkte einer Tps32-katalysierten Biotransformation des Pyrophosphats **201** mit Strukturvorschlag für das Sesquiterpen **211**. Die Addition von Wasser an Allylkation **280**, die Deprotonierung von **280** sowie eine 1,10-Zyklisierung zu **284** und eine 1,6-Zyklisierung zu **286** mit anschließender Deprotonierung konnten anhand des ¹H-NMR-Spektrums ausgeschlossen werden. Abkürzung: CY = Zyklisierung.

Biotransformationen mit GcoA

Zur Identifizierung der Produkte 174 und 215 muss zwangsläufig eine semipräparative Biotransformation mit GcoA durchgeführt werden, da diese Produkte lediglich in Produktgemischen dieser STC detektiert wurden. Ebenso wie mit Tps32 und Cop4 wurde der Fed-Batch-Prozess zunächst mit dem natürlichen Substrat FPP (8) getestet. Dabei war die Durchführung identisch mit den Biotransformationen mit Tps32, da GcoA ebenfalls eine Tendenz zur Instabilität sowie eine starke Substrathemmung zeigte.

Die Biotransformation von FPP im semipräparativen Maßstab erwies sich als besonders schwierig, da bei 30 °C eine starke Proteinpräzipitation auftrat. Es konnten 3.0 mg eines Produktgemisches erhalten werden, dessen Hauptprodukt (+)-Caryolan-1-ol darstellte (Schema 34).

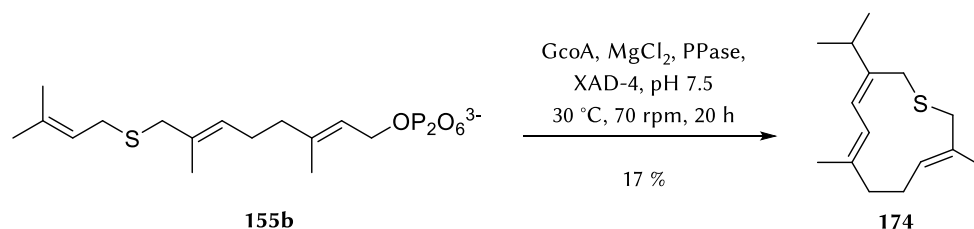


Schema 34: Die GcoA-katalysierte semipräparative Biotransformation von FPP (8) führte als Fed-Batch-Prozess zur Bildung von (+)-Caryolan-1-ol (95) in einer Ausbeute von 16 %.

Die Identifizierung von (+)-Caryolan-1-ol erfolgte durch NMR-spektroskopische Analyse. Dabei zeigten sich keine olefinischen Protonen im ¹H-NMR-Spektrum und nur drei Signale von Methylgruppen, da die Methylgruppe an C3 in die finale Zyklisierung involviert ist. Im ¹³C-NMR-Spektrum erscheint das Kohlenstoffatom C3 als quartäres Atom mit einer charakteristischen chemischen Verschiebung von 71.0 ppm, welche durch die benachbarte Hydroxygruppe bedingt ist. Letztere zeigte sich bereits anhand der massenspektrometrischen Analyse mit *m/z* = 222. Des Weiteren konnten mit Hilfe eines HMBC-Experiments Kopplungen innerhalb des Vierrings sowie mit benachbarten Kohlenstoffatomen nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich Kopplungen zwischen C3 und C7 mit den Protonen an C15.

Eine weitere Reinigung des Hauptprodukts erfolgte nicht. Die Ausbeute der präparativen Biotransformation war mit 16 % etwas geringer als die Biotransformation im analytischen Maßstab, was auf die schlechte Stabilität der STC und die damit einhergehende Präzipitation zurückzuführen ist.

Die GcoA-katalysierte Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats 155b erfolgte analog. Dabei wurde 4 mg des Produkts 174 isoliert, welches sich nach NMR-spektroskopischer Untersuchung ebenfalls als makrozyklischer Thioether herausstellte (Schema 35). Die Ausbeute der Biotransformation ist mit 17 % ebenfalls geringer als im analytischen Maßstab.



Schema 35: Die GcoA-katalysierte semipräparative Biotransformation des thioetherfunktionalisierten FPP-Derivats 155b führte als Fed-Batch-Prozess zur Bildung des makrozyklischen Thioethers 174 in einer Ausbeute von 17 %.

Die Charakterisierung der Struktur des Makrozyklus 174 erfolgte mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Analysen. Im Gegensatz zu den anderen Makrozyklen zeigte das ^1H -NMR-Spektrum nur drei olefinische Protonen, während das ^{13}C -NMR-Spektrum weiterhin sechs olefinische Kohlenstoffatome aufwies. Die Protonen der konjugierten Doppelbindung an C1 und C2 wiesen eine Kopplung sowohl im zweidimensionalen H-H-COSY-Spektrum, als auch im ^1H -NMR-Spektrum, mit einer Kopplungskonstante von 9.8 Hz, auf. Zudem zeigten die Protonen an zwei Methylgruppen mit 1.05 ppm und 1.07 ppm eine deutlich geringere chemische Verschiebung als die Protonen der zwei allylischen Methylgruppen, so dass der Zyklisierungsmechanismus zur Bildung des Makrozyklus 174 nicht mit einer Deprotonierung an der Isopropylgruppe enden konnte. Durch C-H- und H-H-Kopplungen aus zweidimensionalen NMR-Spektren konnte schließlich die Struktur des Makrozyklus ermittelt werden (Abbildung 52). Für die Aufklärung der relativen Stereochemie der konjugierten Doppelbindungen im Makrozyklus 174 wurden NOE-Experimente durchgeführt. Dabei wurden Wechselwirkungen der Protonen 11-H, 12-H₃, 13-H₃ und 15-H₃ mit 1-H gefunden. Hingegen konnten keine Interaktionen zwischen 9-H₂ und 2-H mit 1-H detektiert werden so dass eine Z-konfigurierte Doppelbindung zwischen C1 und C10 angenommen wurde.

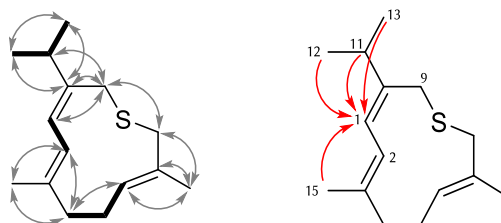


Abbildung 52: Strukturaufklärung von Makrozyklus 174 durch NMR-spektroskopische Untersuchungen. Ausgewählte C-H-Kopplungen (graue Pfeile) und H-H-Kopplungen (schwarze Pfeile) wurden mit Hilfe von H-H-COSY- und HMBC-Experimenten ermittelt. NOE (rote Pfeile) zwischen relevanten Protonen im Makrozyklus 174 dienen der Aufklärung der relativen Stereochemie der C1-C10-Doppelbindung.

Ebenso, wie bei den Makrozyklen 166, 173 und 185 erfolgten durch HARMS GC-FID-Messungen mit chiralen Säulen, welche die Vermutung, dass die Biotransformation ein enantiomerenreines Produkt liefert, unterstützen.^[94]

3.6.4 Olfaktorische Analyse ausgewählter Sesquiterpenoide

Aufgrund der steigenden Nachfrage an neuen Duftstoffen, wurde eine olfaktorische Analyse ausgewählter Sesquiterpenoide durchgeführt, um ihre Bedeutung für die Duftstoffherstellung abzuwägen. Die ether- und thioetherfunktionalisierten Terpenoide 166, 173, 174, 185 und 186 sowie die natürlichen Sesquiterpenoide Vetispiradien (34) und Caryolan-1-ol (95) sollten daher mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) analysiert werden. Dafür wurden mittels präparativer Biotransformation erzeugte Produktgemische (Tabelle 14) gaschromatographisch getrennt und über einen *Olfactory Detection Port* freigesetzt.

Tabelle 14: Verwendete Produktgemische und Ergebnisse der GC-O-Messungen.

Biotransformation	Untersuchte Sesquiterpenoide	Olfaktorische Bewertung
Tps32 + FPP (8)	Vetispiradien (34)	geruchlos
Tps32 + 155b	Makrozyklus 173	geruchlos
Tps32 + 156b	Makrozyklus 185	geruchlos
GcoA + FPP (8)	Caryolan-1-ol (95)	geruchlos
	β -Caryophyllen (94)	mild, würzig, süß
GcoA + 155b	Makrozyklus 174	geruchlos
Cop4 + 156a	Makrozyklus 166	geruchlos
	Nebenprodukt 167	blumig, frisch, Veilchen
Cop4 + 156b	Alkohol 186	geruchlos

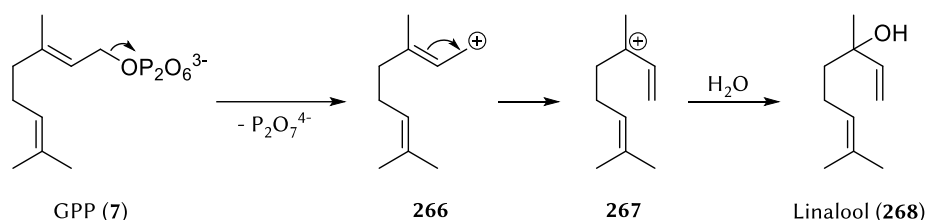
Die Hauptprodukte erwiesen sich allerdings in allen Fällen als geruchslos. Stattdessen konnten häufig Spuren von Geraniol (143) und diverser Schwefelverbindungen, welche auf Intermediate oder Nebenprodukte der Synthese zurückzuführen sind, detektiert werden. Lediglich das Nebenprodukt 167 der Cop4-katalysierten Biotransformation von 156a wies einen blumigen, frischen Geruch von Veilchen auf.

3.7 Substratazeptanz von Sesquiterpencyclasen und Entstehung unnatürlicher Terpene

Durch semipräparative Biotransformationen der unnatürlichen FPP-Derivate **155a**, **155b**, **156a**, **156b** und **201** konnten sieben unnatürliche Terpene erhalten und mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Des Weiteren erfolgten Ausbeutebestimmungen, welche Rückschlüsse auf die Substratazeptanz liefern. Im Folgenden werden die Mechanismen zur Bildung der identifizierten Produkte erläutert, Ursachen für mangelnde Substratazeptanz eruiert sowie die Entstehung weiterer denkbarer Produkte diskutiert.

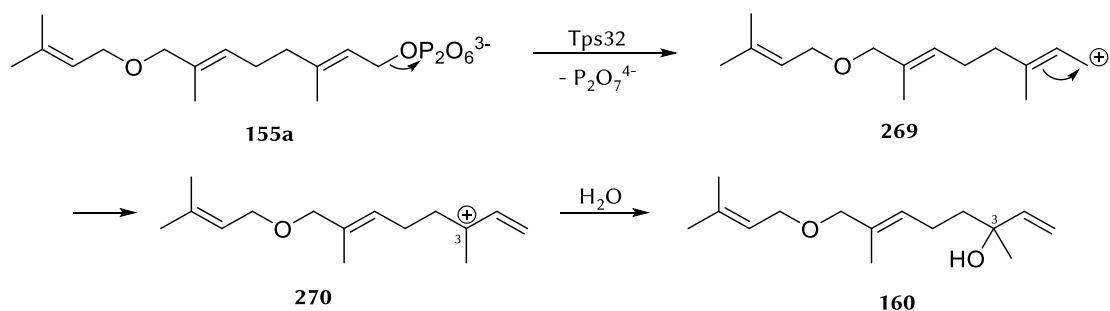
Substratazeptanz und Transformation von heteroatomfunktionalisierten FPP-Derivaten

Ausgehend vom etherfunktionalisierten Derivat **155a** und vom thioetherfunktionalisierten Derivat **156b** wurden die zwei azyklische Alkohole **160** und **186** erhalten. Deren Bildung ist analog zur Biosynthese von Linalool (**268**) aus GPP (**7**), bei der das Carbokation an C3 des Intermediats **267** durch Wasser abgefangen wird (Schema 36).



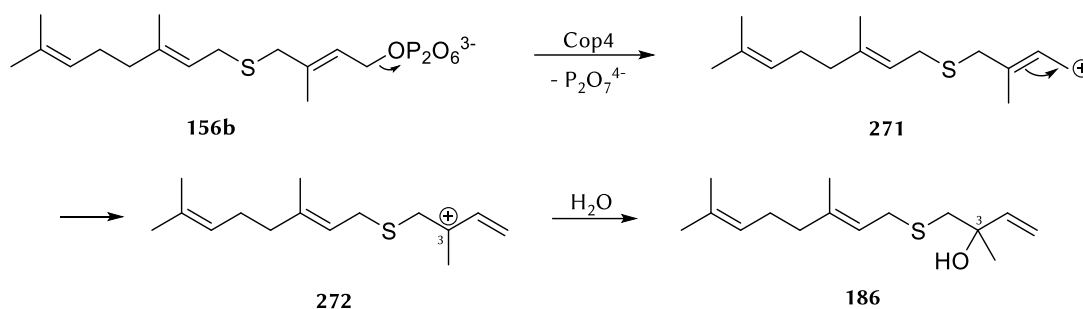
Schema 36: Biosynthese von Linalool (**268**) aus GPP (**7**).^[15]

Demnach kommt es bei den Derivaten **155a** und **156b** ebenfalls zur enzymkatalysierten Abspaltung des Pyrophosphats (Schema 37 und Schema 38). Nach der Wanderung der Doppelbindung werden die Kationen **270** bzw. **272** an C3 durch Wasser abgefangen.



Schema 37: Mechanismus der Bildung des Alkohols **160** aus Pyrophosphat **155a**.

Dass diese Reaktionen nicht spontan erfolgen, sondern eine Folge der enzymatischen Umsetzung sind, konnte durch Negativkontrollen, in denen die Reaktion ohne Zugabe des Enzyms getestet wurde, bestätigt werden (Kapitel 3.4).



Schema 38: Mechanismus zur Bildung des Alkohols 186 aus Pyrophosphat 156b.

Im Falle des Pyrophosphats 155a ist dieser Mechanismus zur Bildung von 160 bei allen STCn, die das unnatürliche Substrat akzeptieren, zu beobachten. Auch die Transformation von 156b zum azyklischen Alkohol 186 konnte bei mindestens drei STCn beobachtet werden. Dabei bilden Cop4 und GcoA den Alkohol 186 als Hauptprodukt, während das Terpenoid in der PenA-katalysierten Biotransformation nur als Nebenprodukt detektiert werden konnte.

Es scheint, dass die Zyklisierung oder Deprotonierung der Intermediate 169 und 271 unter noch unbekanntem Umständen bzw. bei bestimmten STCn beeinträchtigt ist. Möglicherweise kann das Substrat nicht in jedem Fall korrekt gefaltet und die Enzymtasche daher nicht vollständig geschlossen werden, so dass es bei einigen Enzymen zu einem verstärkten Eintritt von Wasser kommt, welches die Zyklisierung durch Addition von Wasser an das Carbokation unterbindet. Da die Ausbeuten für die Bildung der Alkohole 160 und 186 in analytischen Enzymtest meist bei lediglich 2 – 6 % liegen, ist zudem eine geringe Inhibierung der STCn durch das Substrat zu vermuten (Kapitel 3.4). Dafür spricht auch die Tatsache, dass eine Batchreaktion mit hoher Substratkonzentration zu einer verstärkten Bildung des Alkohols 186 führte, während niedrigere Substratkonzentrationen zur Bildung des Makrozyklus 185 führten.

Im Gegensatz dazu scheinen Bot2, PenA und Cop4 in der Lage zu sein, das FPP-Analogon 155a zu zyklisieren oder zumindest zu deprotonieren, da diese STCn neben dem Alkohol 160 die Sesquiterpenoide 158-159, 161, 162 und 164 als weitere Produkte bilden. Darunter könnten sich auch azyklische Deprotonierungsprodukte wie z. B. das Farnesen-Derivat 273 befinden (Abbildung 53). Da die Anzahl der möglichen azyklischen Produkte durch ihre geringe Vielfalt begrenzt ist, dürften sich unter den PenA-, Bot2- oder Cop4-Produkten noch weitere Zyklisierungsprodukte befinden. Insbesondere die Tatsache, dass sowohl Bot2, als auch PenA das Sesquiterpenoid 161 bilden, ist ein Hinweis darauf, dass es sich um das Produkt einer Zyklisierung zwischen C1 und C11, wie z. B. Makrozyklus 274, handelt könnte, da beide Enzyme diese initiale Zyklisierung mit FPP (8) katalysieren bevor sich die mechanistischen Wege trennen.

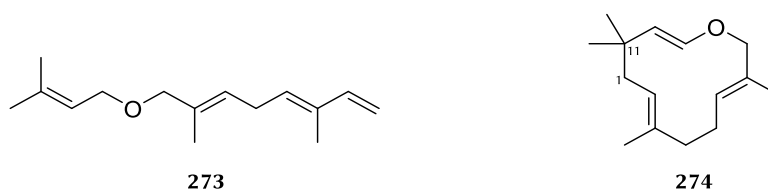
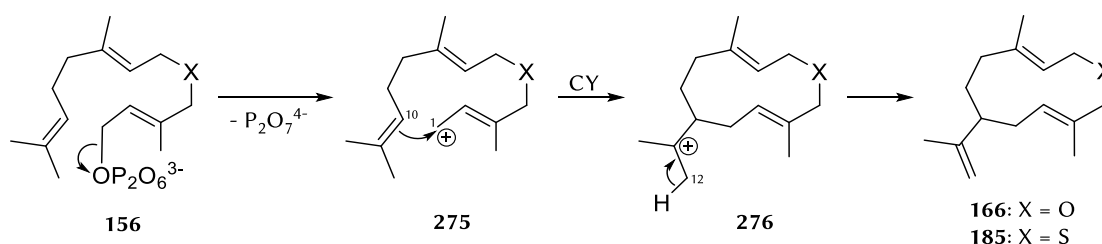


Abbildung 53: Mögliche Produkte der Biotransformationen von 155a mit PenA, Cop4 oder Bot2.

Ausgehend von dem thioetherfunktionalisierten FPP-Derivat **156b** bildeten alle sechs STCn entweder den azyklischen Alkohol **186** oder den Makrozyklus **185** als Hauptprodukt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es sich hierbei um strukturell einfache Produkte handelt, deren Derivate ebenfalls als Shuntprodukte natürlicher FPP-Zyklisierungen entstehen können.

Die makrozyklischen Produkte **166** und **185** aus dem Pyrophosphat **156a-b** entstehen nach der Abspaltung des Pyrophosphats gefolgt von einer Zyklisierung zwischen C1 und C10 (Schema 39). Anschließend kommt es zur Deprotonierung des Intermediats **276** an C12.

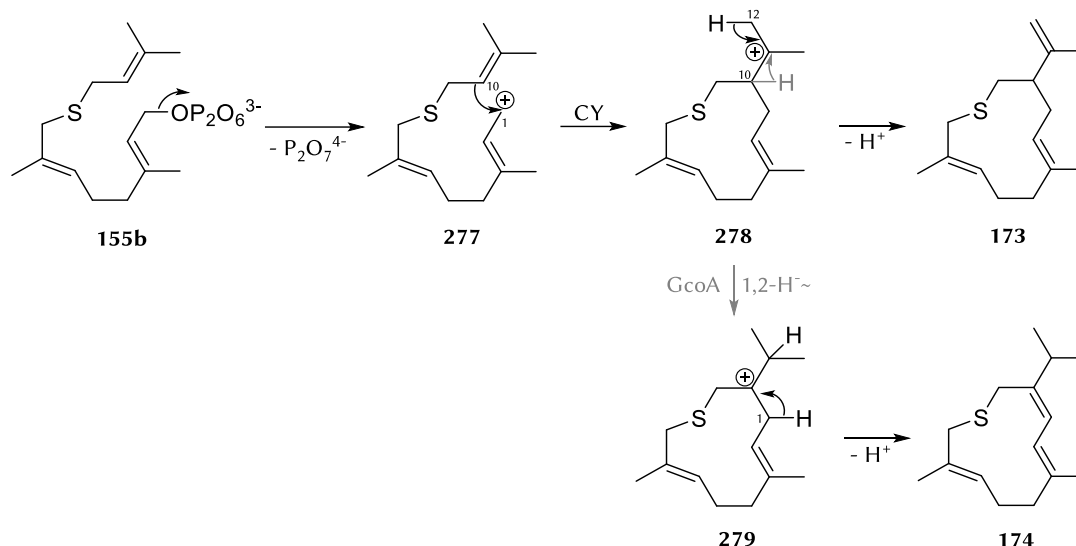


Schema 39: Zyklisierungsmechanismus zur Bildung der Makrozyklen **166** und **185** aus Pyrophosphat **156**. Abkürzung: CY = Zyklisierung.

Die beiden heteroatomfunktionalisierten FPP-Derivate **156a** und **156b** wurden durch mehrere STCn auf die gleiche Art und Weise zyklisiert. Dennoch unterscheidet sich die Produktverteilung zwischen dem thioether- und dem etherfunktionalisierten Derivat. Während beispielsweise Cop4 in der Lage ist, die Zyklisierung des Pyrophosphats **156a** zum Makrozyklus **166** zu katalysieren, überführt Cop4 den analogen Thioether **156b** in den azyklischen Alkohol **186**. Als Nebenprodukte **189** und **190** dieser Biotransformation sind allerdings weitere zyklische und möglicherweise komplexere Produkte nicht auszuschließen. Dies gilt in gleicher Weise auch für die Nebenprodukte **187**, **188** und **191** die in Biotransformationen durch PenA und Bot2 entstehen.

Auch unter den Produkten des etherfunktionalisierten Derivats **156a**, deren Struktur bisher noch unbekannt ist, dürften sich mehrere komplexe Zyklisierungsprodukte befinden. Insbesondere PenA bildet mit den Produkten **169-172** eine Vielzahl verschiedener Sesquiterpenoide, welche daher nicht ausschließlich azyklisch sein können. Gleiches zeigt sich bei Bot2, dessen Hauptprodukt **168** inzwischen durch HARMS als Trizyklus identifiziert wurde.^[94]

Ebenso wie bei den Makrozyklen **166** und **185**, kommt es bei der Bildung der Produkte **173** und **174** aus Pyrophosphat **155b** zur Zyklisierung zwischen C1 und C10 (Schema 40). Bot2, Cop4, PenA und Tps32 bilden durch Zyklisierung das Intermediat **278**, an die sich eine Deprotonierung an C12 unter Bildung des Makrozyklus **173** anschließt. Nach der Zyklisierung durch GcoA kommt es hingegen zu einem 1,2-Hydridshift und der Bildung des Intermediats **279**, gefolgt von der Deprotonierung an C1, wodurch im Endprodukt **174** eine konjugierte Doppelbindung vorzufinden ist (Schema 40, grau). Anhand des Mechanismus der (+)-Caryolan-1-ol-Bildung aus FPP kann der 1,2-Hydridshift allerdings nicht erklärt werden, da es hier keine Übereinstimmung der Mechanismen gibt. Stattdessen ist zu vermuten, dass nach der Zyklisierung keine Deprotonierung möglich ist, da für diese an der entsprechenden Stelle in der aktiven Tasche von GcoA eine Base lokalisiert sein muss. Daher erfolgt ein Hydridshift zum Intermediat **279**, welches die positive Ladung besser stabilisieren kann. Zudem scheint nun eine Base in Reichweite zu sein, welche die anschließende Deprotonierung bewirkt.



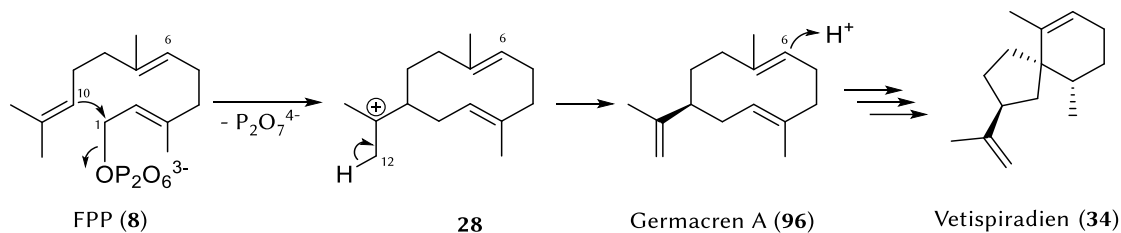
Schema 40: Zyklisierungsmechanismus zur Bildung der Makrozyklen 173 und 174 aus Pyrophosphat 155b. Abkürzungen: CY = Zyklisierung, 1,2 H \sim = 1,2-Hydridshift.

Während die ether- und thioetherfunktionalisierten FPP-Derivate von fast allen STCN akzeptiert und transformiert werden, konnte keine Substratazeptanz für die vier Analoga bei der Trichodien synthase Tri5 und der *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1 beobachtet werden. Die mangelnde Toleranz könnte auf Unterschiede in der Substratfaltung und -zyklisierung hindeuten, da Tri5 und Cyc1 eine 1,6-Zyklisierung mit FPP katalysieren.

Außerdem ist auffällig, dass die Vetispiradiensynthase Tps32 die thioetherfunktionalisierten FPP-Derivate 155b und 156b akzeptiert und transformiert, während mit der sequenzähnlichen Vetispiradiensynthase Hvs1 höchstens Spuren dieser Produkte detektiert werden konnten. Dies könnte jedoch in der deutlich geringeren Aktivität von Hvs1 begründet liegen, welche den Nachweis der Substratazeptanz aufgrund des geringen Umsatzes erschwert.

Die Tatsache, dass die Produkte der Vetispiradiensynthasen Tps32 und Hvs1 meist Makrozyklen darstellen und Nebenprodukte kaum anzutreffen sind, kann durch den Mechanismus der Vetispiradienbildung erklärt werden. Dieser beginnt ebenfalls mit der Zyklisierung zwischen C1 und C10, gefolgt von der Deprotonierung an C12 (Schema 41). Anschließend bedarf es einer Protonierung an C6, bevor es zu weiteren Zyklisierungs- und Umlagerungsschritten kommt. Im Falle der heteroatomfunktionalisierten FPP-Derivate 155a-b und 156a-b könnte die Protonierung jedoch, entweder durch eine veränderte Faltung des Substrats oder, bei Analogon 156a-b, durch die Nähe zum Schwefel- oder zum Sauerstoffatom, verhindert sein.

Bei den Terpencyclasen GcoA, PenA und Bot2 werden die Transformation des natürlichen Substrats FPP (8) hingegen mit einer 1,11-Zyklisierung eingeleitet, so dass die Bildung der Sesquiterpenoide 173, 174, 185 und 166 zunächst ungewöhnlich erscheint. Allerdings konnte bereits für viele PenA-Mutanten, wie H309A, W309F, D81E und F77Y gezeigt werden, dass 1,10-Zyklisierungen möglich sind aus denen (+)-Germacren A als Produkt resultiert.^[26] Gleiches konnte mit Bot2 unter Verwendung des methoxyfunktionalisierten FPP-Derivats (129) beobachtet werden.^[83] Im Falle der heteroatomfunktionalisierten FPP-Derivate wird vermutet, dass die Kettenverlängerung mit einem Heteroatom, ebenso wie die Mutationen, eine minimal veränderte Faltung des Substrats in der aktiven Tasche der STC bewirkt, so dass es bei allen drei STCN zur Zyklisierung zwischen C1 und C10 kommt.



Schema 41: Mechanismus der Vetispiradiensynthesen Tps32 und Hvs1.

Substratazeptanz und Transformation von FPP-Analoga mit modifiziertem Methylierungsmuster

Im Falle der unnatürlichen FPP-Analoga 203-205, welche eine starke Veränderung des Methylierungsmusters im Vergleich zu FPP (8) aufweisen, konnte festgestellt werden, dass diese nur schlecht von den STCn akzeptiert werden. Lediglich mit PenA und Bot2 konnte eine nennenswerte Produktbildung detektiert werden. Die Umsätze für diese Biotransformationen sind im Vergleich zur Transformation von FPP und den ether- und thioetherfunktionalisierten Analoga meist sehr gering (Abbildung 54). Dementsprechend scheint eine Kettenverlängerung durch Heteroatome einen geringeren Einfluss auf die Substratazeptanz zu haben, als die Veränderung des Methylierungsmusters.

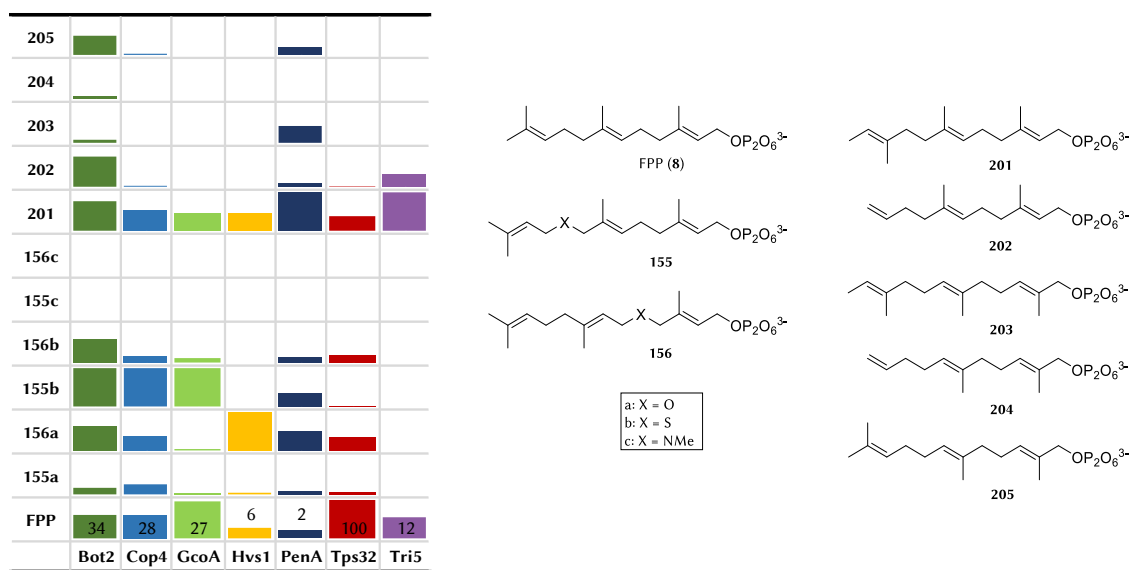


Abbildung 54: Graphische Darstellung der Akzeptanz der heteroatomfunktionalisierten und methylierungsmodifizierten FPP-Analoga durch die sieben STCn anhand des Gesamtumsatzes in Relation zum natürlichen Substrat FPP (8). Die Umsätze für die unterschiedlichen STCn stehen nicht in Relation zueinander. Die Umsätze der Biotransformationen von FPP sind in Prozent [%] angegeben.

Von den Biotransformationen der drei FPP-Analoga 203-205 erfolgte allein die Bot2-katalysierte Biotransformation von Pyrophosphat 205 in gutem Umsatz. Bei PenA ist die niedrige Ausbeute der Biotransformationen der Derivate 203-205 in Teilen auf eine geringe Aktivität von PenA zurückzuführen. Dementsprechend zeigt sich der geringe Umsatz ebenfalls mit dem natürlichen Substrat FPP (8). Hauptursächlich für die mangelnde Akzeptanz und den schlechten Umsatz der Pyrophosphate 203-205 dürfte die geringe strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat FPP sein, so dass die Analoga nur selten als Substrat erkannt werden. Dies zeigt sich insbesondere an FPP-Derivat 204, welches an zwei Doppelbindungen verschobene und an der terminalen Doppelbindung keine Methylgruppen besitzt. Die Transformation des Analogons 204 wurde daher lediglich in

geringem Maße durch Bot2 beobachtet. Generell weist Bot2 eine äußerst hohe Substrattoleranz auf, da es die meisten unnatürlichen FPP-Derivate in guten Umsätzen transformiert. Eine Ausnahme bildeten dabei die Derivate **203**, **204** und **155a**, wobei letzteres allerdings in Teilen auf eine Zersetzung des Substrats zurückzuführen ist.

Obwohl PenA und Bot2 aus dem Analogon **203** unterschiedliche Hauptprodukte bildeten, konnte das PenA-Hauptprodukt **234** auch als Nebenprodukt von Bot2 detektiert werden. Insgesamt wiesen beide STCn eine ungewöhnlich große Zahl von Nebenprodukten auf, während sie bei der Transformation von FPP nur die zielgerichtete Bildung von Pentalenen (**33**) bzw. Presilphiperfolan-8- β -ol (**61**) katalysieren. Aufgrund der Entstehung vieler unterschiedlicher Produkte kann angenommen werden, dass sich darunter auch einige komplexere Zyklisierungsprodukte befinden. Zudem bildete PenA zwei Nebenprodukte die eine Alkoholfunktion tragen, obwohl die Anwesenheit von Wasser in der aktiven Tasche von PenA anhand von Kristallstrukturen ausgeschlossen wurde.^[26] Im Gegensatz dazu bildete Bot2 kein einziges Produkt aus Derivat **203** mit $m/z = 222$, obwohl Presilphiperfolan-8- β -ol eine Alkoholfunktion besitzt. Bereits anhand der Biotransformationen der ether- und thioetherfunktionalisierten FPP-Analoga zeigte sich, dass Cop4, GcoA und Bot2 nicht unbedingt hydroxylierte Produkte hervorbringen. Stattdessen entstanden auch durch andere STCn Produkte mit Alkoholfunktion, so dass die genauen Mechanismen der Addition von Wasser an das carbokationische Intermediat zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig zu erklären sind.

Testreaktionen mit Analogon **202** zeigten, dass neben der Substrattoleranz seitens PenA und Bot2, auch Tri5 mehrere Produkte lieferte. Die Substratakzeptanz lässt sich durch die initiale 1,6-Zyklisierung von Tri5 erklären, welche die endständige Doppelbindung, die bei Derivat **202** strukturelle Abweichungen zu FPP aufweist, nicht in die ersten Schritte des Mechanismus involviert. Das Hauptprodukt **244** der PenA-, Cop4-, und Tps32-katalysierten Biotransformationen von **202** findet sich zudem als Nebenprodukt von Bot2 und Tri5. Da diese STCn bisher nicht für einen ähnlichen Mechanismus bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Produkt **244** um eine strukturell einfache Verbindung, wie z. B. um ein Farnesen-Derivat handelt.

Im Gegensatz zu Bot2 und PenA akzeptieren Cop4, GcoA, Tps32 und Hvs1 vorrangig die ether- und thioetherfunktionalisierten FPP-Derivate **155a-b** und **156a-b**. Eine Ausnahme bildet das methylierungsmodifizierte Analogon **201**. Dieses zeigte vermutlich durch die große Ähnlichkeit zu FPP eine besonders hohe Akzeptanz und dementsprechend gute Umsätze, wohingegen die Toleranz des Pyrophosphats **202**, dessen Methylgruppen an der endständigen Doppelbindung im Vergleich zu FPP und Derivat **201** fehlen, drastisch reduziert ist. Daher kann angenommen werden, dass zumindest eine dieser Methylgruppen wichtig für die Substratakzeptanz ist.

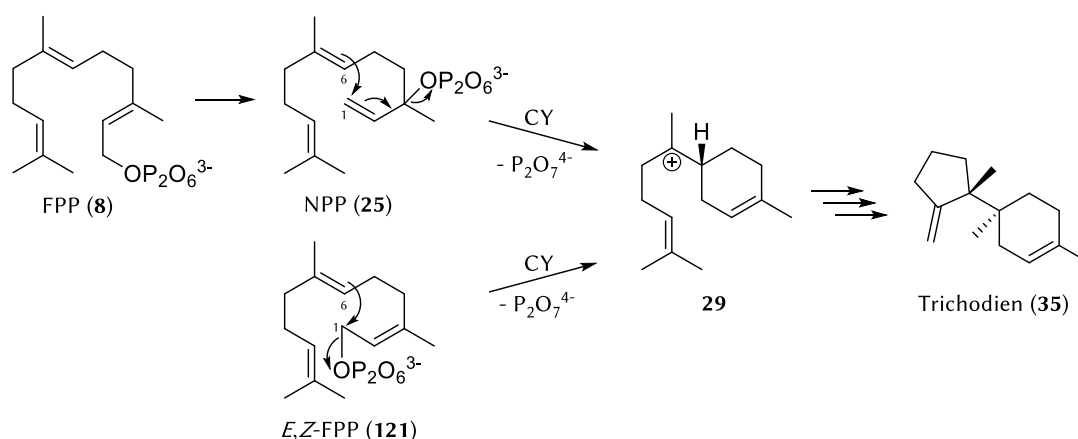
Im Vergleich zu den zuvor getesteten heteroatomfunktionalisierten FPP-Derivaten **155a-b** und **156a-b**, bei denen verschiedene STCn das gleiche Hauptprodukt lieferten, wurden bei den Biotransformationen von Pyrophosphat **201** im analytischen Maßstab fünf verschiedene Hauptprodukte gefunden. Eine genaue Betrachtung der Hauptprodukte, die von mehreren STCn gebildet werden, legt jedoch nahe, dass viele Biotransformationen des Pyrophosphats **201** mit der Zyklisierung des natürlichen Substrats FPP (**8**) in Zusammenhang stehen. Das in Kapitel 3.6.3 beschriebene Produkt **211** wird von Tps32 und Hvs1 als Haupt- und von Cop4 als Nebenprodukt gebildet, wobei alle drei STCn mit FPP eine initiale 1,10-Zyklisierung katalysieren. Ebenso bilden PenA und Bot2, welche die Transformation von FPP mit einer 1,11-Zyklisierung einleiten, das identische Hauptprodukt **206**. Das Hauptprodukt **215** sowie Nebenprodukte der Biotransformation durch GcoA konnten allerdings, trotz initialer 1,11-Zyklisierung von FPP, in keiner der untersuchten Biotransformationen mit anderen STCn detektiert werden.

Unter der Annahme, dass die vorgeschlagene Struktur eines 11-gliedrigen Makrozyklus für das Tps32-Produkt **211** korrekt ist, lassen sich folgende Theorien zur Bildung des PenA- und des Bot2-Produkts **206** aufstellen: Sollte es sich bei dem Sesquiterpen **206** ebenfalls um eine strukturell einfache Verbindung, wie einen Makrozyklus handeln, was aufgrund der Tatsache, dass dieser durch zwei verschiedene STCN gebildet wird, anzunehmen ist, könnte dieser durch eine 1,10- statt einer 1,11-Zyklisierung mit anschließender Deprotonierung gebildet worden sein. In dem Fall, könnte die an C10 statt C11 befindliche Methylgruppe bewirkt haben, dass die Zyklisierung zwischen C1 und C10 statt zwischen C1 und C11 erfolgt. Dies würde interessante Fragestellungen über den Einfluss der Methylgruppe auf die initiale Zyklisierung aufwerfen. Alternativ könnte das Pyrophosphat **201** ebenfalls durch PenA und Bot2 mittels 1,11-Zyklisierung transformiert worden sein, wobei im Anschluss weitere Zyklisierungs- oder Umlagerungsschritte stattgefunden haben müssen, um zur Entstehung eines anderen Produkts als dem Sesquiterpen **211** zu gelangen.

Im Falle des durch die von Tri5- und Cop4-katalysierten Biotransformationen von Analogon **201** gebildeten Produkts **208** liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein azyklisches Produkt handelt, da Cop4 bereits mit den Derivaten **155a** und **156b** Schwierigkeiten bei der Zyklisierung offenbarte. Die Entstehung eines offenkettigen Produkts ist zudem naheliegend, da Cop4 mit FPP eine initiale 1,10-Zyklisierung vollzieht, während Tri5 eine 1,6-Zyklisierung katalysiert. In Studien mit *E,Z*-FPP konnte jedoch bei Cop4 festgestellt werden, dass die STCN die Substrate in zwei verschiedenen Orientierungen binden und daher an *E,Z*-FPP eine 1,6-Zyklisierung durchführen kann.^[20] Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei Sesquiterpen **208** um ein Produkt einer 1,6-Zyklisierung handelt.

Biotransformation und Substratazeptanz von *E,Z*-FPP

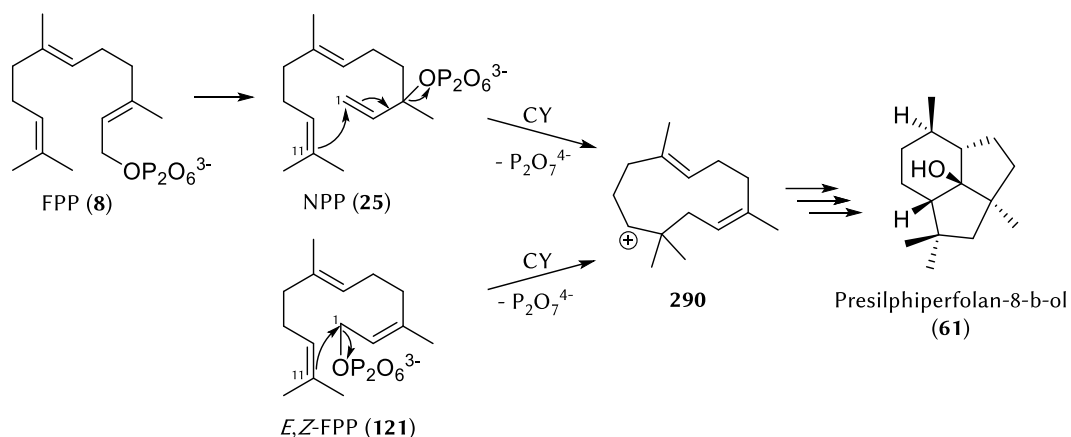
Das Doppelbindungsisomer *E,Z*-FPP (**121**) konnte in Enzymtests durch Bot2, Cop4, Hvs1, Tps32 und Tri5 umgesetzt werden. Bot2 und Tri5 transformierten *E,Z*-FPP zu den FPP-Produkten Presilphiperfolan-8- β -ol (**61**) und Trichodien (**35**). Die Bildung von Trichodien durch 1,6-Zyklisierung von NPP (**25**) zum Bisabolykation (**29**) ist in ähnlicher Weise ausgehend von *E,Z*-FPP denkbar (Schema 42).



Schema 42: Zyklisierungsmechanismus der Trichodien synthase Tri5 ausgehend von FPP (**8**) und dessen *E,Z*-Isomer **121**.

Im Falle von Bot2 schloss CANE durch Einsatz von NPP aus, dass die Zyklisierung über das cisoide Farnesylykation erfolgt. Im Gegensatz dazu argumentierte TANTILLO, dass die Zyklisierung über NPP

günstiger ist (Schema 43). Letzteres würde zudem eine Erklärung für die Transformation von *E,Z*-FPP in das Presilphiperfolan-8- β -ol liefern.



Schema 43: Vorschlag für die initiale Zyklisierung von FPP (8) durch die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2 von TANTILLO und analoge Zyklisierung des *E,Z*-Isomers 121.

In vorhergegangenen Untersuchungen zur Substratazeptanz von Tps32 wurde bereits gezeigt, dass auch das *Z,Z*-FPP als Substrat akzeptiert wird^[27]. Die Vetispiradiensynthasen Hvs1 und Tps32 transformierte *E,Z*-FPP in ein einziges Produkt (262), bei dem es sich jedoch nicht um Vetispiradien (34) handelt.

Obwohl die Transformation durch Cop4 bereits in der Literatur beschrieben wurde,^[20] konnte ein neues Hauptprodukt (261) detektiert werden, dessen Identität noch unbekannt ist. Da weder Überschneidungen in der Produktbildung mit weiteren STCn noch andere Hinweise auf die Zyklisierungsreaktionen erhalten werden konnte, können derzeit noch keine Strukturvorschläge für die Produkte 261 und 262 gemacht werden.

3.8 Einfluss von Aminosäuren auf das Produktspektrum und die Substratazeptanz

Da alle Sesquiterpencyclasen (STCn) das gleiche natürliche Substrat verwenden, jedoch höchst unterschiedliche Produkte hervorbringen, müssen die Konformation und die funktionelle Ausstattung der Enzymtasche eine entscheidende Rolle bei der Produktbildung und der Substratazeptanz spielen. Mit Hilfe von Mutagenese-Studien kann die Bedeutung einzelner Aminosäuren untersucht werden, indem diese gegen eine Aminosäure mit anderer Größe oder Funktion der Seitenkette ausgetauscht wird. Diese Methode wurde unter anderem zur Ermittlung aktiver Basen in der Enzymtasche der Pentalenensynthese PenA eingesetzt.^[16,26] Weitere Studien, in denen mittels zielgerichteter Mutagenese einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden, erfolgten mit der Trichodiensynthese Tri5^[31,35,38-40] und der *Epi*-Isozoizainsynthese Cyc1^[24,61], während chimäre Enzyme der Cubebolsynthese Cop4^[23] und der Vetispiradiensynthese Hvs1^[22] erstellt wurden, um den Einfluss größerer Domänen zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst eine Analyse des aktiven Zentrums der acht STCn, um katalytisch relevante Aminosäuren zu identifizieren, da diese im Gegensatz zu anderen Studien, welche die Inaktivierung des Enzyms anstrebten, nicht verändert werden sollten. Stattdessen stand die Veränderung des Produktspektrums und der Substratazeptanz im Fokus. Dafür wurden mit PenA und Tri5 zwei STCn gewählt, welche schon umfassend erforscht wurden. Ein erstrebenswertes Ziel der Mutagenese wäre z. B. die Steigerung der Substrattoleranz von Tri5 in Hinblick auf heteroatomfunktionalisierte FPP-Derivate. Des Weiteren erfolgten erste Mutagenese-Studien mit Cop4, welches für seine hohe Produktpromiskuität bekannt ist. Diese Varianz birgt zwar großes Potential zur Identifizierung interessanter Terpenoide, kann aber für die biokatalytische Herstellung von Terpenoiden auch von Nachteil sein.

3.8.1 Bioinformatische Analyse der Sesquiterpencyclasen

Struktur des aktiven Zentrums

Die strukturelle Homologie der STCn, deren α -Domäne ein α -helikales Bündel bildet, zeigt sich anhand von Kristallstrukturen und Homologiemodellen. Letztere wurden mittels *Homology Modelling* durch Phyre2^[95] erstellt. Eine Strukturüberlagerung zeigt zudem, dass die hohe strukturelle Ähnlichkeit der STCn auch im aktiven Zentrum Bestand hat (Abbildung 55).

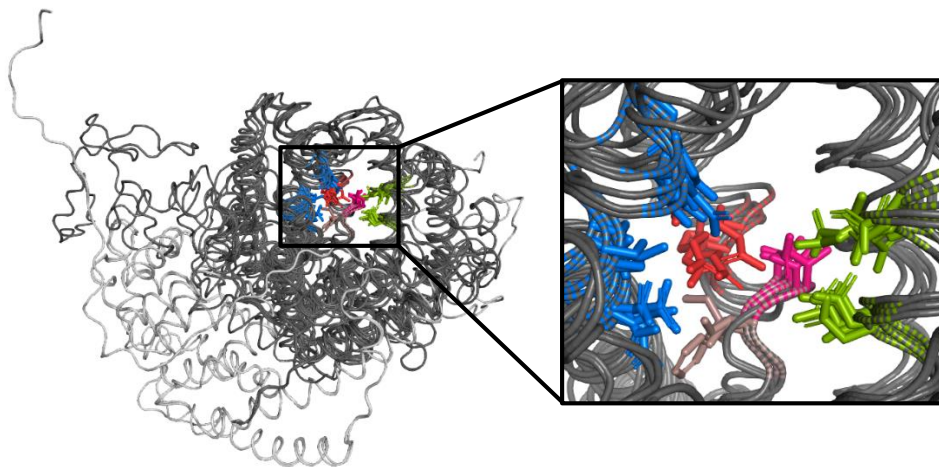


Abbildung 55: Strukturüberlagerung der Kristallstrukturen und Homologiemodelle von Bot2, Cop4, Cyc1, GcoA, Hvs1, PenA und Tps32. Markiert sind die β -Domänen der pflanzlichen STCn (hellgrau), die Effektortriade (rot/rosa) der fungalen und bakteriellen STCn, das DDXXD-Motiv (grün) und das NSE/DTE-Motiv (blau).

Die dreidimensionale Struktur der aktiven Tasche bestimmt unter anderem, wie tolerant und promisk eine STC ist. Die Konformation eines Proteins, welches die korrekte Regio- und Stereochemie eines Substrats erzwingt und wenig Raum für Flexibilität zulässt, führt zur zielgerichteten Bildung eines einzigen Produktes, wie es bei Tps32, PenA und Bot2 der Fall ist. Tolerantere Enzyme, wie Cop4 und Cyc1, erlauben hingegen variable Faltungen der Intermediate und eine vorzeitige Beendigung der Zyklisierungskaskade, wodurch Neben- und Abbruchprodukte generiert werden. Die Veränderung der Proteinkonformation durch punktuelle Mutationen kann dazu führen, dass alternative Faltungen möglich oder sogar bevorzugt werden.^[24]

Essentiell für die Funktionsweise von STCn ist das Asparaginsäure-reiche Motiv DDXXD und die NSE-Triade, welche die Komplexierung der Magnesiumionen und die Ausrichtung des Substrats anhand des Pyrophosphats bewerkstelligen, sowie die Effektortriade, die die Substratbindung erkennt und die Reaktionskaskade durch Abspaltung des Pyrophosphats initiiert.^[11,14] Um die Wahl der Mutationen durch ein besseres Verständnis für die relevanten Aminosäuren im aktiven Zentrum der acht STCn zu einzuschränken, wurden die Metallbindedomänen sowie der Effektor, der Linker und der Pyrophosphatsensor der Effektortriade mit Hilfe der Kristallstrukturen und Homologiemodelle identifiziert (Tabelle 15) und ggf. mit bestehenden Literaturangaben verifiziert.

Die Effektortriaden von Hvs1 und Tps32 konnten hingegen nicht durch Homologievergleiche ermittelt werden, da bisher keine Informationen zur genauen Lokalisierung und Funktionsweise der Effektortriade bei pflanzlichen STCn vorliegen.

Tabelle 15: Aminosäuren der Metallbindedomänen und der Effektortriade im aktiven Zentrum der STCn. Vollständige Sequenzen der STCn finden sich in Tabelle 46 (Kapitel 7.1).

Enzym	DDXXD-Motiv	NSE/DTE-Motiv	Pyrophosphat-Sensor	Linker	Effektor
Bot2	D141DQFD	N285, S289, D293	R239	T242	I243
Cop4	D87EISDD	N222, S226, E230	R176	N179	S180
Cyc1	D99DRHD	N240, S244, E248	R194	T197	F198
GcoA	D83DEFD	N220, S224, E228	R174	S177	V178
Hvs1	D308DTFD	D451, T455, E459			
PenA	D80DLFD	N219, S223, E227	R173	T176	I177
Tps32	D301DTFD	D444, T448, E452			
Tri5	D100DSKD	N225, S229, E233	R182	N185	G186

Beim Vergleich der Homologiemodelle zeigte sich, dass D91 des DDXXD-Motivs von Cop4 nicht deckungsgleich mit den Asparaginsäureresten anderer STCn ist. Stattdessen wird vermutet, dass D92 für die Mg-Komplexierung verantwortlich ist, da dieses mit den entsprechenden Asparaginsäureresten konvergiert.

Außerdem finden sich in der aktiven Tasche zahlreiche aromatische und aliphatische Aminosäuren. Besonders aromatische Aminosäuren haben einen großen Einfluss auf die Produktbildung da sie entscheidend für die Stabilisierung und Konformation der carbokationischen Intermediate sind. Dafür stabilisieren sie nicht nur die carbokationischen Intermediate durch Kation- π -Interaktionen, sondern stellen auch eine sterische Masse (*bulk*) mit einer hydrophoben Oberfläche dar, welche einen großen Einfluss auf die Form der aktiven Tasche und die Faltung von Substrat und Intermediaten hat.^[61]

Dementsprechend wurden verschiedene aromatische Aminosäuren in PenA, Cop4 und Tri5 modifiziert, um das resultierende Produktspektrum zu untersuchen. Auf die Mutation der

Mg-Bindedomänen sowie der Effektortriade wurde, bis auf eine Ausnahme, bewusst verzichtet, um die Aktivität der STCN nicht zu mindern.^[96]

Beschreibung ausgewählter Mutanten

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Mutanten von Cop4 sowie weitere, teilweise schon literaturbekannte Mutanten von PenA und Tri5 erzeugt. Ihre katalytische Aktivität wurde *in vitro* unter Verwendung von FPP (8) und des etherfunktionalisierten Derivats 155a untersucht.

In früheren Studien wurde bereits der Einfluss von F77 auf die Produktbildung und die Aktivität von PenA erkannt. Daher sollte die Bedeutung von F77 auf die Akzeptanz von Pyrophosphat 155a und die Entstehung der daraus resultierenden Terpenoide näher untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von Y50 geprüft werden. Die Aminosäuren an diesen Positionen wurden dabei lediglich gegen andere aromatische Aminosäuren substituiert, um zunächst die Aktivität nur in geringem Maße zu beeinflussen.

Ebenso wurde mit Y93 bei Tri5 vorgegangen, während F84 bei Cop4 direkt gegen den deutlich kleineren Aminosäurerest Valin ersetzt wurde, welcher daher keine Kation- π -Interaktionen zur Stabilisierung der carbokationischen Intermediate ausüben kann. Des Weiteren erfolgte bei Cop4 die Substitution von V80 gegen Leucin.

Außerdem wurde die Tri5-Mutante D100E erstellt. Diese zeigte bereits in früheren Studien, dass das Enzym trotz Änderung des Asparaginsäure-reichen Motivs, wenn auch mit 22-fachen Aktivitätsverlust, noch aktiv und seine Promiskuität erhöht ist.^[35] Anhand von Kristallstrukturen zeigte sich bei D100E Tri5 eine Vergrößerung der Enzymtasche (Abbildung 56), welche mit der vermehrten Bildung von Nebenprodukten korreliert. Die Vergrößerung resultiert aus einer Verminderung der Konformationsänderung durch die Pyrophosphatbindung im Vergleich zum Wildtyp. Da sich die Enzymtasche nicht vollständig schließt, kommt es zu einem räumlichen Zugewinn von ca. 15 %. Während der Wildtyp als Enzym-Substrat-Komplex eine hohe Packdichte von 75 % aufweist, sinkt diese bei D100E Tri5 auf 67 %, wodurch dem Substrat und den carbokationischen Intermediaten mehr Flexibilität in Hinblick auf mögliche Rotationen oder Alkylshifts ermöglicht wird.^[25,31,39,40]

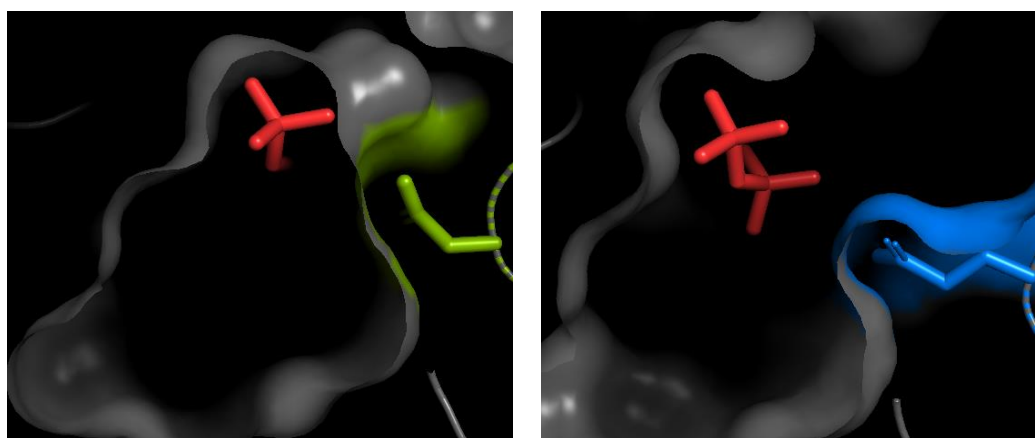


Abbildung 56: Vergleich zwischen Tri5-Wildtyp^[13] (links, 1JGF) und Tri5-Mutante D100E^[25] (rechts, 1KIZ). Durch Austausch von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure bietet die aktive Tasche den Substraten mehr Platz. Die Position des Pyrophosphats (rot) ist zudem leicht verändert.

3.8.2 Erstellung von Mutanten

Die Erstellung der Mutanten erfolgte mit Hilfe der DpnI-Mutagenese. Dabei wird das gesamte Plasmid, in diesem Fall die pET28a(+)-Konstrukte der STCn-Gene *penA*, *tri5* und *cop4*, mittels Gradienten-PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer tragen beide die einzuführende Mutation und sind daher teilweise komplementär zueinander. Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Abbildung 57), welche bestätigte, dass für jedes Primerpaar mindestens eine passende Annealingtemperatur gefunden werden konnte.

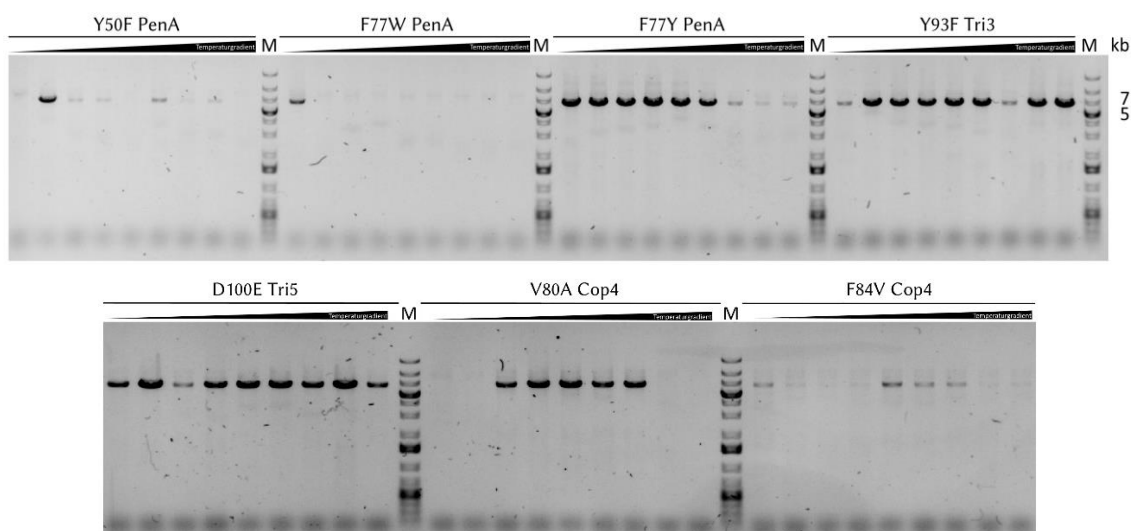


Abbildung 57: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate aus der DpnI-Mutagenese. Zur Kontrolle der PCR bei verschiedenen Annealingtemperaturen wurden Proben der Ansätze zu jeder Annealingtemperatur mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Der Temperaturgradient (schwarzer Balken) nimmt von links (59,0 °C) nach rechts (71,9 °C) zu. Außerdem wurde ein Marker [M] als Größenstandard verwendet. Relevante Markerbanden sind oben rechts in kb angegeben.

Es folgten der Verdau der Template mit dem Restriktionsenzym DpnI, welches nur methylierte und somit aus *E. coli* isolierte DNA am GATC-Motiv schneidet, sowie die Transformation von *E. coli* TOP10. Die korrekte Mutation wurde nach Plasmidisolierung mittels Sequenzierung verifiziert. Anschließend erfolgten die Transformation von *E. coli* BL21 (DE3), die Genexpression und die Proteinreinigung analog zu den Wildtyp-Proteinen (Kapitel 3.1). Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat anschließend mittels IMAC über eine mit Nickelionen beladenen Nitrilotriessigsäure-Agarosematrix (Ni-NTA) gereinigt. Die Elution erfolgte entweder mit 100 mM oder 250 mM Imidazol. Eine Übersicht der SDS-Gele der gereinigten Proteine ist in Abbildung 58 zusammengestellt.

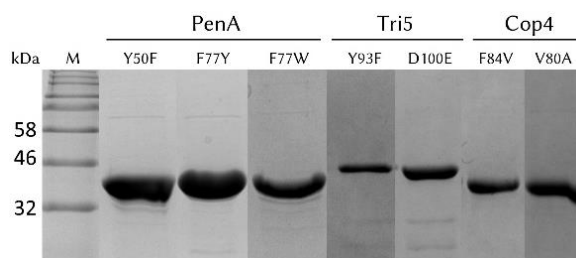


Abbildung 58: Zusammenfassende Übersicht gereinigter Mutanten im SDS-Gel. Aufgetragen wurden Marker [M] und Elutionsfraktionen der IMAC mit 100 mM oder 250 mM Imidazol der PenA-Mutanten Y50F, F77Y und F77W, der Tri5-Mutanten Y93F und D100E sowie der Cop4-Mutanten F84V und V80A. Zur Orientierung sind die Größen der Markerbanden in kDa angegeben.

3.8.3 Analytische Enzymtests

Wie auch bei den Wildtyp-STCn, wurde zunächst die Aktivität der mutierten STCn durch *in vitro* Enzymtests mit dem natürlichen Substrat FPP (8) überprüft (Kapitel 3.2.1). Die Bewertung der Aktivität erfolgte in diesem initialen Test durch Vergleich der FID-Peakflächen der Produkte in Relation zum Wildtyp. Zudem konnten die Auswirkungen der Mutation auf das natürliche Produktspektrum betrachtet werden. Analog dazu folgte die Untersuchung der Substratakzeptanz und der Produktbildung unter Verwendung des etherfunktionalisierten FPP-Derivats 155a.

Im Chromatogramm der Biotransformation von FPP durch Y93F Tri5 zeigt sich ein signifikanter Aktivitätsverlust gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 59). Dennoch kann Trichodien (35) als Hauptprodukt, durch Vergleich der Fragmentierungsmuster, identifiziert werden (Tabelle 16). Zudem sind geringe Mengen weiterer Sesquiterpene zu erkennen. Eine Unterscheidung zwischen Produkt oder Verunreinigung ist aufgrund der geringen Produktmenge jedoch nicht möglich. Daher konnte auch kein Anteil des Hauptprodukts am Produktspektrum angegeben werden.

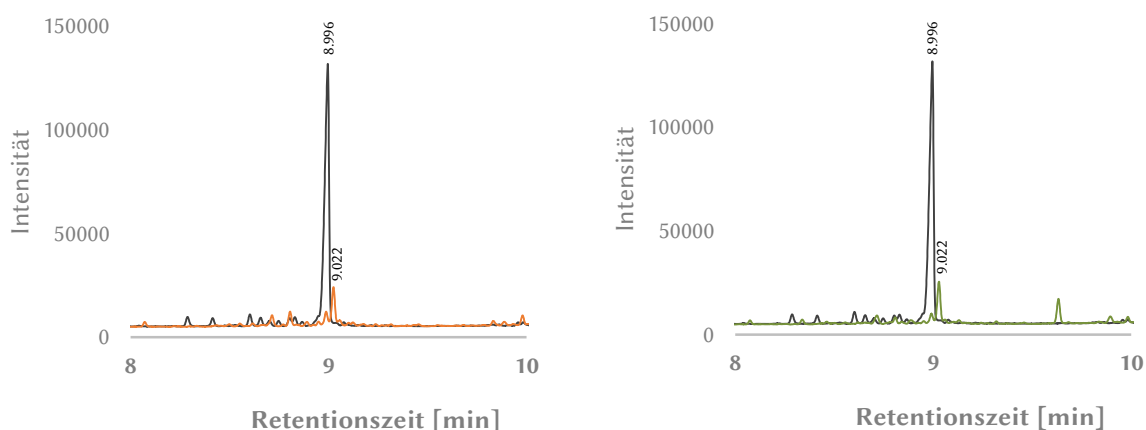


Abbildung 59: Chromatogramme der Biotransformation von FPP (8) durch die Mutanten Y93F (orange) und D100E (grün) Tri5. Als Vergleich ist das Chromatogramm der Biotransformation durch den Wildtyp (schwarz) gezeigt.

Die Untersuchung von D100E Tri5 zeigte im Enzymtest mit FPP ähnliche Aktivität wie Y93F. Allerdings lassen sich neben Trichodien als Hauptprodukt mehrere Nebenprodukte mit $m/z = 204$ und $m/z = 222$ erkennen. Dabei ist der Anteil an Trichodien im Vergleich zur Biotransformation durch den Wildtyp deutlich gesunken. Bei den übrigen Sesquiterpenen dürfte es sich um β -Farnesen (40), α -Acoradien (43), β -Acoradien (42), α -Bisabolen (45), β -Bisabolen (44), α -Barbaten (49), Cuprenen (54) und Isochamigren (55) handeln, welche sich auch in Spuren als Nebenprodukte des Wildtyps zeigen.^[31] Ein Vergleich der Anteile der Nebenprodukte zwischen D100E und Wildtyp erfolgte jedoch nicht, da die geringen Mengen aufgrund von Signalüberlagerungen nicht eindeutig zu bestimmen waren. Über die Identität der Sesquiterpenalkohole, die als Nebenprodukte durch D100E gebildet wurden, gibt es derzeit keine Hinweise.

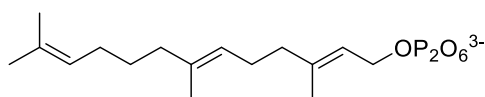
Eine Umsetzung des etherfunktionalisierten FPP-Derivats 155a durch den Wildtyp konnte bereits in früheren Versuchen nicht nachgewiesen werden (Kapitel 3.4). Die Mutation des aktiven Zentrums führte ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der Substratakzeptanz, so dass angenommen werden kann, dass die fehlende Substratakzeptanz bei Tri5 nicht auf einer zu kleinen Enzymtasche beruht, da D100E mit einer um 15% vergrößerten Tasche das Pyrophosphat 155a ebenfalls nicht als Substrat toleriert.

Diese Vermutung wird durch Studien mit Homo-FPP (**108**) unterstützt, welches ebenfalls eine Kettenverlängerung zeigt, jedoch durch Tri5 akzeptiert wird (Abbildung 60).^[81]

Tabelle 16: Hauptprodukte und ausgewählte Nebenprodukte aus der Biotransformation von FPP (**8**) durch Tri5 und Tri5-Mutanten. Zudem wurden der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

Tri5-Mutante	Produkte aus FPP			
		Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z
Y93F	35	9.022	100 ¹⁰	204
	291	8.716	14	204
D100E	292	8.887	6	204
	293	8.991	13	204
	35	9.022	55	204
Wt	35	8.996	85	204

Demnach wäre es wahrscheinlicher, dass die Faltung des Substrats durch Heteroatome so verändert wird, dass die 1,6-Zyklisierung eingeschränkt wird. Da sowohl D100E als auch Y93F noch ausreichend Aktivität zeigen, um FPP zu transformieren, könnte die Substratazeptanz der Mutanten in Zukunft mit weiteren unnatürlichen FPP-Analoga getestet werden.



108

Abbildung 60: Homo-FPP (**108**) konnte in vorangegangenen Studien durch Tri5 transformiert werden.

Bei der Biotransformation von FPP durch F77Y PenA zeigte die Mutante gegenüber dem Wildtyp noch moderate Aktivität (Abbildung 61). Diese äußerte sich neben der Bildung von Pentalenen (**33**) in der Bildung eines neuen Hauptproduktes (**295**) bei $t_R = 9.063$. Zudem konnten geringe Mengen weiterer Nebenprodukte detektiert werden (Tabelle 17). Die Ergebnisse zur Aktivität von F77Y sind konform mit vorherigen Studien.^[26] Allerdings wurde dort Pentalenen als Hauptprodukt beschrieben, so dass derzeit keine Rückschlüsse auf die Identität des Alkohols **295** gezogen werden können.

¹⁰ Nebenprodukte konnten aufgrund des geringen Umsatzes nicht eindeutig bestimmt werden.

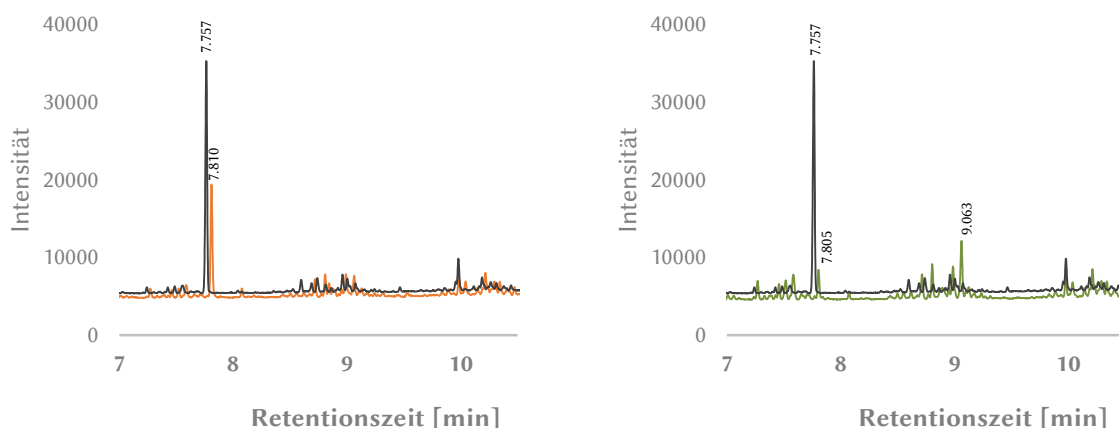


Abbildung 61: Chromatogramme der Biotransformation von FPP (8) durch die Mutanten Y50F (gelb) und F77Y (grün) PenA. Als Vergleich ist das Chromatogramm der Biotransformation durch den Wildtyp (schwarz) gezeigt.

Die Aktivität von F77W PenA bei der Biotransformation von FPP ist hingegen kaum nachweisbar. Wie bereits in vorherigen Studien mit F77A PenA festgestellt wurde, ist der Aromat an dieser Position essentiell.^[26] Während jedoch Tyrosin noch eine hohe Ähnlichkeit zu Phenylalanin aufweist, führt die Substitution durch Tryptophan bereits zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust. Obwohl alle drei Aromaten in der Lage sein sollten carbokationische Intermediate durch Kation- π -Interaktionen zu stabilisieren, könnte neben der präzisen Ausrichtung des Aromaten auch das exakte Volumen der sterischen Masse für die Aktivität entscheidend sein.

Tabelle 17: Hauptprodukte und ausgewählte Nebenprodukte aus der Biotransformation von FPP (8) und Pyrophosphat 155a durch PenA und PenA-Mutanten. Zudem wurde der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

PenA-Mutante	Produkte aus FPP			
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
Y50F	33	7.810	66	204
	294	8.844	7	222
	295	9.065	12	222
	296	10.044	8	222
F77Y	33	7.805	26	204
	297	8.874	9	222
	295	9.063	59	222
Wt	33	7.757	75	204
	296	9.981	19	222
PenA-Mutante	Produkte aus 155a			
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
Y50F	158	9.384	36	220
	160	9.522	17	238
	161	10.652	47	220
Wt	158	9.307	45	220
	160	9.444	18	238
	164	9.882	6	220
	161	10.583	59	220

Die Mutante Y50F PenA zeigte mit FPP moderate Aktivität bei der Produktion von Pentalenen (33). Zudem wurden, im Gegensatz zum Enzymtest mit dem PenA-Wildtyp, vermehrt Spuren von

Nebenprodukten mit $m/z = 222$ und $m/z = 204$ detektiert. Anhand des Fragmentierungsmusters und der Retentionszeit wird angenommen, dass der Alkohol 295 dem Hauptprodukt der Biotransformation von FPP durch F77Y PenA entspricht, während der Alkohol 296 auch als Produkt des Wildtyps beobachtet wurde.

Die PenA-Mutante Y50F setzt das Pyrophosphat 155a mit moderater Aktivität zu drei Produkten (158, 160, 161) um (Abbildung 62). Diese konnten bereits bei der Biotransformation durch den PenA-Wildtyp detektiert werden. Weitere Enzymtests mit dem FPP-Derivat 155a zeigten hingegen keine Substrattoleranz durch F77Y und F77W PenA. Entweder scheint F77 entscheidend für die Akzeptanz des Analogons zu sein oder die Erhöhung der sterischen Masse könnte dazu geführt haben, dass das

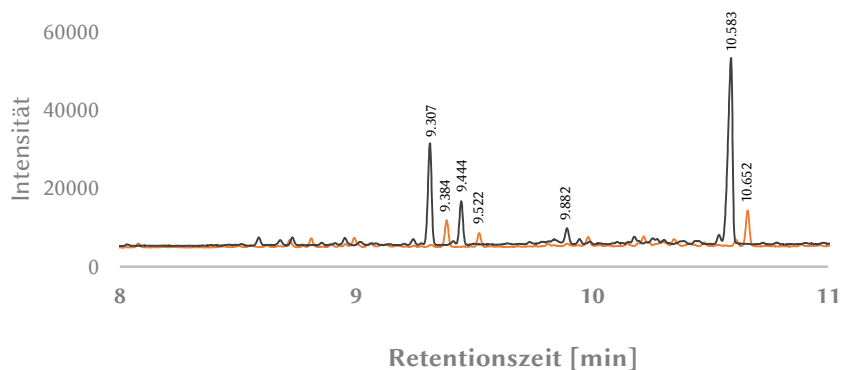


Abbildung 62: Chromatogramm der Biotransformation von 155a durch die Mutante Y50F PenA (gelb). Als Vergleich ist das Chromatogramm der Biotransformation durch den Wildtyp (schwarz) gezeigt. Durch Säulenalterung zeigt sich eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten.

Derivat 155a nicht mehr toleriert wird. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass das Analogon 155a zwar akzeptiert wird, jedoch aufgrund der schlechten Aktivität kein Produkt detektiert werden kann. Abschließend wurden die Cop4-Mutanten V80A und F84V untersucht. Diese zeigten bereits bei der Biotransformation von FPP eine sehr gute Aktivität (Abbildung 63). Wie beim Wildtyp wurde FPP zu Cubebol (37) als Hauptprodukt umgesetzt (Tabelle 18). Beim Vergleich der Nebenprodukte zeigten beide Mutanten jedoch eine verringerte Produktion von (+)-Germacren D (64), während die Bildung anderer Nebenprodukte anstieg.

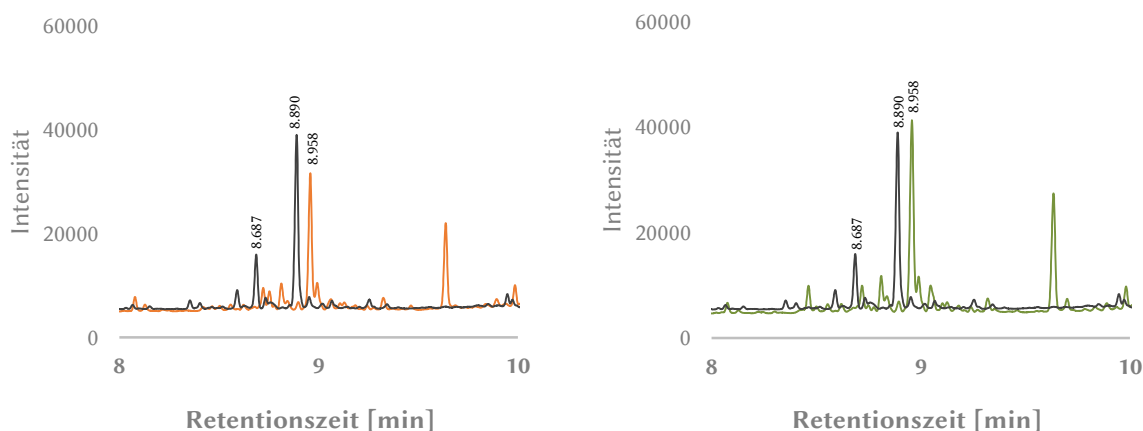


Abbildung 63: Chromatogramme der Biotransformation von FPP (8) durch die Mutanten V80A (orange) und F84V (grün) Cop4. Als Vergleich ist das Chromatogramm der Biotransformation durch den Wildtyp (schwarz) gezeigt. Durch Säulenalterung zeigt sich eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten. Diese wird bei der Betrachtung des Signals des Hauptprodukts Cubebol (37) deutlich. Zudem zeigt sich eine Verunreinigung bei 9.6 min, welche auch in der Negativkontrolle (nicht gezeigt) zu sehen ist.

Auch mit dem etherfunktionalisierten FPP-Derivat **155a** zeigten beide Mutanten eine gute Aktivität (Abbildung 64). Ebenso wie der Wildtyp bildeten beide Mutanten den azyklischen Alkohol **160** und das noch unbekannte Sesquiterpenoid **162** mit $m/z = 220$.

Tabelle 18: Hauptprodukte und ausgewählte Nebenprodukte aus der Biotransformation von FPP (8) und Pyrophosphat 155a durch Cop4 und Cop4-Mutanten. Zudem wurde der Anteil der Produkte am Produktgemisch der STC, die Retentionszeit und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

Cop4-Mutante	Produkte aus FPP			
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
V80A	64	8.753	8	204
	37	8.959	64	222
F84V	64	8.753	1	204
	37	8.958	65	222
Wt	64	8.687	19	204
	37	8.890	68	222
Cop4-Mutante	Produkte aus 155a			
	Retentionszeit [min]	Anteil [%]	m/z	
V80A	162	9.346	45	220
	160	9.532	55	238
	162	9.344	27	220
F84V	160	9.532	44	238
	163	10.346	21	238
	162	9.288	39	220
Wt	160	9.474	61	238

Während die Biotransformation durch V80A keine weiteren Nebenprodukte hervorbrachte, bildete F84V Cop4 moderate Mengen des Sesquiterpenoids 163 mit $m/z = 238$, welches aufgrund des Fragmentierungsmusters identisch mit dem GcoA-Hauptprodukt derselben Biotransformation zu sein scheint. Da die GcoA-katalysierte Biotransformation von 155a jedoch äußerst geringen Umsatz zeigte, könnte das Produkt 163 durch eine Biotransformation durch F84V Cop4 hergestellt und anschließend mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Des Weiteren konnten mindestens zwei zusätzliche Nebenprodukte detektiert werden. Aufgrund der guten Aktivität der Cop4-Mutanten könnten diese ebenfalls in Enzymtests mit weiteren FPP-Derivaten eingesetzt werden.

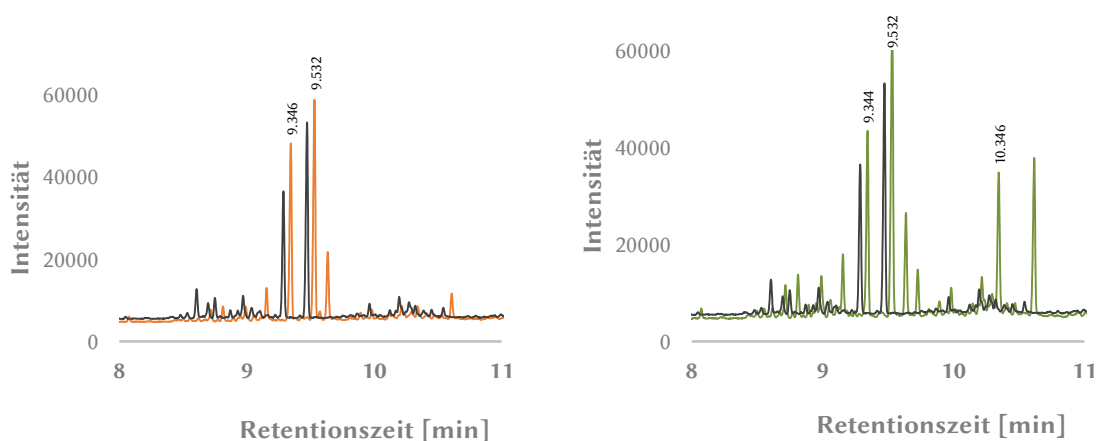
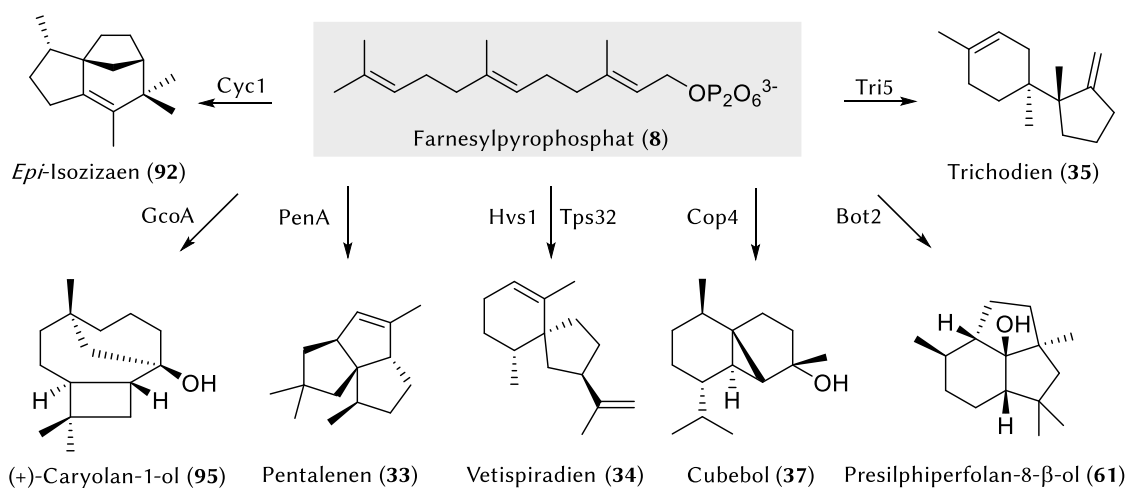


Abbildung 64: Chromatogramme der Biotransformation von 155a durch die Mutanten V80A (orange) und F84V (grün) Cop4. Als Vergleich ist das Chromatogramm der Biotransformation durch den Wildtyp (schwarz) gezeigt. Durch Säulenalterung zeigt sich eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten. Zudem zeigt sich in beiden Spektren eine Verunreinigung nach 10.6 min.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

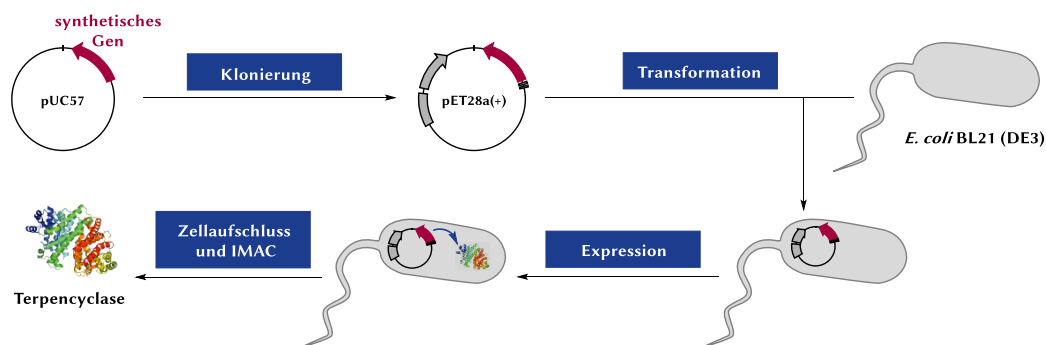
4.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Substratakzeptanz von acht Sesquiterpencyclasen untersucht, die ausgehend vom natürlichen Substrat Farnesylpyrophosphat (FPP, **8**) mit Hilfe komplexer Zyklisierungskaskaden diverse Sesquiterpene bilden (Schema 44). Die Enzyme umfassten die Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase Bot2, die Cubebolsynthase Cop4, die *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1, die (+)-Caryolan-1-ol-Synthase GcoA, die Pentalenensynthase PenA, die Vetispiradiensynthasen Hvs1 und Tps32 sowie die Trichodiensynthase Tri5. Die Farnesylpyrophosphat-Analoga, deren Akzeptanz untersucht wurde, wiesen überwiegend Heteroatomfunktionalisierungen oder Modifizierungen des Methylierungsmusters auf. Anschließend erfolgte die Charakterisierung ausgewählter Produkte der Biotransformationen. Des Weiteren wurden Mutanten der Sesquiterpencyclasen erzeugt und ihre katalytische Aktivität untersucht.



Schema 44: Hauptprodukte der Sesquiterpencyclasen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, ausgehend vom natürlichen Substrat Farnesylpyrophosphat (**8**).

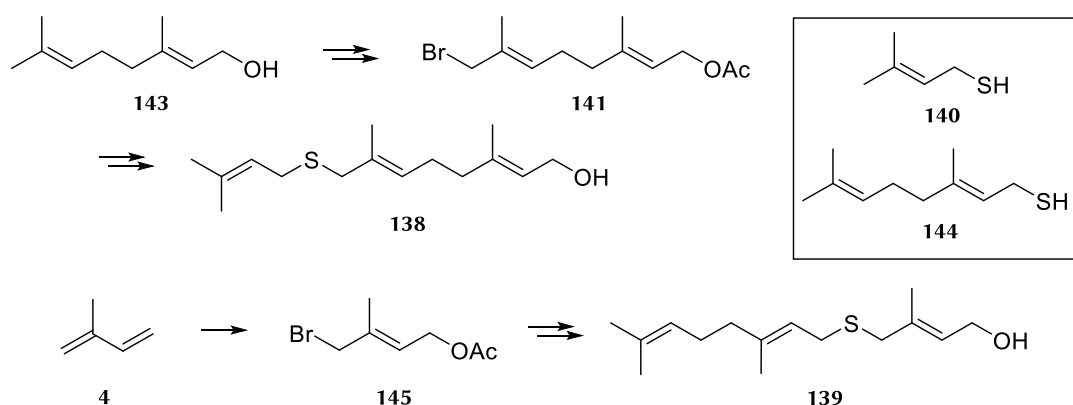
Zur Herstellung der Sesquiterpencyclasen wurden für *Escherichia coli* optimierte, synthetische Gene verwendet. Diese wurden in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert und die daraus resultierenden Konstrukte in den Expressionsorganismus *E. coli* BL21 (DE3) integriert (Schema 45). Bei der heterologen Expression führte die Herabsenkung der Inkubationstemperatur auf 16 °C in allen Fällen zu löslichen Proteinen, welche mittels Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt wurden.



Schema 45: Herstellung der Sesquiterpencyclasen durch heterologe Expression synthetischer Gene in *E. coli* mit anschließender Reinigung durch Affinitätschromatographie (IMAC).

Anschließend wurde die Aktivität der Sesquiterpencyclasen unter Verwendung des natürlichen Substrats FPP untersucht. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die Aktivität aller Sesquiterpencyclasen. Zudem erfolgte eine Optimierung der Tps32-, Cop4-, und GcoA-katalysierten Biotransformationen von FPP im analytischen Maßstab.

Zur Untersuchung der Substrattoleranz von Sesquiterpencyclasen erfolgte zunächst die chemische Darstellung der thioetherfunktionalisierten Farnesyl-Derivate **138** und **139** (Schema 46). Die Synthese des Derivats **138** erfolgte mit einer Tetrabutylammoniumiodid-katalysierten WILLIAMSON-Synthese zwischen dem Thiol **140** und dem aus Geraniol (**143**) generierten Bromid **141** als Schlüsselschritt. Analog dazu wurde das Derivat **139** aus dem Bromid **145** und dem Thiol **144** hergestellt. Die erhaltenen Farnesyl-Derivate wurden abschließend in die entsprechenden Pyrophosphate **155b** und **156b** überführt.



Schema 46: Syntheserouten zur Darstellung der Farnesyl-Derivate **138** und **139**.

Im Anschluss wurden Enzymtests unter Verwendung der FPP-Derivate **155a-c**, **156a-c** und **201-205** mit den zuvor hergestellten Sesquiterpencyclasen durchgeführt (Abbildung 65). Die massenspektrometrische Analyse der Biotransformationen gab Aufschlüsse über die Substratakzeptanz der Sesquiterpencyclasen. Dabei konnte keines der Enzyme die methylaminofunktionalisierten Analoga **155c** und **156c** transformieren. Eine Substrattoleranz gegenüber Derivaten mit stark modifiziertem Methylierungsmuster (**203-205**) konnte ebenfalls nur bei wenigen Enzymen festgestellt werden.

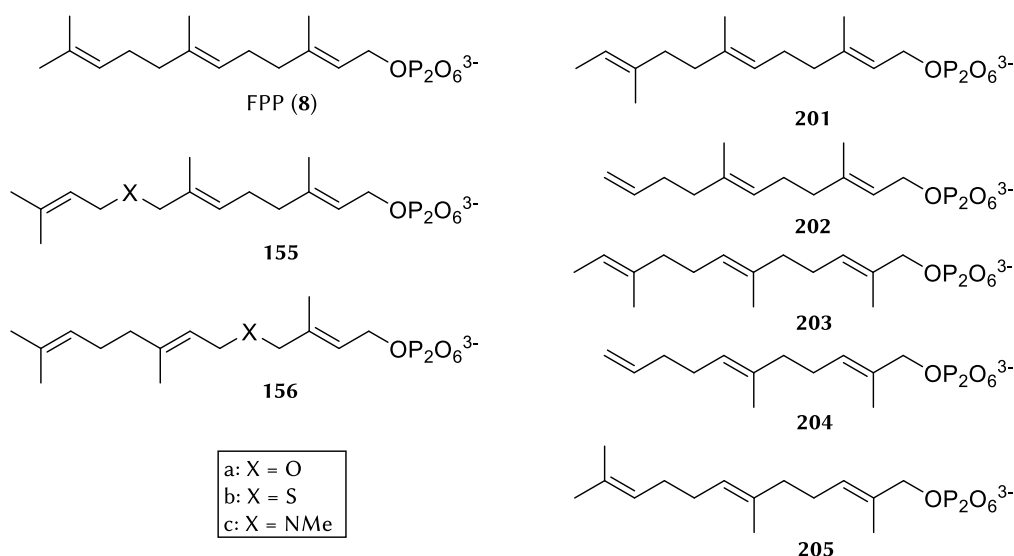
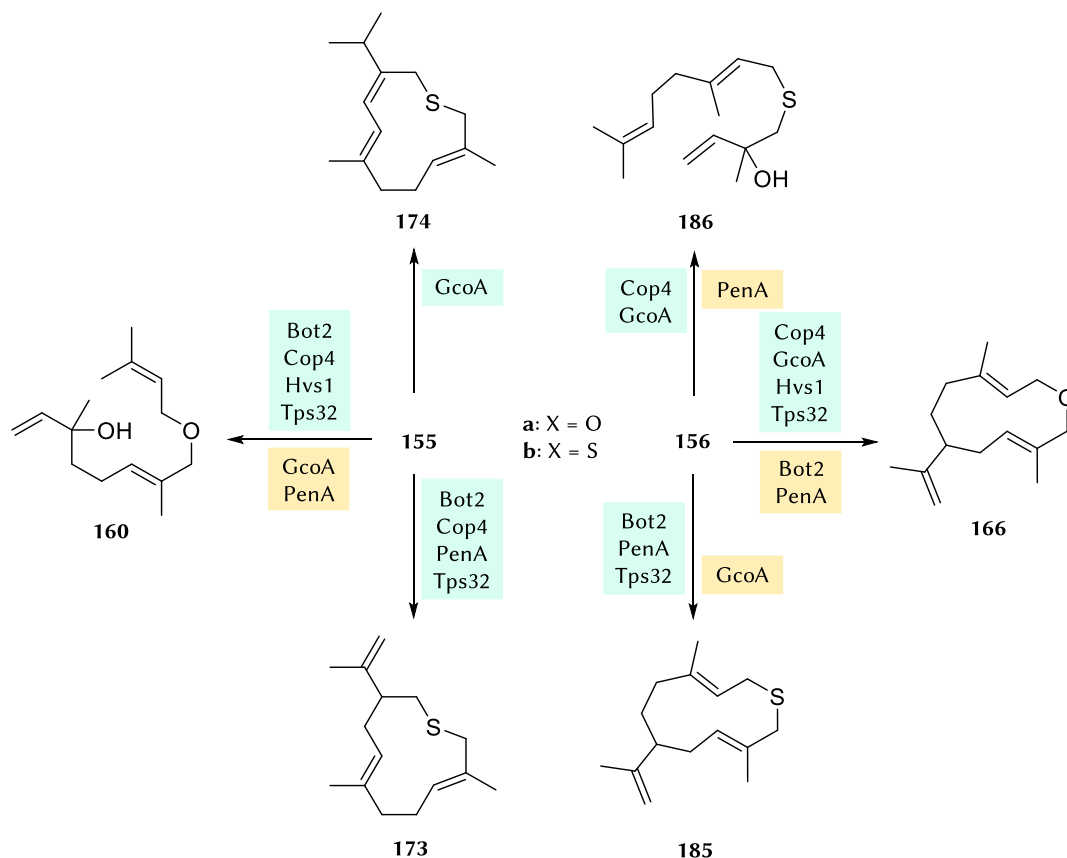


Abbildung 65: Unnatürliche FPP-Analoga, die in der vorliegenden Arbeit als Substrate für Sesquiterpencyclasen getestet wurden.

Das methylierungsmodifizierte Pyrophosphat **201** wurde hingegen von allen Enzymen gut akzeptiert und zeigte in semiquantitativen Ausbeutebestimmungen besonders gute Umsätze, wofür die starke Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat FPP hauptsächlich sein dürfte. Ebenso wurden die ether- und thioetherfunktionalisierten FPP-Derivate **155a-b** und **156a-b** von den meisten Sesquiterpencyclasen gut akzeptiert. Eine Ausnahme bildeten die Trichodiensynthase Tri5 und die *Epi*-Isozizaensynthase Cyc1, deren mangelnde Toleranz auf die initiale 1,6-Zyklisierung des natürlichen Substrats zurückgeführt wurde.

Im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchungen konnte zudem beobachtet werden, dass viele Sesquiterpencyclasen ausgehend vom selben FPP-Derivat das gleiche Produkt bilden, obwohl die Zyklisierungsmechanismen von FPP höchst unterschiedlich sein können. Zur Identifizierung der erzeugten Sesquiterpenoide wurden ausgewählte Biotransformationen im präparativen Maßstab durchgeführt. Dafür erfolgte eine Anpassung der zuvor im analytischen Maßstab verwendeten Bedingungen.

Für Cop4-, GcoA- und Tps32-katalysierte Biotransformationen fanden üblicherweise Fed-Batch-Prozesse mit kontinuierlicher Substratzugabe Verwendung, um die Substratkonzentration aufgrund dessen inhibitorischer Wirkung gering zu halten. Im Falle der etherfunktionalisierten FPP-Analoga **155a** und **156a** erfolgte die Biotransformation hingegen als Batchreaktion mit Tps32. Die NMR-spektroskopische Untersuchung der erhaltenen Sesquiterpenoide führte zur Identifizierung der drei makrozyklischen Thioether **173**, **174** und **185**, sowie des makrozyklischen Ethers **166** (Schema 47). Des Weiteren konnten die zwei azyklischen Alkohole **160** und **186** erhalten werden. Eine olfaktorische Analyse der identifizierten Produkte deutete trotz der Heteroatomfunktionalisierungen kein Potential für neue Duftstoffe an.



Schema 47: Identifizierte Haupt- (blau) oder Nebenprodukte (gelb) der Biotransformationen von **155a-b** und **156a-b**.

Zusätzlich erfolgte die Erzeugung von sieben Mutanten der Sesquiterpencyclasen Cop4, PenA und Tri5. Die Mutationen fokussierten sich mehrheitlich auf den Austausch von aromatischen Aminosäuren im aktiven Zentrum der Enzyme, da diese großen Einfluss auf die Stabilisierung der carbokationischen Intermediate und die Faltung des Substrats ausüben. In Enzymtests wurde die Aktivität der Mutanten in Hinblick auf die Biotransformation von FPP und des Derivats 155a untersucht. Dabei wiesen vor allem die Cop4-Mutanten noch eine sehr gute Aktivität bei der Biotransformation der zwei Pyrophosphate auf und offenbarten die Bildung eines neuen Sesquiterpenoids aus Derivat 155a. Im Gegensatz dazu führten die Mutationen an Tri5 und PenA zu starken Aktivitätseinbußen. Die an Tri5 vorgenommenen Punktmutationen konnten zudem die Substratakzeptanz gegenüber Derivat 155a nicht steigern, so dass weiterhin angenommen wird, dass die 1,6-Zyklisierung der heteroatomfunktionalisierten FPP-Analoga stark beeinträchtigt ist.

4.2 Ausblick

Die Biotransformation der FPP-Analoga 155a-b, 156a-b und 201-205 durch Sesquiterpencyclasen lieferte eine Vielzahl neuer Terpene, von denen in der vorliegenden Arbeit erst ein Teil charakterisiert werden konnte. Weitere Arbeiten sind daher notwendig, um die bisher noch unbekanntesten Terpene zu identifizieren. Insbesondere die semipräparative Herstellung und Identifizierung der etherfunktionalisierten PenA-Produkte 158, 161, 169, 170 und 172 sollte aufgrund des hohen Anteils am Gesamtproduktgemisch nach Optimierung der Biotransformationsbedingungen erfolgreich durchführbar sein und mehrere komplexe Sesquiterpene hervorbringen. Entsprechende Arbeiten dazu werden derzeit durch HARMS weitergeführt.

Des Weiteren sollte die Identifizierung der Produkte, die durch Biotransformationen mit Analogon 201 gebildet wurden, vorangetrieben werden, da dieses Derivat von allen Sesquiterpencyclasen mit verhältnismäßig guten Ausbeuten umgesetzt wurde. Zur Identifizierung des Sesquiterpens 211 wurde in der vorliegenden Arbeit bereits ein Strukturvorschlag gemacht, welcher durch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen verifiziert werden muss. Die biokatalytische Herstellung des Sesquiterpens 206 könnte mit Bot2 erfolgen, da die analytischen Enzymtests höhere Ausbeuten mit Bot2 zeigten als mit PenA. Da die Optimierung von PenA jedoch auch für andere Biotransformationen empfohlen wird, könnten auch in einer einzigen PenA-katalysierten Biotransformation die beiden Produkte 206 und 216 erzeugt werden. Nach Reinigung durch präparative GC können somit gleich zwei Produkte erhalten und identifiziert werden. In ähnlicher Weise könnte mit den Cop4- und Tri5-katalysierten Biotransformationen von Derivat 201 verfahren werden, welche die Identifizierung der Sesquiterpene 210, 211, 213, 223 und 224 ermöglichen würden.

Interessante Ergebnisse brachten auch die GcoA-katalysierten Biotransformationen hervor, da dieses Enzym häufig von den anderen Sesquiterpencyclasen abweichende Produkte, z. B. die Terpene 163, 174, 215, bildete. Eine Identifizierung der noch unbekanntesten Produkte von GcoA könnten helfen, die besonderen katalytischen Mechanismen von GcoA nachzuvollziehen. Allerdings sollten dafür Bedingungen ausgelotet werden, die die Stabilität der Sesquiterpencyclase verbessern.

In Hinblick auf die biokatalytische Herstellung der Terpene bedarf es der Entwicklung von Prozessen oder Systemen, in denen die Umsetzung der FPP-Analoga mit hohen Ausbeuten erfolgt. Erste Ansätze in Form eines Fed-Batch-Prozesses wurden bereits erprobt. Dessen Funktionalität sollte optimiert und anderen Reaktionsprozessen gegenübergestellt werden. Dabei könnte die Verwendung von segmentierten Flowprozessen getestet werden, welche bereits für Biotransformationen mit der Aristolochensynthese und der Amorphadiensynthese zu erfolgreichen Umsatzsteigerungen führten.^[77] Außerdem sollten Verfahren mit immobilisierten Enzymen in Betracht gezogen werden, welche sich

für die Enzymstabilität als förderlich erweisen könnten.^[76] Bei Studien mit der Patchulolsynthese aus *Pogostemon cablin* sowie der (-)-Endo-Fencholsynthese aus *Foeniculum vulgare* konnte die Enzymstabilität beispielsweise durch kovalente Bindung der Proteine an ein Agarose-Polymer erhöht werden.^[97]

Die Optimierungsexperimente im analytischen Maßstab, welche in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, bestätigten, dass Cop4 in einem breiten pH-Bereich aktiv ist, wobei der pH-Wert Einfluss auf die Produktbildung hat. Daher sollten die Biotransformationen der unnatürlichen FPP-Analoga in Zukunft zusätzlich bei pH 5 und pH 10 durchgeführt werden, welche zur Erhöhung der Selektivität und der Entstehung weiterer neuer Terpene führen sowie Erklärungen zur pH-Abhängigkeit der Produktbildung liefern könnten. Auch der Austausch des Cofaktors sowie die Erhöhung der Ionenstärke im Reaktionspuffer zeigten in mehreren Studien Einfluss auf die katalytische Aktivität von Sesquiterpencyclasen und könnten daher auch bei der Biotransformation der Analoga zu veränderten Produktspektren führen.^[20,35]

Des Weiteren konnten die Bot2- und PenA-Produkte der Biotransformation von 205 aufgrund mangelnder Trennleistung nicht massenspektrometrisch analysiert werden. Hierfür sind weitere Untersuchungen unter Verwendung einer GC-Säule mit abweichender Polarität nötig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem sieben Mutanten der Sesquiterpencyclasen erzeugt, deren Aktivität mit FPP und Toleranz des Derivats 155a getestet wurde. Weitere Arbeiten sind erforderlich, um die Substratazeptanz und die Produktbildung der Mutanten mit den übrigen unnatürlichen FPP-Analoga zu testen und den Einfluss der Mutationen nachzuvollziehen.

Des Weiteren sollten die Untersuchungen zum Einfluss der Aminosäuren des aktiven Zentrums auf die Substratazeptanz und die Produktbildung durch Erzeugung weiterer Mutanten ausgeweitet werden. In Hinblick auf eine zielgerichtete Erzeugung von Produkten sollte dabei die Vergrößerung der Enzymtasche geringgehalten werden, um Nebenreaktionen zu reduzieren. Stattdessen könnte die Form der aktiven Tasche durch Einführung räumlich gegenüberliegender Mutationen modifiziert werden, um durch die veränderte Faltung der Intermediate neue Produkte zu erhalten. Für die Cubebolsynthese Cop4 wäre z. B. die Einführung der Mutationen F84A in Kombination mit S305Y sowie L83W in Kombination mit W304L denkbar (Abbildung 66). Diese würden die Enzymtasche jeweils auf der einen Seite um den Umfang eines Aromaten vergrößern und auf der gegenüberliegenden Seite um dasselbe Volumen reduzieren, so dass das Substrat und die Intermediate eine andere Faltung einnehmen sollten.

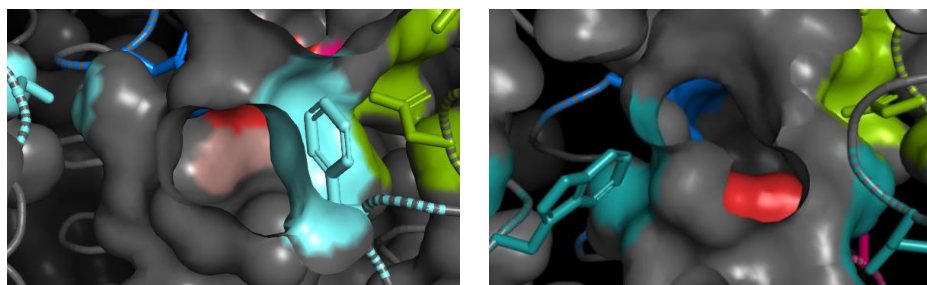


Abbildung 66: Vorschläge zur Punktmutation gegenüberliegender Aminosäuren in Cop4. Farblich markiert sind S305 und F84A (links, hellblau) sowie W304 und L83 (rechts, dunkelgrün). Im Hintergrund sind zudem Teile der Effektortriade (rot/rosa), des DDXXD-Motivs (grün) und des NSE/DTE-Motivs (blau) zu erkennen.

Während diese Herangehensweise nur Aminosäuren betrachtet, die die aktive Tasche konturieren, zeigten mehrere Mutagenesestudien an Sesquiterpencyclasen, dass sogenannte Plastizitätsreste, deren Mutation das Produktspektrum verändern, auch außerhalb dieses Bereichs zu finden sind.^[98,99]

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Stickstoffatmosphäre unter Schlenkbedingungen durchgeführt. Dafür wurden Glasgeräte verwendet, die zuvor im Vakuum ausgeheizt wurden. Die wasserfreien Lösungsmittel THF, CH₂Cl₂, DMF und Diethylether wurden dem *Solvent Purification System* SPS der Firma M. Braun Inertgas-Systeme GmbH entnommen. Reagenzien und Enzyme, deren Herkunft oder Herstellung nicht beschrieben ist, sowie Lösungsmittel, Puffer- und Medienbestandteile wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific, Inc., Acros Organics, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Merck KGaA, Duchefa Biochemie B.V., Carl Roth GmbH & Co. KG, Honeywell Deutschland AG, New England Biolabs GmbH, Applichem GmbH und Fluka AG erworben. Für biologische Arbeiten wurden Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen aus Polypropylen von Sarstedt AG & Co. KG verwendet. Diese wurden auch für Biotransformationen im analytischen Maßstab eingesetzt, während für präparative Maßstäbe, aufgrund der im Polypropylen enthaltenen Zusätze und Weichmacher, fast ausschließlich Glasgeräte Verwendung fanden. Spritzen und Kanülen wurden von der Firma B. Braun Melsungen AG bezogen. Bei dem verwendeten Wasser, handelte es sich stets um deionisiertes und ggf. zusätzlich sterilisiertes Wasser. Sofern nicht anders angegeben wurden Salzlösungen als gesättigte, wässrige Lösungen verwendet. Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG mit einer Korngröße von 40 – 63 µm bezogen. Die Durchführung erfolgte unter leichtem Überdruck mit zuvor destillierten oder in analytischer Reinheit bezogenen Lösungsmitteln und mit dem in der Versuchsvorschrift angegebenen Eluentenverhältnis. Analog dazu wurde in manchen Fällen eine automatisierte Säulenchromatographie mit dem Flash-Chromatographiesystem Sepacore® X50 der BÜCHI Labortechnik AG mit UV-Monitor C-630, *Fraction Collector* C-660 und *Control Unit* C-620 durchgeführt. Dafür fanden vorgepackte Silikasäulen (puriFlash® von Interchim SA oder Chromabond® von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) Verwendung. Zur Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien Alugram® Xtra SIL G UV₂₅₄ von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG verwendet. Dabei wurden die Substanzen durch Fluoreszenzdetektion mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder durch Anfärbung mit Anisaldehyd-Färbereagenz nachgewiesen.

SYNTHETISCHE GENE

Die verwendeten synthetischen Gene wurden von Genewiz, Inc. als Konstrukt mit pUC57 bezogen. Ihre Sequenz (Kapitel 7.1) ist auf den Codongebrauch von *Escherichia coli* optimiert worden, um die Expression zu erleichtern. Alle erworbenen Gene, bis auf *penA*, enthalten eine eigene Stopsequenz. Im Fall von *penA* wird die im Expressionsvektor pET28a(+) enthaltene Stopsequenz genutzt, wodurch die STC einen zweiten 6×His-Tag aufweist.

GERÄTE, SOFTWARE UND DATENBANKEN

Zunächst sind alle verwendeten Geräte für molekular- und mikrobiologische Arbeiten (Tabelle 19) aufgeführt. Anschließend werden die verwendeten Programme, Datenbanken sowie bioinformatische Tools aufgelistet (Tabelle 20).

Tabelle 19: Verwendete Geräte und Apparaturen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten.

Bereich	Gerät	Hersteller
Mikropipetten/ Pipettierhilfen	Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Abimed GmbH/Gilson, Inc.
	Biohit Midi Plus Pipettiereinheit	Sartorius AG
Zentrifugen	Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf AG
	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Inc.
	Tischzentrifuge MiniStar Silverline	VWR International
	Vakuumpfuge Concentrator 5301	Eppendorf AG
Inkubatoren	Heratherm Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Inc.
	Schüttelinkubator Innova 44	New Brunswick Scientific Co.
	Schüttelinkubator Excella E24	New Brunswick Scientific Co.
	Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf AG
Elektrophorese	PerfectBlue Gel System Midi S	Peqlab Biotechnologie GmbH
	Gelkammersystem ComPhor Mini	Biozym Scientific GmbH
	Gelkammersystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.
	Consort Electrophoresis Power Supply E835	Sigma-Aldrich Co.
	Consort Electrophoresis Power Supply E833	Sigma-Aldrich Co.
	Gel Doc™ XR+ System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
weitere Geräte	Mikroskop DM4000 B LED mit Kamera DFC450	Leica Camera AG
	pH-Meter pHenomenal 1000L	VWR International
	Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.
	Tischschüttler	Infors AG
	Reinstwasser-System Ultra-Clear	SG Wasseraufbereitungs- und Regenerierstation GmbH
	ÄKTA pure 25 mit 50 mL-Probenschleife, HisTrap FF-Säule (5 mL) und Fraction collector F9-R bzw. F9-C	GE Healthcare AB
	DS-11+ Spectrophotometer	DeNovix, Inc.
	Spectra max 384 Plus	Molecular Devices, LLC
	FoodALYT Photometer	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG
	Thermocycler T100	Bio-Rad Laboratories, Inc.
	Sonopuls HD3100 mit KE76 Sonotrode	Bandelin electronic GmbH & Co. KG
	Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Inc.
	Autoklav 2100 Classic	Prestige Medical Co.
	AutoklavVX-95	Systec GmbH

Experimenteller Teil

Tabelle 20: Datenbanken und Software mit ihrem Hersteller und Verwendungszweck.

Verwendungszweck	Software/Datenbank
Zeichnen von chemischen Strukturen und Plasmiden	ChemBioDraw Ultra, Version 17.0.0.206, CambridgeSoft Corporation/PerkinElmer, Inc.
NMR-Spektren	a) Topspin, Version 3.5 pl 7, Bruker BioSpin GmbH b) MestReNova, Version 6.0.2-5475, Mestrelab Research S.L.
GC-MS Steuerung und Auswertung	MSD Productivity ChemStation, Agilent Technologies, Inc.
FPLC Steuerung und Auswertung	Unicorn, Version 6.3, GE Healthcare AB
Datenbank für Gen- und Proteinsequenzen	National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine ^[102]
Datenbank für Proteinstrukturen	Protein Data Bank (PDB), Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)
Virtuelle Klonierungen	Serial Cloner, Version 2.6.1, Franck Perez, Serial Basics
Sequenzalignment	a) Megablast, Basic Local Alignment Search Tool (Blast) von NCBI, U.S. National Library of Medicine ^[102] b) Lalign, ExPaSy, Swiss Institute of Bioinformatics ^[103]
Reverses Komplement	reverse-complement.com ^[104]
Schmelztemperatur-Rechner für PCR	Tm Calculator, Version 1.8.1, New England Biolabs ^[105]
Bestimmung von Proteinmasse und pl	Compute pl/Mw tool, ExPaSy, Swiss Institute of Bioinformatics ^[106]
Bestimmung des Extinktionskoeffizienten	ProtParam tool, ExPaSy, Swiss Institute of Bioinformatics ^[107]
Darstellung von Proteinstrukturen	PyMOL, Version 1.3, DeLano Scientific, LLC., Schrödinger
Proteinmodellierung	Phyre2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) ^[95]
Geldokumentation	ImageLab von Bio-Rad Laboratories, Inc.

NÄHRMEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR MIKRO-UND MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN

Für alle Medien, Nähragar und Lösungen wurde entionisiertes Wasser verwendet. Zudem wurden Medien und Agar vor der Verwendung 15 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 21 angegeben. Details zu verwendeten Lösungen und Puffern sind in Tabelle 22 zu finden.

Tabelle 21: Zusammensetzung von Nährmedien und Nähragar.

MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG		MEDIUM ZUR TRANSFORMATION	
LB-Medium/Agar		SOC-Medium (400 mL)	
Hefeextrakt	0.5 % [m/v]	Trypton	2 % [m/v]
Trypton/Pepton	1 % [m/v]	Hefeextrakt	0.5 % [m/v]
NaCl	0.5 % [m/v]	NaCl	0.06 % [m/v]
ggf. Agar	1.5 % [m/v]	KCl	0.02 % [m/v]
2TY-Medium		<i>Zugabe nach dem Autoklavieren:</i>	
Trypton/Pepton	1.6 % [m/v]	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	25 mM
Hefeextrakt	1 % [m/v]	Glucose	1 % [m/v]
NaCl	0.5 % [m/v]		

Experimenteller Teil

Tabelle 22: Lösungen und Puffer für biologische Arbeiten, sortiert nach Verwendungszweck.

PLASMIDPRÄPARATION		SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE	
Lösung 1		LÄMMLI-Mix	
Glucose	50 mM	TRIS-HCl (pH 6.8)	150 mM
TRIS-Base	25 mM	SDS	6 % [m/v]
EDTA	10 mM	Glycerin	30 % [v/v]
<i>Einstellen auf pH 8.0 mit HCl</i>		Bromphenolblau	0.02 % [m/v]
Lösung 2		LÄMMLI-Puffer	
NaOH	200 mM	Lämmli-Mix	80 % [v/v]
SDS	1 %	DTT	100 mM
Lösung 3		SDS	1 % [m/v]
Kaliumacetat (pH 5.5)	3 M	10× SDS-Laufpuffer	
AGAROSE-GELELEKTROPHORESE		TRIS-Base	0.25 M
50×TAE-Puffer		SDS	1 % [m/v]
TRIS-Acetat	2 M	Färbelösung	
EDTA	5 mM	Isopropanol	25 % [v/v]
<i>Einstellen auf pH 8.0</i>		Essigsäure	10 % [v/v]
6× Ladepuffer		Coomassie Brilliant Blue P250	0.1 % [m/v]
Bromphenolblau	15 % [m/v]	Entfärbelösung	
Xylencyanol FF	15 % [m/v]	Isopropanol	25 % [v/v]
Glycerin	3 % [v/v]	Essigsäure	10 % [v/v]
PUFFER FÜR ENZYMTESTS		PROTEINREINIGUNG/FPLC	
Überall enthalten:		Lysispuffer	
DTT	5 mM	TRIS-HCl	40 mM
HEPES-Puffer		NaCl	100 mM
HEPES	50 mM	<i>Einstellen auf pH 8.0 mit NaOH</i>	
<i>Einstellen auf pH 7.5 mit NaOH</i>		Waschpuffer	
TRIS-Puffer		TRIS-HCl	30 mM
TRIS-HCl	50 mM	NaCl	100 mM
<i>Einstellen auf pH 8.0 oder 8.5 (30 °C) mit NaOH</i>		Imidazol	10 mM
PIPES-Puffer		<i>Einstellen auf pH 8.0 mit NaOH</i>	
PIPES	50 mM	Elutionspuffer	
<i>Einstellen auf pH 6.2, 6.7 oder 7.0 mit NaOH</i>		TRIS-HCl	30 mM
CAPS-Puffer		NaCl	500 mM
CAPS	50 mM	Imidazol	100 mM
<i>Einstellen auf pH 10.0 mit NaOH</i>		<i>Einstellen auf pH 8.0 mit HCl</i>	
Natriumacetat-Puffer			
Natriumacetat	10 mM		
<i>Einstellen auf pH 5.0 mit NaOH</i>			
MES-Puffer			
MES	50 mM		
<i>Einstellen auf pH 6.0 mit NaOH</i>			

5.2 Analytik der chemisch- und biosynthetischen Arbeiten

KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE (NMR)

Die Messungen für ^1H -NMR Spektren erfolgten mit den Geräten AVS-400, Ascend-400 und DPX-500 der Firma Bruker Corp. bei 400 MHz bzw. 500 MHz und bei Raumtemperatur. ^1H -Breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR Spektren wurden bei 100 MHz bzw. 125 MHz und ^{31}P -NMR-Spektren bei 162 MHz gemessen. Das jeweils verwendete Lösungsmittel ist bei den NMR-Daten angegeben und diente mit seinem durch den Restprotonengehalt verursachten Signal zur Kalibrierung der ^1H -NMR-Spektren (Tabelle 23). Bei der Verwendung von deuteriertem Chloroform erfolgte ebenfalls eine Kalibrierung im ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Kohlenstoffatome.

Tabelle 23: Chemische Verschiebungen verwendeter Lösungsmittel zur Kalibrierung von NMR-Spektren.

Lösungsmittel	^1H -NMR	^{13}C -NMR
CDCl_3	7.26 ppm	77.16 ppm
D_2O	4.79 ppm	

Die chemischen Verschiebungen δ sind in *part per million* (ppm) angegeben und die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Die Abkürzungen der Multiplizitäten der Signale sind in Tabelle 24 aufgelistet. Bei breiten Signalen wurden diese zusätzlich mit „breit“ (br) gekennzeichnet. Die Nummerierung zur Zuordnung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome entspricht dabei nicht den IUPAC-Regeln

Tabelle 24: Multiplizitäten der NMR-Signale.

Multiplizität	Abkürzung
Singulett	s
Duplett	d
Triplet	t
Quartett	q
Sechstett	sex
Septett	sept
Multiplett	m

In den meisten Fällen wurden zudem ^1H - ^1H -Korrelationsexperimente (COSY) und ^1H - ^{13}C -Korrelationsexperimente (HMBC, HSQC) durchgeführt. Sofern nötig, erfolgte außerdem die Bestimmung ausgewählter nuklearer Overhauser-Effekte (NOE) zur Aufklärung der relativen Stereochemie literaturunbekannter Verbindungen.

HRMS

Die Bestimmung der Molekülmasse durch hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) erfolgte bei Farnesol-Derivaten entweder mit einer LockSprayTM Elektronenspray-Ionenquelle in Kombination mit dem HPLC-System der Waters GmbH oder mit einem Micromass[®] Q-ToF premierTM Spektrometer mit Elektronensprayionisation in Kombination mit dem UPLC-System ACQUITY der Waters GmbH. Die Produktauftrennung erfolgte mittels C18-Säule mit Wasser und Methanol bzw. Acetonitril, jeweils mit 0.1 % Ameisensäure, als Lösungsmittel sowie einer Flussrate von 0.4 mL/min.

GC-FID UND GC-MS ANALYTIK

Zur Analytik von Enzymtests und ausgewählten, synthetischen Verbindungen erfolgten GC-FID und GC-MS Messungen (Tabelle 25). Synthetische Verbindungen wurden mit einer Massenkonzentration von 1 mg/mL in Ethylacetat, *n*-Pentan oder *n*-Hexan gelöst, von denen 1 µL mit einem *split* von 1:40 injiziert wurde. Für Enzymtests fand üblicherweise ein Injektionsvolumen von 5 µL *splitless* Verwendung. Dieses wurde auf 3 µL reduziert bzw. ein 1:10 *split* verwendet, wenn ausreichend Produkt durch die jeweilige Biotransformation erhalten werden konnte.

Tabelle 25: Gerätedaten der GC-MS und Details zu den verwendeten Methoden.

Hersteller	Hewlett Packard, Inc.
Gerät	GC System 6890 Series HP 5973 Quadrupole Mass Selective Detector
Säule	Optima 5 (Poly(5%-phenyl-95%-methylsiloxane), Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0.32 mm, Filmdicke: 0.25 µm Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Trägergas	Helium
Split	<i>splitless</i> und <i>split</i> bis 1:40
Injektionsvolumen	1 – 5 µL
Injektortemperatur	60 °C → 12°C/min bis 300°C
Purge Flow	2 min
Flussrate	15 mL/min
Temperaturprogramm	iso 50 °C für 1 min → 20 °C/min bis 300 °C → iso 300 °C für 6 min
Gesamtlaufzeit	20 min
Ionenquelle	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID) und MS
Massenspektrometer (MS)	Ionenfalle
Massenbereich	40-500 u

GASCHROMATOGRAPHIE-OLFAKTOMETRIE

Die olfaktorische Analyse ausgewählter Sesquiterpenoide erfolgte mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) (Tabelle 26). Diese trennt die Terpenoide mittels Gaschromatographie auf und leitet diese anschließend durch eine Säule (1 m x 150 µm, 250 °C) ohne stationäre Phase zum *Olfactory Detection Port* (ODP 3) der Gerstel GmbH & Co. KG weiter.

Tabelle 26: Gerätedaten der GC-O und Details zu den verwendeten Methoden.

Hersteller	Agilent Technologies, Inc.
Gerät	GC 7890B Chromatograph
Säule	Zebron ZB-FFAP (7KG-G009-11), Länge: 60 m, Innendurchmesser: 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm
Trägergas	Helium
Injektor	Gerstel CIS4 Cold Injector
Split	<i>split</i> zwischen 1:5 und 1:20
Injektionsvolumen	1 µL
Injektortemperatur	50 °C → 12 °C/s bis 260 °C
Flussrate	1.4 mL/min
Temperaturprogramm	50 °C → 8 °C/min bis 230 °C → iso 230 °C für 22.5 min.
Gesamtlaufzeit	45 min
Ionenquelle	Elektronenstoßionisation (EI)
Detektoren	MS und Flammenionisationsdetektor (FID)
Sniffer	Gerstel OPD 3

PRÄPARATIVE GC

Die Isolierung von Terpenen erfolgte mit Hilfe einer präparativen GC. Dabei erfolgte die Probeninjektion *splitless* mit einem integrierten Autosampler und über Heißaufgabe. Das Temperaturprogramm wurde an das jeweilige Trennproblem angepasst.

Tabelle 27: Gerätedaten der präparativen GC.

Hersteller	Hewlett-Packard, Inc.
Gerät	GC System 6890 Series HP 5973 Quadrupole Mass Selective Detector
Säule	DB-1 (Dimethylpolysiloxane), Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0.53 mm, Filmdicke: 3 µm Agilent Technologies, Inc.
Trägergas	Helium
Injektionsvolumen	1 µL <i>splitless</i>
Injektortemperatur	250 °C
Flussrate	5.0 mL/min
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektortemperatur	275 °C
Fraktionssammler	Gerstel PFC

CHIRALE GC

Um festzustellen, ob es sich bei den Biotransformationsprodukten um Enantiomere handelt, wurden GC-Messungen mit drei verschiedenen chiralen Säulen durchgeführt (Tabelle 28). Die Proben wurden manuell über Heißaufgabe injiziert.

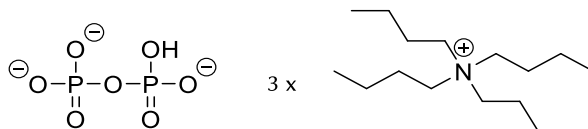
Tabelle 28: Gerätedaten der chiralen GC-FID und Details zu den verwendeten Methoden.

Hersteller	Agilent Technologies, Inc.
Gerät	GC HP6890 Chromatograph
Säulen	a) Hydrodex- β -6-TBDM Länge: 25 m, Innendurchmesser: 0.25 mm, Filmdicke: 0.25 μ m
	b) Hydrodex- β -PM Länge: 50 m, Innendurchmesser: 0.25 mm, Filmdicke: 0.25 μ m
	c) Lipodex-G Länge: 25 m, Innendurchmesser: 0.25 mm, Filmdicke: 0.25 μ m
Trägergas	Wasserstoff
Split	split 1:10
Split flow	16.9 mL/min
Injektionsvolumen	1 μ L
Flussrate	20.8 mL/min
Temperaturprogramm	70°C \rightarrow 2 °C/s bis 190 °C \rightarrow iso 190 °C für 30 min
Gesamtlaufzeit	45 min
Detektoren	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektortemperatur	250 °C

5.3 Chemische Synthese

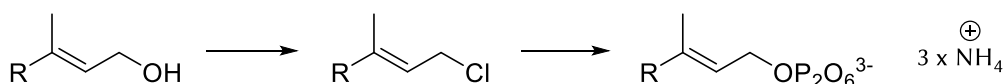
VORSCHRIFTEN ZUR DARSTELLUNG VON PYROPHOSPHAT-DERIVATEN

Tetrabutylammoniumdihydrogendiphosphattri-hydrat (152)



Dinatriumdihydrogendiphosphat (4.00 g, 18.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Gemisch aus Ammoniumhydroxid (1.3 mL) und Wasser (32 mL) gelöst, über eine Ionenaustauscher-Säule (DOWEX AG 50W-X8 (100-200 mesh), H⁺-Form) gegeben und mit Wasser (250 mL) eluiert. Das Eluat wurde mit Tetra-*n*-butylammoniumchlorid bis pH 7 titriert. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Bei Schaumbildung erfolgte die Zugabe von Acetonitril. Die Zielverbindung wurde als farblose Kristalle (15.8 g, 16.5 mmol, 92 %) erhalten und ohne weitere Analytik in der nächsten Stufe eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Pyrophosphaten

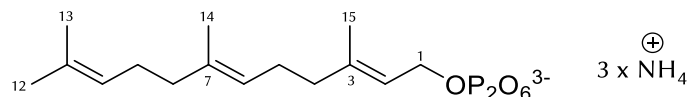


N-Chlorosuccinimid (1.66 mmol, 1.1 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in wasserfreiem CH₂Cl₂ (6.0 mL) gelöst. Dimethylsulfid (1.81 mmol, 1.2 Äq.) wurde langsam bei -30 °C hinzugegeben, bevor das Reaktionsgemisch auf 0 °C erwärmt und für 5 min gerührt wurde. Anschließend erfolgte bei -40 °C die Zugabe des Alkohols (1.51 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂ (1.0 mL). Das Gemisch wurde zunächst mindestens 1 h bei 0 °C und dann bis zu 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaCl-Lösung beendet und die Phasen getrennt. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit *n*-Pentan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden zweimal mit NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Das erhaltene, gelbe Öl wurde ohne Reinigung und Analytik direkt in der nächsten Stufe verwendet.

Das Chlorid (1.21 mmol, 1.0 Äq.) wurde in wasserfreiem Acetonitril (1.0 mL) gelöst und unter Stickstoffatmosphäre zu einer Lösung aus Tetrabutylammoniumdihydrogendiphosphattri-hydrat (2.33 mmol, 1.9 Äq.) in wasserfreiem Acetonitril (5.0 mL) gegeben. Das Gemisch wurde für 2 – 3 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde in Ionenaustauschpuffer (1.5 mL, 25 mM Ammoniumbicarbonat in Isopropanol/Wasser (2 % v/v)) gelöst und mittels Ionenaustauscher (DOWEX AG 50W-X8 (100-200 mesh), NH₄⁺-Form) in das Ammoniumsalz überführt. Nachdem das Eluat mit Isopropanol versetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt worden war, erfolgten mindestens zwei Wiederholungen des Ionenaustauschs. Anschließend wurde der Rückstand in einer Ammoniumbicarbonatlösung (0.05 M, 5.0 mL) gelöst und mit einem Acetonitril-Isopropanol-Gemisch (1:1, 7.0 mL) versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Suspension für 5 min bei 5000 U zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgetrennt und separat gesammelt, bevor der

Vorgang mit dem Rückstand fünfmal wiederholt wurde. Das Lösungsmittel der vereinigten Überstände wurde unter vermindertem Druck entfernt.

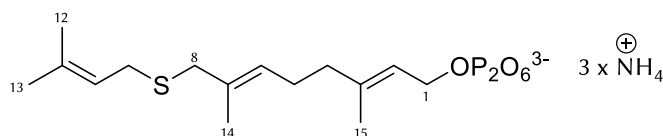
Farnesylpyrophosphat (8)



Entsprechend der allgemeinen Vorschrift für die Synthese von Pyrophosphaten wurde ausgehend von Farnesol (153) (500 mg, 2.25 mmol, 1.0 Äq.) zunächst das Chlorid 154 als gelbes Öl (517 mg, 2.15 mmol, 95 %) erhalten. Nach NMR-spektroskopischer Analyse wurde das Chlorid 154 (400 mg, 1.66 mmol, 1.0 Äq.) weiter umgesetzt und die Zielverbindung 8 als weißer Feststoff (0.6 g, 1.38 mmol, 79 % (über zwei Stufen)) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.45 (t, J = 7 Hz, 1H, 2-H), 5.23-5.14 (m, 2H, 6-H, 10-H), 4.48 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 1-H₂), 2.20-1.97 (m, 8H, 4-H₂, 5-H₂, 8-H₂, 9-H₂), 1.72 (s, 3H, 15-H₃), 1.68 (s, 3H, 13-H₃), 1.61 (s, 6H, 12-H₃, 14-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 142.9 (C-3), 136.4 (C-7), 133.3 (C-11), 124.5 (C-6), 124.2 (C-10), 119.5 (d, C-2), 62.8 (d, C-1), 38.9 (C-4, C-8), 25.8 (C-5), 25.7 (C-9), 24.9 (C-13), 17.0 (C-12), 15.6 (C-15), 15.3 (C-14); ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm] = -9.82 (d, J = 19 Hz), -10.35 (d, J = 19 Hz). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[77]

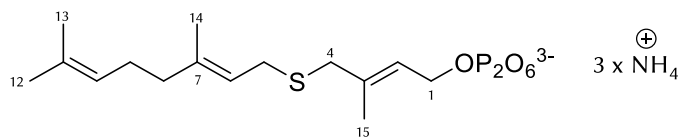
Analogon 155b



Der Alkohol 138 (200 mg, 0.786 mmol, 1.0 Äq.) wurde nach Verwendung der allgemeinen Vorschrift für die Synthese von Pyrophosphaten zum FPP-Derivat 155b umgesetzt und als gelber Feststoff (298 mg, 0.640 mmol, 81 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.45 (t, 1H, J = 6.8 Hz, 2-H), 5.35 (t, 1H, J = 6.8 Hz, 10-H), 5.29-5.22 (m, 1H, 6-H), 4.50-4.43 (m, 2H, 1-H₂), 3.13 (s, 2H, 8-H₂), 3.07 (d, 2H, J = 7.8 Hz, 9-H₂), 2.24-2.10 (m, 2H, 5-H₂), 2.16-2.10 (m, 2H, 4-H₂), 1.74-1.72 (m, 3H, 13-H₃), 1.72 (br s, 3H, 14-H₃), 1.70 (br s, 3H, 15-H₃), 1.65 (br s, 3H, 12-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 142.7 (C-3), 137.0 (C-11), 131.3 (C-7), 128.3 (C-6), 119.7 (C-2), 119.6 (d, C-10), 62.8 (d, C-1), 39.9 (C-8), 38.6 (C-4), 27.7 (C-9), 25.7 (C-5), 24.8 (C-13), 17.1 (C-12), 15.5 (C-15), 14.3 (C-14); ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm] = -10.3 (d, J = 20.8 Hz), -10.8 (d, J = 20.8 Hz).

Analogon 156b

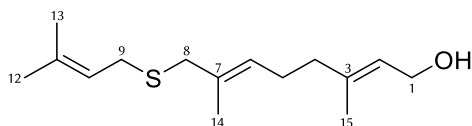


Der Alkohol **139** (383 mg, 1.51 mmol, 1.0 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Vorschrift für die Synthese von Pyrophosphaten zum Pyrophosphat **156b** (425 mg, 0.91 mmol, 61 %) umgesetzt und als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.57 (t, J = 6.6 Hz, 1H, 2-H), 5.23 (t, J = 7.7 Hz, 1H, 6-H), 5.13 (t, J = 6.5 Hz, 1H, 10-H), 4.51 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 1-H₂), 3.17 (s, 2H, 4-H₂), 3.13 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 5-H₂), 2.16-2.08 (m, 2H, 9-H₂), 2.08-2.00 (m, 2H, 8-H₂), 1.8 (s, 3H, 15-H₃), 1.67 (s, 3H, 13-H₃), 1.66 (s, 3H, 14-H₃), 1.61 (s, 3H, 12-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 139.5 (C-7), 137.2 (C-3), 132.2 (C-11), 124.3 (C-10), 123.2 (d, C-2), 120.0 (C-6), 62.6 (d, C-1), 39.7 (C-4), 39.2 (C-8), 28.6 (C-6), 26.0 (C-9), 25.2 (C-13), 17.3 (C-12), 15.6 (C-14), 15.0 (C-15); ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm] = -10.2 (m), -10.8 (m).

SYNTHESE VON FARNESOL-DERIVAT 138

(2*E*,6*E*)-3,7-Dimethyl-8-((11-methylbut-10-en-9-yl)thio)octa-2,6-dien-1-ol (**138**)

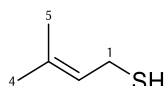


Eine Suspension aus NaH (60 %, 32.0 mg, 0.80 mmol, 1.1 Äq.) in wasserfreiem DMF (12 mL) wurde bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre mit dem Thiol **140** (97.0 mg, 0.94 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde zunächst 15 min bei 0 °C und dann 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte bei 0 °C die Zugabe des Bromids **141** (200 mg, 0.73 mmol, 1.0 Äq.) in wasserfreiem THF (1.0 mL) sowie TBAI (23.0 mg, 73.0 mmol, 0.1 Äq.). Das Gemisch wurde 18 h gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Ammoniumchloridlösung (10 mL) beendet. Nach Zugabe von MTBE wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit MTBE extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden zunächst mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen, bevor sie über MgSO₄ getrocknet und anschließend filtriert wurden. Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurde der Thioether **148** als gelbes Öl erhalten, welches nach NMR-spektroskopischer Untersuchung direkt in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

Eine Lösung des Thioethers **148** (400 mg, 1.35 mmol, 1.0 Äq.) in wasserfreiem Methanol (3.4 mL) wurde bei 0 °C mit Natriummethanolat (290 mg, 5.37 mmol, 4.0 Äq.) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid-Lösung (5.0 mL) beendet. Nach Zugabe von MTBE (5.0 mL) wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit MTBE extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc = 5:1) verblieb ein farbloses Öl (210 mg, 0.83 mmol, 69 % (über zwei Stufen)).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.44-5.39 (m, 1H, 2-H), 5.26-5.19 (m, 2H, 6-H, 10-H), 4.15 (dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 0.6$ Hz, 2H, 1-H₂), 3.06 (s, 2H, 8-H₂), 3.01 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, 9-H₂), 2.21-2.13 (m, 2H, 5-H₂), 2.10-2.03 (m, 2H, 4-H₂), 1.73 (s, 3H, 12-H₃), 1.70 (s, 3H, 15-H₃), 1.68 (s, 3H, 14-H₃), 1.64 (s, 3H, 13-H₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 139.3 (C-3), 135.1 (C-11), 131.6 (C-7), 127.3 (C-6), 123.7 (C-2), 120.6 (C-10), 59.4 (C-1), 40.9 (C-8), 39.3 (C-4), 28.6 (C-9), 26.3 (C-5), 25.7 (C-12), 17.8 (C-13), 16.2 (C-14), 15.1 (C-15); HRMS [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{OSNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 277.1602, gefunden 277.1605.

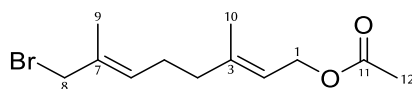
3-Methyl-2-buten-1-thiol (140)



Eine Lösung aus 3,3-Dimethylallylbromid (4.64 g, 31.1 mmol, 1.0 Äq.) und Thioharnstoff (2.38 g, 31.3 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (20 mL) wurde 3 h unter Rückfluss gerührt. Die Hydrolyse des Intermediats erfolgte durch die Zugabe von wässriger Natriumhydroxid-Lösung (10 %, 25 mL) und 3 h rühren bei 70 °C. Anschließend wurde Diethylether (20 mL) zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit HCl auf pH 2 angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Thiol **140** als gelbes Öl (2,66 g, 26.0 mmol, 83 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.36-5.29 (m, 1H, 2-H), 3.14 (t, $J = 7.5$, 2H, 1-H₂), 1.71 (s, 3H, 4-H₃), 1.65 (s, 3H, 5-H₃), 1.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, S-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 134.1 (C-3), 123.6 (C-2), 25.7 (C-4), 22.3 (C-1), 17.5 (C-5); GC-MS [EI] (4.066 min) m/z (%): 102 (82), 87 (7), 69 (100), 53 (37); Sdp. (40 mbar) = 40 °C. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[108]

(2E,6E)-8-Bromogeranylacetat (141)

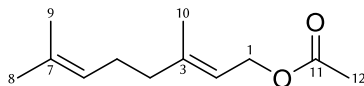


Eine Lösung aus Alkohol **147** (3.07 g, 14.5 mmol, 1.0 Äq.) und PPh_3 (4.93 g, 18.8 mmol, 1.3 Äq.) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (37 mL) wurde bei -20°C unter Stickstoffatmosphäre mit NBS (3.35 g, 18.8 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Anschließend wurde 2 h bei gleichbleibender Temperatur gerührt. Durch Zugabe von Diethylether wurde die Reaktion beendet. Der entstandene gelb-orangene, wachsartige Niederschlag wurde mehrfach abfiltriert. Nach Reduktion des Lösungsmittels unter verminderten Druck, wurde erneut Diethylether zugegeben und der nun weiße, kristallartige Niederschlag mittels Filtration entfernt. Die Lösung wurde über Nacht zur weiteren Fällung bei -20 °C gelagert und das Lösungsmittel nach Filtration unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc = 100:0 \rightarrow 30:0) lieferte **141** als transparentes Öl (2.61 g, 9.49 mmol, 66 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.58-5.53 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, 6-H), 5.37-5.30 (tq, $J = 7.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, 2-H), 4.57 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, 1-H₂), 3.95 (s, 2H, 8-H₂), 2.19-2.12 (m, 2H, 5-H₂), 2.10-2.07 (m,

2H, 4-H₂), 2.05 (s, 3H, 12-H₃), 1.74 (s, 3H, 9-H₃), 1.69 (s, 3H, 10-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.2 (C-11), 141.43 (C-3), 136.6 (C-7), 130.5 (C-6), 119.0 (C-2), 61.4 (C-1), 41.7 (C-8), 38.7 (C-4), 26.5 (C-5), 21.2 (C-12), 16.6 (C-10), 14.8 (C-9). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein. [109]

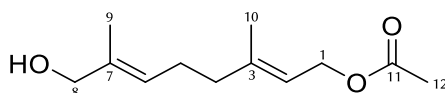
(2E,6E)-Geranylacetat (146)



Aus Geraniol (12.4 g, 80.3 mmol, 1.0 Äq.), Kaliumcarbonat (16.6 g, 120 mmol, 1.5 Äq.), 4-DMAP (98.0 mg, 0.80 mmol, 0.01 Äq.) wurde zunächst eine Suspension in EtOAc (100 mL) hergestellt. Dann erfolgte die Zugabe von Essigsäureanhydrid (12.3 g, 120 mmol, 1.5 Äq.) bevor die Suspension für 1 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Anschließend wurde diese filtriert und der Rückstand mit EtOAc gespült. Das Filtrat wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt und für 10 min gerührt, sodass bei weiterer Zugabe von NaHCO₃-Lösung keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Die Zielverbindung **146** (15.4 g, 78.6 mmol, 98%) wurde als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 2-H), 5.08 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, 6-H), 4.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 1-H), 2.14-2.01 (m, 4H, 4-H₂, 5-H₂), 2.05 (s, 3H, 12-H₃), 1.70 (s, 3H, 10-H₃), 1.68 (s, 3H, 8-H₃), 1.59 (s, 3H, 9-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.1 (C-11), 141.2 (C-3), 130.8 (C-7), 122.7 (C-6), 117.2 (C-2), 60.4 (C-1), 38.5 (C-4), 25.3 (C-5), 24.6 (C-8), 20.0 (C-12), 16.7 (C-9), 15.4 (C-10). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein. [110]

(2E,6E)-8-Hydroxygeranylacetat (147)



Zunächst wurde eine Suspension von SeO₂ (0.86 g, 7.73 mmol, 0.1 Äq.) und Salicylsäure (1.07 g, 7.75 mmol, 0.1 Äq.) in CH₂Cl₂ (300 mL) hergestellt. Diese wurde bei Raumtemperatur mit wässriger *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (70 %, 31 mL, 267 mmol, 3.5 Äq.) versetzt und 10 min gerührt. Es folgte die Zugabe von **146** (15.0 g, 76.4 mmol, 1.0 Äq.). Das Gemisch wurde 38 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eine NaHCO₃-Lösung zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt.

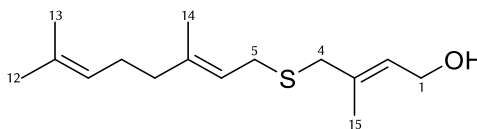
Das zurückgebliebene Öl wurde in Methanol (160 mL) aufgenommen und bei 0 °C langsam und portionsweise mit NaBH₄ (2.89 g, 76.4 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Nachdem 30 min bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden H₂O und MTBE zugegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Eine säulenchromato-

graphische Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc = 8:1 → 3:1) lieferte die Zielverbindung (147) als farbloses Öl (7.57 g, 35.7 mmol, 47 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 4.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 1-H₂), 3.93 (s, 2H, 8-H₂), 2.15-2.08 (m, 2H, 5-H₂), 2.06-2.01 (m, 2H, 4-H₂), 2.00 (s, 3H, 12-H₃), 1.65 (s, 3H, 10-H₃), 1.60 (s, 3H, 9-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.2 (C-11), 141.7 (C-3), 135.2 (C-7), 125.0 (C-6), 118.6 (C-2), 68.6 (C-8), 61.4 (C-1), 39.0 (C-4), 25.6 (C-5), 21.0 (C-12), 16.3 (C-10), 13.6 (C-9). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[110]

SYNTHESE VON FARNESOL-DERIVAT 139

(*E*)-4-[[(*E*)-7,11-Dimethylocta-6,10-dien-1-yl]thio]-3-methylbut-2-en-1-ol (139)

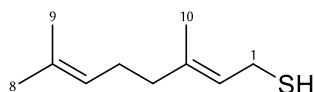


Zu einer Suspension aus Natriumhydrid (46.3 mg, 1.16 mmol, 1.2 Äq.) in DMF (10 mL) wurde bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre das Thiol 144 (214 mg, 1.26 mmol, 1.3 Äq.) gegeben. Zunächst wurde 15 min bei 0 °C gerührt, dann wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 15 min gerührt. Die Zugabe des Bromids 145 (0.2 mmol, 0.966 mmol, 1.0 Äq.) und TBAI (31 mg, 0.097 mmol, 0.1 Äq.) erfolgte ebenfalls bei 0 °C. Anschließend wurde für 18 h gerührt und das Gemisch dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ammoniumchloridlösung beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit MTBE extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde ein gelbes Öl erhalten, welches nach NMR-spektroskopischer Analyse direkt in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

Natriummethanolat (142 mg, 2.63 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C zu einer Lösung des zuvor erhaltenen Thioethers (780 mg, 2.63 mmol, 1.0 Äq.) in wasserfreiem Methanol (7 mL) gegeben. Das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumchlorid-Lösung (5 mL) beendet wurde. Nach Zugabe von MTBE wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc = 5:1) verblieb ein farbloses Öl (394 mg, 1.55 mmol, 55 % (über zwei Stufen)).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.55-5.48 (m, 1H, 2-H), 5.26-5.19 (m, 1H, 6-H), 5.12-5.05 (m, 1H, 10-H), 4.19 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, 1-H₂), 3.09 (s, 2H, 4-H₂), 3.06 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 5-H₂), 2.13-2.00 (m, 4H, 8-H₂, 9-H₂), 1.78 (s, 3H, 15-H₃), 1.68 (s, 3H, 12-H₃), 1.64 (s, 3H, 14-H₃), 1.60 (s, 3H, 13-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 139.0 (C-7), 135.5 (C-3), 131.7 (C-11), 126.5 (C-2), 124.0 (C-10), 120.4 (C-6), 59.4 (C-1), 40.2 (C-4), 39.6 (C-8), 28.7 (C-5), 26.5 (C-9), 25.7 (C-12), 17.7 (C-13), 16.2 (C-14), 15.3 (C-15); HRMS [ESI] *m/z* berechnet für C₁₅H₂₆OSNa [M+Na]⁺ 277.1602, gefunden 277.1605.

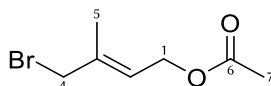
(E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-thiol (144)



Zu einer Lösung aus Bromid **149** (5.06 g, 23.3 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (12 mL) wurde Thioharnstoff (1.77 g, 23.3 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Das Gemisch wurde 3 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend erfolgte die Hydrolyse des Intermediats mit wässriger Natriumhydroxidlösung (10 %, 14 mL) für 5 h bei 80 °C. Nach Zugabe von Diethylether wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit HCl angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc = 50:1) wurde das Thiol **144** als farbloses Öl (6.39 g, 37.5 mmol, 54 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.37-5.31 (m, 1H, 2-H), 5.13-5.05 (m, 1H, 6-H), 3.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 1-H₂), 2.12-1.98 (m, 4H, 5-H₂, 4-H₂), 1.68 (s, 3H, 9-H₃), 1.65 (s, 3H, 10-H₃), 1.60 (s, 3H, 8-H₃), 1.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, S-H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 137.7 (C-3), 131.9 (C-7), 124.0 (C-6), 123.4 (C-2), 39.6 (C-4), 26.5 (C-5), 25.8 (C-9), 22.3 (C-1), 17.8 (C-8), 15.9 (C-10); GC-MS [EI] (8.045 min) *m/z* (%): 170 (9), 155 (34), 81 (14), 71 (11), 69 (100), 53 (12). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[111]

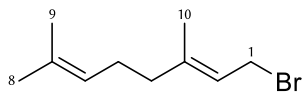
(E)-4-Bromo-3-methylbut-2-en-1-yl-acetat (145)



Zunächst erfolgte die langsame Zugabe von *N*-Bromsuccinimid (11.4 g, 63.9 mmol, 0.8 Äq.) bei 0 °C zu einer Lösung aus Isopren (8.0 mL, 79.9 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäure (34 mL). Das Gemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet wurde. Anschließend erfolgte die Extraktion mit CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, bevor sie über MgSO₄ getrocknet und filtriert wurden. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE/EtOAc = 100:0 → 80:1) wurde ein farbloses Öl (3.5 g, 16.9 mmol, 27 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.75-5.69 (m, 1H, 2-H), 4.60 (d, 2H, 1-H₂), 3.94 (s, 2H, 4-H₂), 2.06 (s, 3H, 7-H₃), 1.85-1.84 (m, 3H, 5-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.0 (C-6), 137.4 (C-3), 124.4 (C-2), 61.1 (C-1), 39.6 (C-4), 21.0 (C-7), 15.3 (C-5). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[112]

(E)-1-Bromo-3,7-dimethylocta-2,6-dien (149)



Zu einer Lösung aus Geraniol (3.60 g, 23.5 mmol, 1.0 Äq.) in wasserfreiem Diethylether (235 mL) wurde Phosphortribromid (0.75 mL, 7.8 mmol, 0.33 Äq.) langsam zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 1.5 h folgte eine erneute Zugabe von Phosphortribromid (0.75 mL, 7.8 mmol, 0.33 Äq.). Das Gemisch wurde für weitere 30 min gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von NaCl-Lösung beendet wurde. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde ein schwarzes Öl (5.06 g, 23.3 mmol, 99 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.56-5.5 (m, 1H, 2-H), 5.1-5.04 (m, 1H, 6-H), 4.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1-H₂), 2.15-2.03 (m, 4H, 4-H₂, 5-H₂), 1.73 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, 10-H₃), 1.68 (d, *J* = 0.86 Hz, 3H, 8-H₃), 1.60 (s, 3H, 9-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 143.8 (C-3), 132.2 (C-7), 123.7 (C-6), 120.7 (C-2), 39.7 (C-4), 29.9 (C-1), 26.4 (C-5), 25.8 (C-8), 17.9 (C-9), 16.1 (C-10). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[113]

5.4 Mikrobiologische Methoden

ORGANISMEN UND KULTIVIERUNG

Für Klonierungen wurde *Escherichia coli* TOP10 und zur heterologen Expression *Escherichia coli* BL21 (DE3) verwendet (Tabelle 29). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 180 – 200 Upm. Die Inokulation erfolgte mit mindestens 100 µL einer Vor-, Übernacht- oder Kryokultur oder einer Bakterienkolonie. Vor- und Übernachtskulturen wurden mit LB-Medium und Kanamycin (50 µg/mL) für 16 h inkubiert. Die Kultivierungsbedingungen der heterologen Expression sind in Kapitel 5.6 aufgeführt. Zur Stammhaltung von *E. coli* wurden aus Flüssigkulturen Kryokulturen mit 30% Glycerin angefertigt und bei –80 °C gelagert.

Tabelle 29: Verwendete Organismen mit Genotyp.

Organismus	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> TOP10 (Invitrogen AG/ Thermo Fisher Scientific, Inc.)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) (Novagen/Merck KGaA)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B - m _B -) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

TRANSFORMATION VON *ESCHERICHIA COLI*

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Zellen von *Escherichia coli* TOP10 oder *Escherichia coli* BL21 (DE3) auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden entweder 5 µL eines Ligationsansatzes, eines PCR-Ansatzes oder mindestens 100 ng gereinigte DNA gegeben. Das Gemisch wurde 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock 45 s bei 42 °C und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Es folgten die Zugabe von 300 µL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium sowie die Inkubation für 45 min bei 37 °C und 180 Upm. Danach wurden bis zu 150 µL des Transformationsansatzes auf eine LB-Agarplatte mit Kanamycin (50 µg/mL) zur Selektion aufgetragen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.5 Molekularbiologische Methoden

RESTRIKTIONSVERDAU

Bei Restriktionsenzymen vom Typ II handelt es sich um Endonukleasen, die DNA sequenzspezifisch erkennen und am Phosphatrückgrat spalten. Diese Fähigkeit wurde zur Herstellung geschnittener DNA-Fragmente für Klonierungen und zur Kontrolle der Ligation genutzt. Zur Klonierung von *penA* wurden die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Bam*HI von Thermo Fisher Scientific, Inc. verwendet. Weitere Klonierungen erfolgten mit *Nde*I und *Hind*III-HF von New England Biolabs, Inc. Die Restriktion des pET28a(+)-Vektors erfolgte jeweils in gleicher Weise, wie die Restriktion des Genfragments, mit welchem der Vektor ligiert werden sollte. Die Restriktionsansätze (s. Tabelle 30 und Tabelle 31) wurden 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel getrennt.

Tabelle 30: Ansätze für den Restriktionsverdau von *penA*-Konstrukten.

Reagenzien	Testrestriktion	Präparativer Ansatz
DNA	5 µL	50 µg
<i>Bam</i> HI-Puffer (10×)	2 µL	10 µL
<i>Hind</i> III (10 U/µL)	0.7 µL	6 µL
<i>Bam</i> HI (10 U/µL)	0.3 µL	3 µL
H ₂ O	12 µL	<i>ad</i> 100 µL

Um größere Mengen des geschnittenen Fragments für eine anschließende Ligation herzustellen, wurde ein präparativer Ansatz verwendet. Nach 2 h Inkubation wurde dieser unter vermindertem Druck auf ein Drittel des Ursprungsvolumens eingengt, bevor die Fragmente im Agarosegel getrennt und anschließend extrahiert worden sind.

Tabelle 31: Ansätze für den Restriktionsverdau von *tri5-*, *cop4-*, *bot2-*, *gcoA-*, *cyc1-*, *tps32-* und *hvs1*-Konstrukten.

Reagenzien	Testrestriktion	Präparativer Ansatz
DNA	5 µL	50 µg
<i>Cut</i> Smart-Puffer (10×)	2 µL	10 µL
<i>Hind</i> III-HF (20 U/µL)	1 µL	5 µL
<i>Nde</i> I (20 U/µL)	1 µL	5 µL
H ₂ O	11 µL	<i>ad</i> 100 µL

LIGATION

Die Ligation diente der Integration der nach präparativem Restriktionsverdau der pUC57-Plasmide erhaltenen Genfragmente in pET28a(+). Dafür verknüpft die T4-Ligase das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der DNA-Fragmente unter Ausbildung einer Phosphordiesterbindung. Die Insertmenge wurde so angepasst, dass das molare Vektor-Insert-Verhältnis 1:5 beträgt. Die genaue Zusammensetzung der Ligationsansätze ist in Tabelle 32 aufgelistet. Die Ligationsansätze wurden bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. In einigen Fällen wurde eine Vektorkontrolle mitgeführt, bei der H₂O das Insert ersetzte.

Tabelle 32: Zusammensetzung der verwendeten Ligationsansätze.

Zusammensetzung	
Insert	fünffache molare Vektormenge
Vektor	50 ng
T4-Puffer (10×)	10 µL
T4-Ligase (5 U/µL)	0.2 µL
H ₂ O	ad 20 µL

PLASMIDISOLIERUNG

Eine Minipräparation mit anschließendem Restriktionsverdau wurde zur Kontrolle der Ligation bzw. zum Screening nach positiven Kolonien im Anschluss an die Transformation durchgeführt. Zur Bereitstellung von größeren Mengen DNA, z. B. für Klonierungsarbeiten, erfolgte eine Midipräparation.

Minipräparation

Für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab bedurfte es zunächst der Zentrifugation von 2 mL einer Übernachtskultur für 1 min bei 10000 Upm sowie der Resuspendierung des resultierenden Zellpellets in 200 µL Lösung 1 und 5 µL RNase (100 µg/mL). Anschließend wurden 200 µL Lösung 2 zugegeben und das Gemisch mehrfach invertiert. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 200 µL Lösung 3 sowie zwei Tropfen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, Carl Roth GmbH & Co. KG), die erneute Inversion und zuletzt die Zentrifugation 5 min bei 13000 Upm. Die obere Phase wurde in 350 µL Isopropanol gegeben und die DNA durch Zentrifugieren für 30 min bei 4 °C und 13000 Upm gefällt. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, unter verminderten Druck für 30 min bei 45 °C getrocknet und in 20 µL H₂O gelöst.

Midipräparation

Die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA erfolgte aus einer 50 mL Übernachtskultur. Diese wurde für 10 min bei 5000 ×g zentrifugiert, das Zellpellet in 3 mL Lösung 1 resuspendiert und 50 µL RNase (100 µg/mL) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Dann wurden 6 mL Lösung 2 zugegeben und die Inkubation bei Raumtemperatur wiederholt. Es folgten die Zugabe von 4.5 mL Lösung 3 und 2 mL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, Carl Roth GmbH & Co. KG) und, nach gründlichem Vermengen, die Zentrifugation bei 10000 ×g für 10 min. Die obere Phase wurde abgenommen und in 10 mL Isopropanol gegeben. Die DNA-Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei 4 °C und 10000 ×g. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und 2 – 3 h bei 60 °C getrocknet. Die DNA wurde in 500 µL H₂O gelöst und bei –20 °C gelagert.

METHODEN DER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient dem Nachweis und der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Da diese ein 3'-Hydroxy-Ende benötigt, um mit der DNA-Synthese zu beginnen werden zudem zwei kurze, einzelsträngige DNA-Fragmente (Primer), die komplementär zu den Grenzen des zu amplifizierenden Bereichs sind, verwendet. Zunächst wird die Ausgangs-DNA (Templat) bei 95 °C geschmolzen (Denaturierung), um die Trennung der DNA-Stränge zu bewirken. Durch Temperatursenkung kommt es zu einer Anlagerung der Primer an komplementäre Bereiche,

gefolgt von der Elongation der Primer am 3'-Hydroxy-Ende durch die DNA-Polymerase. Die Elongation erfolgt je nach gewählter DNA-Polymerase etwa bei 70 °C. Es folgen meist 30 Zyklen aus Denaturierung – Anlagerung – Elongation zur Erzeugung von beiden Stränge der Zielsequenz (Amplifikat).

Kolonie-PCR

Zur Kontrolle der Ligation von *cyc1*, *tps32* und *hvs1* mit pET28a(+) wurde statt eines Restriktionsverdau eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde auf eine DNA-Polymerase sowie dem zugehörigen Puffer von New England Biolabs, Inc. zurückgegriffen (Tabelle 33). Zunächst wurden Puffer und Wasser mit einer Bakterienkolonie der Selektionsplatte inokuliert und zum Zellaufschluss 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der restlichen Bestandteile. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 47 (Kapitel 7.2) aufgeführt. Für die Negativkontrolle wurde auf die Inokulation mit Bakterien verzichtet, während der Positivkontrolle das gereinigte Plasmid penA-pET28a(+) zugefügt wurde. Das Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR ist in Tabelle 34 notiert.

Tabelle 33: Bestandteile der Kolonie-PCR.

Zusammensetzung	
5x OneTaq-Standardpuffer	5 µL
dNTPs [10 nM]	0.5 µL
RP-Primer [10 µM]	0.5 µL
T7minus-Primer [10 µM]	0.5 µL
OneTaq DNA-Polymerase	0.125 µL
H ₂ O	18.375 µL

Tabelle 34 Temperaturprogramm der Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	30 s
Denaturierung	94 °C	30 s
Anlagerung	45 °C	30 s
Elongation	68 °C	90 s
<i>Wiederholung von Schritten 2-4 in 30 Zyklen</i>		
Finale Elongation	68 °C	5 min

Gezielte Mutagenese (*Site-Directed Mutagenesis*)

Zur Erzeugung von verschiedenen Mutanten wurde eine zielgerichtete *DpnI*-Mutagenese durchgeführt. Dabei wird ein Plasmid mit dem zu verändernden Gen mittels PCR amplifiziert, wobei zueinander komplementäre Primer verwendet werden, welche im mittleren Bereich bereits die einzuführende Mutation tragen, so dass diese in die neu gebildeten Plasmide eingebaut wird. Da die Expression der Mutanten ebenfalls mit pET28a(+) stattfinden sollte, wurden die zuvor erstellen Konstrukte penA-pET28a(+), tri5-pET28a(+) und cop4-pET28a(+) als Template verwendet. Die Bestandteile der PCR-Ansätze sind in Tabelle 35 aufgelistet.

Tabelle 35: Bestandteile der PCR.

Zusammensetzung	
5x HF Puffer (New England Biolabs, Inc.)	4 µL
dNTPs [10 nM]	0.4 µL
DNA [4 µg/µL]	0.2 µL
Vorwärts-Primer [10 µM]	1 µL
Rückwärts-Primer [10 µM]	1 µL
Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs, Inc.)	0.2 µL
DMSO	0.5 µL
H ₂ O	12.7 µL

Da die Primer zueinander komplementär sind, ist die Wahrscheinlichkeit zur Entstehung von Primerdimeren deutlich erhöht, weshalb eine Gradienten-PCR mit jeweils neun Ansätzen bei

verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt wurde. Die Sequenz der verwendeten Primer, welche zur Einführung der Mutation dient, findet sich in Tabelle 48 (Kapitel 7.2), das verwendete Temperaturprogramm und der Annealingtemperaturgradient finden sich in Tabelle 36. Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte, um die erfolgreich amplifizierten Plasmide zu identifizieren. Die positiven Ansätze wurden nun mit 0.5 µL *DpnI* versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Diese Behandlung mit dem TypII-Restriktionsenzym *DpnI* dient dem Verdau der Template-DNA, welche die gewünschte Mutation nicht enthält und benötigt keinen Zusatz weiterer Puffer oder Reagenzien, da das Enzym in dem verwendeten PCR-Puffer aktiv ist.

Tabelle 36: Temperaturprogramm der PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Anlagerung	Gradient	15 s
Extension	72 °C	3 min
<i>Wiederholung von Schritten 2-4 in 15 Zyklen</i>		
Finale Extension	72 °C	10 min

Gradient:

- 59,0 °C
- 61,2 °C
- 62,8 °C
- 64,3 °C
- 65,7 °C
- 67,3 °C
- 68,9 °C
- 70,3 °C
- 71,9 °C

DpnI ist in der Lage, die von *E. coli* mit Methylgruppen markierte DNA zu erkennen und schneidet diese am weit verbreiteten GATC-Motiv. Die neu amplifizierten und mutierten Plasmide, welche während der PCR hergestellt wurden, enthalten hingegen keine Methylierung und bleiben erhalten. Im Anschluss wurden 5 µL des verdauten PCR-Ansatzes für die Transformation von *E. coli* TOP 10 verwendet, welche nun das mutierte Gen enthalten und den verbleibenden Einzelstrangbruch im Plasmid reparieren.

AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Zur Separation von DNA-Fragmenten wurde ein 0.8-1 %iges Agarosegel mit 1×TAE-Puffer verwendet. Als Größenstandards diente *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* von Thermo Fisher Scientific, Inc. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6× Ladepuffer vermischt. Der Gellauf erfolgte 40-60 min bei 100 V.

REINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Durch Restriktionsverdau entstandene DNA-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und daraus extrahiert. Dafür wurde das *NucleoSpin Gel und PCR Clean up Kit* von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG nach Herstellerangaben mit optimiertem Protokoll verwendet. Dieses beinhaltet eine Ausdehnung aller Zentrifugationsschritte auf 1 min bei 11000 ×g sowie die Zugabe von 133 µL Isopropanol zusätzlich zum Bindepuffer zu je 100 mg Gel. Dieses Gemisch wurde bei 50 °C und 300 U_{pm} für etwa 10 min inkubiert und zwischendurch mehrfach invertiert, bis das Gel vollständig geschmolzen war. Anschließend wurde das Gemisch auf eine im Kit enthaltene Silika-Säule aufgetragen, die Säule gewaschen, zum Trocknen zweimal zentrifugiert und dann für 5 min bei 60 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µL Elutionspuffer (60 °C) auf die Säule und Inkubation

für 5 min bei Raumtemperatur. Die Elution der DNA wurde zur Erhöhung der Ausbeute ggf. ein zweites Mal wiederholt.

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA

Die Konzentrationsbestimmung von isolierter Plasmid-DNA erfolgte spektrophotometrisch mit dem DS-11+ Spectrophotometer. Dabei wurden stets 1 μL der Probe appliziert, anhand deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des LAMBERT-BEER'sche Gesetzes die Konzentration ermittelt wurde.

DNA-SEQUENZIERUNG

Zur Verifizierung der erzeugten Konstrukte erfolgte eine Sequenzierung durch Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 47 zu finden (Kapitel 7.2). Die Auswertung erfolgte durch Sequenzvergleich und Sichtung der Chromatogramme.

5.6 Proteinbiochemische Methoden

HETEROLOGE EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

Die heterologe Expression der STCn erfolgte in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Dieser Stamm enthält im Genom ein Gen für die T7-Polymerase, welches vom *lacUV5*-Promotor reguliert wird. Zudem sind die Proteasen Lon und OmpT inaktiviert, um rekombinante Proteine vor Degradierung zu schützen.

Für die Hauptkultur wurden 25 – 100 mL 2TY-Medium mit 2 % einer Vorkultur inokuliert. Letztere war zuvor 5 h bei 37 °C und 180 – 200 Upm inkubiert worden. Die Hauptkultur wurde ebenfalls bei 37 °C und 180 – 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Dann erfolgte die Induktion mit 0.5 mM IPTG. Dabei handelt es sich um ein Galactosederivat, welches ebenso wie Laktose zur Induktion des *lacUV5*-Promotors fähig ist, im Gegensatz dazu jedoch nicht abgebaut wird. Die Induktion bewirkt die Expression der T7-Polymerase, welche nun wiederum Gene transkribieren kann, die von einem T7-Promotor reguliert werden. Da es sich dabei um einen Phagen-Promotor handelt, befinden sich im Genom von *E. coli* keine Gene, die von der T7-Polymerase transkribiert werden,^[114] allerdings reguliert ein solcher die STCn-Gene in pET28a(+). Diese werden somit nach Induktion mit IPTG exprimiert. Die Hauptkultur wurde bei 16 °C und 180 – 200 Upm für etwa 22 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 5000 ×g und gegebenenfalls ein Zellaufschluss. Zunächst nicht benötigte Kulturen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Zur Kontrolle der Expression wurden vor der Induktion mit IPTG sowie nach 22-stündiger Kultivierung Proben von je 1 mL aus der Hauptkultur entnommen. Die Zentrifugation der Proben erfolgte für 1 min bei 10000 ×g. Das Pellet wurde direkt zur Verwendung für eine SDS-PAGE vorbereitet und bei –20°C gelagert.

DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Zur Separation denaturierter Proteine nach ihrer Masse wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dafür fanden ein 5-%iges Sammelgel ein 15-%iges Trenngel Verwendung (Tabelle 37). Die unterschiedlichen pH-Werte und Pufferstärken der Gele bewirken eine Konzentration der Proteinbanden an der Grenze zum Trenngel und verbessern somit die Separation der Banden.

Tabelle 37: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Zusammensetzung	Trenngel (15 %, 10 mL)	Sammelgel (5 %, 5 mL)
30 %iger Acryl-Bisacryl-Mix	5 mL	0.83 mL
1.5 M TRIS-Base	2,5 mL (pH 8.8)	0.63 mL (pH 6.8)
SDS	0.1 %	0.05 %
APS	0.1 %	0.05 %
TEMED	4 µL	5 µL

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei fixierte Glasscheiben gegossen und nach dessen Polymerisation mit dem Sammelgel überschichtet. Sobald dieses auch polymerisiert war, konnte das Gel in die vertikale Gelelektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt werden. Die Proben wurden mit 100 – 200 µL Lämmli-Puffer versetzt und 10 min auf 95 °C erhitzt. Als Größenstandard fand *Color Prestained Protein Standard* von New England Biolabs, Inc. Verwendung. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst 20 min bei 100 V und dann 100 min bei 150 V. Anschließend wurde das Gel 1 h mit Coomassie-Färbelösung und nachfolgend 4 h mit Entfärbelösung behandelt.

ULTRASCHALL-ZELLAUFSCHLUSS

Zum Zellaufschluss durch Ultraschall wurden die Zellpellets in 1 mL Lysispuffer pro 100 mg Pellet resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte für zehn Minuten bei einer Amplitude von 45 % und mit je 30 s Pause pro Minute. Es folgte die Abtrennung der unlöslichen Zelltrümmer vom Zelllysate durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 10000 ×g.

PROTEINREINIGUNG MITTELS IMMOBILISIERTE-METALLIONEN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die Reinigung der im Zelllysate gelösten STCn erfolgte mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), da die Proteine aufgrund der Expression in pET28a(+) einen 6×His-Tag besitzen, der an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) bindet.

Manuelle Säulenchromatographie

Zur manuellen Reinigung fand eine Säule mit 2 mL Protino® Ni-NTA-Agarose in Ethanol von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Verwendung. Zunächst wurde die Säule mit 10 mL Lysispuffer äquillibriert und dann das Lysat zweimal über die Säule gegeben. Das Eluat des zweiten Durchgangs wurde als Fraktion „Durchfluss“ aufgefangen. Es folgten mehrere Wasch- und Elutionsschritte, bei denen jeweils 5 mL Lysispuffer mit steigender Imidazolkonzentration Verwendung fanden. Zunächst wurde zweimal mit 25 mM Imidazol, dann einmal mit 50 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Imidazol, 250 mM Imidazol und 500 mM Imidazol in Lysispuffer.

Zur Überprüfung der Proteinkonzentrationen wurden ein Bradford-Assay oder eine spektrophotometrische Messung durchgeführt. Zudem wurden aus jeder Fraktion 100 µL als Probe für eine SDS-PAGE entnommen und mit 50 µL LÄMMLI-Puffer versetzt. Nachdem mittels SDS-PAGE festgestellt worden war, dass sich die Reinigungsstrategie als geeignet erwies, konnten die Wasch- und Elutionsschritte für spätere Reinigungen des jeweiligen Proteins soweit verkürzt werden, dass nur noch zwei Waschschrirte mit 25 mM Imidazol bzw. 50 mM Imidazol und eine Elution mit 250 mM Imidazol nötig waren.

FPLC (*fast protein liquid chromatography*)

Zur Reinigung von mehr als 10 mL Lysat wurde eine FPLC-Apparatur mit einer HisTrap FF-Säule (GE Healthcare AB, 5 mL Bettvolumen) und einem Probenreservoir (50 mL Volumen) verwendet. Dafür erfolgte der Zellaufschluss in einem imidazolhaltigen (25 mM) Lysepuffer, um die unspezifische Bindung von Proteinen an der Säule zu unterbinden. Vor der Applikation wurden die nach der Zentrifugation verbliebenen, unlöslichen Zellbestandteile mithilfe eines 0.45 µm-Filters vom Lysat abgetrennt. Ebenso wie bei der manuellen Reinigung wurde die Säule nach der Probenapplikation zunächst mit Imidazol-Lösung (25 mM) gewaschen, um unerwünschte Proteine zu entfernen. Dann folgte die Elution mit einem linearen Gradienten bis zu einer Imidazolkonzentration von 500 mM. Die gesamte Prozedur (Tabelle 38) wurde bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ durchgeführt.

Tabelle 38: Wasch- und Elutionsprogramm mit linearem Gradienten zur Proteinreinigung mittels FPLC-Apparatur. x = Durchflussvolumen bis die UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm) einen Wert unter 50 mAU aufweist.

Durchflussvolumen [mL]	Waschpuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
x	100	0
$x + 25$	0	100
$x + 30$	0	100
$x + 35$	100	0
$x + 40$	100	0

KONZENTRIEREN VON PROTEINLÖSUNGEN

Um die Konzentration der Proteine in einer Proteinlösung zu erhöhen, wurde diese bis auf 0.5 – 1.5 mL mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 Zentrifugalfilter von Merck KGaA mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa eingengt und das Filtrat verworfen.

PUFFERAUSTAUSCH

Um den Lysispuffer gegen einen für den Enzymtest geeigneten Puffer auszutauschen fand eine PD-10 Entsalzungssäule mit Sephadex G-25 Medium von GE Healthcare AB Verwendung. Diese wurde zunächst mit 20 mL Reaktionspuffer äquillibriert und anschließend die Proteinlösung aufgetragen, deren Elution durch 3.5 mL Reaktionspuffer erfolgte und ggf. in mehreren Fraktionen gesammelt wurde. Zur Regeneration wurde die Säule mit 20 mL H₂O gewaschen und mit 20%-igem Ethanol gelagert.

BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Bradford-Assay

Zur Feststellung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde zunächst eine 1:40 Verdünnung hergestellt. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung. Dafür wurden jeweils 50 μ L der Verdünnung mit 200 μ L 1 \times Roti-Nanoquant versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 590 nm und 450 nm. Anschließend wurde der Durchschnitt der Proben ermittelt. Als Referenz diente eine BSA-Standardverdünnungsreihe, welche nach dem gleichen Verfahren präpariert und gemessen wurde.

UV/VIS-Spektroskopie

Einfacher, schneller und weniger störanfällig als der Bradford-Assay erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie. Dabei wurde mittels Spektrophotometer die Absorption von 1 μ L gereinigter Proteinlösung bei 280 nm ermittelt. Der mit Hilfe des ProtParam *tools* (ExPASy^[107]) bestimmte Extinktionskoeffizient des Proteins ohne Disulfidbrücken (Kapitel 7.1) wurde zur Ermittlung der Konzentration verwendet.

5.7 Analytische *in vitro* Enzymtests

ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR ANALYTISCHE *IN VITRO* ENZYMTESTS

In vitro Enzymtests im 500- μ L-Maßstab wurden zur Feststellung der Proteinaktivität bzw. der Akzeptanz und Transformation eines allylischen Pyrophosphats durchgeführt. Dafür fanden DTT-haltige Reaktionspuffer (Tabelle 22) Verwendung. Zur Durchführung wurden mittels IMAC gereinigte und im entsprechenden Puffer vorliegende STC (0.01 g/L) mit FPP (8, 2 – 150 μ M) oder einem seiner Derivate (155a-c, 156a-c oder 201-205, 150 μ M) für 30 min inkubiert. Initiale Enzymtests fanden stets bei 37 °C statt, während die Temperatur zur Optimierung des Umsatzes im späteren Verlauf variiert wurde. Als Negativkontrollen dienten analoge Ansätze in Abwesenheit des FPP-Derivats oder der STC. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von 100 μ L *n*-Hexan, Durchmischen für 30 s auf dem Vortexmischer und Zentrifugation für 30 s bei 8000 Upm und 4 °C. Anschließend wurde die organische Phase abgenommen, mittels Gaschromatographie separiert und massenspektrometrisch untersucht.

SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG VON AUSBEUTEN

Die Bestimmung der Ausbeute von analytischen Enzymtests erfolgte semiquantitativ zur Optimierung der Biotransformation oder zur Ausbeutebestimmung bei verschiedenen Substraten unter Verwendung von β -Caryophyllen (94) oder Farnesol (8) als internen Standard. Dafür wurden analytische *in vitro* Enzymtests mit einem Volumen von 0.5 – 1 mL mit 100 μ L *n*-Hexan extrahiert. Davon wurden für die GC-FID-Messung 60 μ L entnommen und mit internem Standard (1 – 2 μ L, 200 ppm – 400 ppm) versetzt. Durch Integration der Peakflächen des FID-Chromatogramms, wurde mit Hilfe eines molaren Responsefaktors die injizierte Stoffmenge ermittelt, woraus auf die Ausbeute der Biotransformation geschlossen werden konnte. Anhand von Dreifach- oder Vierfachbestimmungen wurde die Standardabweichung ermittelt. Deutliche Ausreißer wurden aus der Quantifizierung ausgeschlossen, weshalb in einigen Fällen auf die Angabe einer Standardabweichung verzichtet wurde.

OPTIMIERUNGSEXPERIMENTE

Die Optimierung der Biotransformation erfolgte mit den Sesquiterpencyclasen Tps32, Cop4 und GcoA. Dafür wurden Enzymtests entsprechend der allgemeinen Vorschrift durchgeführt, während verschiedene, zu optimierenden Bedingungen variiert wurden. Dementsprechend erfolgten die Tests in einem Volumen von 500 μ L mit einer Inkubationszeit von 30 min. Sofern nicht anders angegeben wurden 150 μ M FPP (8), 0.01 g/L Enzym, 5 mM MgCl₂ und eine Inkubationstemperatur von 30 °C verwendet. Die Extraktion und Probenvorbereitung erfolgte entsprechend der semiquantitativen Bestimmung von Ausbeuten.

Temperaturoptimierung und Enzymstabilität

Zunächst erfolgte die Optimierung der Temperatur für die Biotransformation mit GcoA. Dabei wurden Temperaturen von 20 bis 40 °C getestet. Die Optimierung mit Tps32 und Cop4 hingegen wurde auf drei Temperaturen beschränkt: 25 °C, 30 °C und 37 °C. Zudem erfolgte die Temperaturoptimierung mit Cop4 nur mit 50 μ M FPP (8), während für Tps32 und GcoA 150 μ M des Substrats verwendet wurden.

Da initiale Versuche zur semipräparativen Biotransformation zu einer Enzympräzipitation führten, wurden verschiedene Temperaturen und Schüttelfrequenzen getestet, um diese zu verringern. Dafür wurden Tps32, GcoA und Cop4 für 2 – 3 h unter den in Tabelle 39 angegebenen Bedingungen inkubiert. Die Bewertung hinsichtlich der Enzympräzipitation erfolgte visuell.

Tabelle 39: Testbedingungen zur Stabilitätsprüfung von Cop4, Tps32 und GcoA.

Enzym [konz.]	Temperatur r	Schüttelfrequenz z	Volumen	Puffer
Cop4 [0.03 g/L]	30 °C	150 Upm	60 mL	TRIS (pH 8.0) mit 0.01 % Tween® 20
	25 °C			
Tps32 [0.02 g/L]	30 °C	120 Upm	100 mL	HEPES (pH 7.5) mit 0.01 % Tween® 20
	37 °C			
	37 °C	60 Upm		
GcoA [0.03 g/L]	25 °C	70 Upm	100 mL	HEPES (pH 7.5) mit 0.01 % Tween® 20
	30 °C			

Zudem wurden Cop4, GcoA und Tps32 über mehrere Stunden bei 30 °C gelagert und der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität untersucht. Die anschließenden Enzymtests mit Cop4 erfolgten mit 25 µM FPP, wobei Cop4 zuvor bis zu 4 h bei 30 °C gelagert wurde. Tps32 und GcoA hingegen wurden mit 10 µM FPP getestet und die Enzyme zuvor bis zu 6 h bei 30 °C gelagert.

pH-Wert

Die pH-Wert-Optimierung erfolgte für GcoA in einem Bereich von pH 6.2 – 10 mit 150 µM FPP und für Cop4 in einem Bereich von pH 5 – 10 mit 20 µM FPP (Tabelle 40). Lediglich die Tests mit Cop4 bei pH 7.5 und 8.0 wurden mit 30 µM FPP durchgeführt.

Tabelle 40: Verwendete Puffer zur Optimierung des pH-Werts. Bei temperaturabhängigen Systemen wurde der Puffer bei 30 °C eingestellt.

pH-Wert	Puffer [konz.]
5.0	Natriumacetat [10 mM]
6.0	MES [50 mM]
6.2	PIPES [50 mM]
6.7	PIPES [50 mM]
7.0	PIPES [50 mM]
7.5	HEPES [50 mM]
8.0	TRIS-HCl [50 mM]
8.5	TRIS-HCl [50 mM]
10.0	CAPS [10 mM]

Substratkonzentration

Die Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration auf die Ausbeute erfolgte mit Cop4, PenA und GcoA bei 30 °C mit 5 mM MgCl₂. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 41 vermerkt. Da geringe Konzentrationen zu hohen Standardabweichungen führten, flossen die Ergebnisse der Substratkonzentrationen unter 10 µM jedoch nur bedingt in die Auswertung ein.

Tabelle 41: Mit Cop4, GcoA und Tps32 getestete Substratkonzentrationen. Testergebnisse bei Verwendung von weniger als 10 µM FPP erwiesen sich für das Testsystem als ungeeignet.

Enzyme	FPP-Konzentration [µM]					
Cop4	5	10	25	50		
GcoA		10	25	50	75	150
Tps32	2	5	10	25	50	150

STC- und Mg-Konzentration

Die Optimierung der STC- und Mg-Konzentration erfolgte parallel. Bei hohen Proteinkonzentrationen besteht jedoch die Gefahr, dass sich die Produkte an hydrophobe Bereiche denaturierter Enzyme anlagern und somit die ermittelte Ausbeute negativ beeinflussen und die Ergebnisse verzerren. Daher wurde den Enzymtests nach 20 min Inkubation die Proteinase K von *Tritirachium album* (200 µg/mL, Sigma Aldrich) sowie CaCl₂ (1 mM) als Cofaktor zugesetzt bevor für weitere 20 min inkubiert wurde. Für die Enzymtests mit GcoA und Tps32 wurden 10 µM FPP (8) verwendet, während mit Cop4 25 µM FPP genutzt wurden. Die Enzymkonzentrationen betragen 0.01 g/L und 0.05 g/L, wobei mit GcoA und Cop4 zusätzlich 0.2 g/L STC getestet wurden. Parallel dazu wurde der Einfluss des Cofaktors anhand verschiedener Mg-Konzentrationen (5 mM, 10 mM, 25 mM und 50 mM) untersucht.

KOINJEKTIONSEXPERIMENTE

Zum Vergleich der durch Biotransformationen entstandenen Produkte wurden jeweils zwei Extrakte analytischer Enzymtests, deren Produkte das gleiche Fragmentierungsmuster bei ähnlicher Retentionszeit aufweisen, so vereint, dass die Produkte zu gleichen Teilen vorliegen. Die Analytik dieser Gemische erfolgte ebenfalls mittels GC-MS.

5.8 Präparative Biotransformationen

VORARBEITEN

Verbesserung der Löslichkeit

Zur Verbesserung der Löslichkeit der Bestandteile enzymkatalysierter Reaktionen wurden verschiedene Zusätze (Tabelle 42) getestet. Dafür wurde TRIS- bzw. HEPES-Puffer (500 μ L) mit dem jeweiligen Zusatz und FPP (8, 1.5 mM) vermischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von $MgCl_2$ (10 mM) und die Inkubation bei Raumtemperatur für 3 h. Die Beurteilung der Löslichkeit erfolgte visuell durch Vergleich der Trübung.

Tabelle 42: Getestete Zusätze zur Verbesserung der Löslichkeit von FPP.

Zusatz	Konzentrationen				
Glycerin	2 %	5 %	10 %	15 %	20%
DMSO	2 %	5 %	10 %		
Tween® 20	0.02 %	0.05 %	0.1 %		
Tween® 80			0.1 %		
Triton™ X-100			0.1 %		

Anschließend wurden analytische Enzymtests mit 20 % Glycerin, 10 % DMSO bzw. 0.02 % der Detergentien durchgeführt, um dessen Einfluss auf die Biotransformation zu ermitteln.

Pyrophosphatase

Der Einfluss einer Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* (0.2 U, Sigma Aldrich) auf die Biotransformation von FPP (8) wurde mit Hilfe von analytischen Enzymtests bei pH 7.5 und 25 °C getestet. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz in Abwesenheit der STC verwendet, während für die Positivkontrolle ein Enzymtest unter Standardbedingungen (37 °C, ohne Pyrophosphatase) Verwendung fand.

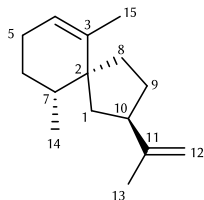
Entfernung des Lösungsmittels

Zur Entfernung des bei der Extraktion verwendeten Lösungsmittels erfolgten Modellversuche unter Verwendung von β -Caryophyllen (94, 20 mg) in *n*-Pentan (20-25 mL). Diese umfassten die Evaporation am Rotationsverdampfer bei 850 mbar und 40 °C, Kugelrohrdestillationen bei 43 °C und 60 °C sowie eine Destillation mit Vigreuxkolonne bei 45 °C, bei der final CH_2Cl_2 zugegeben wurde, um eine Koevaporation des restlichen *n*-Pentans zu ermöglichen. Außerdem erfolgten Versuche, bei denen nur 70 – 80 % des *n*-Pentans am Rotationsverdampfer entfernt und das verbleibende Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom verdampft wurde. Letzteres wurde sowohl bei Raumtemperatur als auch bei –5 °C durchgeführt. Das Destillat wurde stets in einer Kühlfalle aufgefangen. Die Bewertung der *n*-Pentan-Evaporation erfolgte anhand der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie des zurückgebliebenen β -Caryophyllens, sowie durch GC-MS Analyse des Destillats.

ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR BATCHREAKTIONEN MIT TPS32

Tps32 wurde nach der Expression in *E. coli* BL21 (DE3) mittels Ultraschallzellaufschluss und IMAC isoliert und gereinigt. Anschließend erfolgte ein Pufferwechsel, um das Enzym in HEPES-Puffer zu überführen. Biotransformationen mit Tps32 wurden als Batchprozess mit FPP (**8**) und den beiden etherfunktionalisierten Analoga **155a** und **156a** durchgeführt und erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50 – 60 mL. Erst nachdem HEPES-Puffer (pH 7.5) mit Tween® 20 (0.05 – 0.1 %), dem Substrat (1.5 mM) und Tps32 (0.5 g/L) vermischt worden war, erfolgten die Zugabe von MgCl₂ (10 mM) und der Pyrophosphatase (1 U). Das Gefäß wurde dicht verschlossen und 3 – 4 h bei 25 °C und 130 Upm inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von CaCl₂ (1 mM) und Proteinase K aus *Tritirachium album* (3 mg, Sigma Aldrich) sowie die erneute Inkubation für 1 h bei 37 °C und 130 Upm. Das Gemisch wurde mit *n*-Pentan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und zunächst bei 40 °C und unter vermindertem Druck (900 mbar) eingengt, bevor das verbliebene Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom entfernt wurde.

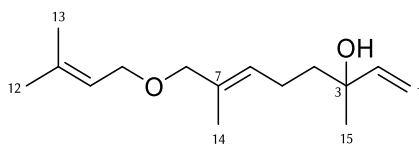
Vetispiradien (**34**)



Die Transformation von FPP (**8**, 34.0 mg, 78.0 µmol, 1.0 Äq) mittels Tps32 erfolgte in einem Gesamtvolumen von 60 mL mit Tween® 20 (0.1 %) für 3 h und lieferte eine helle, wachsartige Substanz (5 mg, 24.5 µmol, 31 %) als Rohprodukt.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.32-5.27 (m, 1H, 4-H), 4.74 (m, 1H, 12-H_a), 4.70 (m, 1H, 12-H_b), 2.54-2.43 (m, 1H, 10-H), 2.09-1.98 (m, 1H, 5-H_a), 1.92-1.87 (m, 1H, 5-H_b), 1.87-1.80 (m, 1H, 9-H_a), 1.78-1.72 (m, 2H, 6-H_a, 1-H_a), 1.77-1.69 (m, 1H, 8-H_a), 1.76 (br s, 3H, 13-H₃), 1.71-1.66 (m, 1H, 7-H), 1.70-1.68 (m, 3H, 15-H₃), 1.63-1.54 (m, 1H, 8-H_b), 1.59-1.52 (m, 1H, 9-H_b), 1.58 (m, 1H, 1-H_a), 1.46-1.41 (m, 1H, 6-H_b), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 14-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 148.6 (C-11), 139.3 (C-3), 120.9 (C-4), 108.1 (C-12), 48.4 (C-2), 46.8 (C-10), 43.8 (C-1), 37.7 (C-7), 34.0 (C-8), 32.8 (C-9), 27.0 (C-6), 21.9 (C-5), 21.2 (C-13), 20.1 (C-15), 14.8 (C-14); GC-MS [EI], *m/z* (%): 204 (50), 189 (40), 161 (64), 119 (82), 107 (100), 93 (85), 91 (87), 79 (73). Die Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[115]

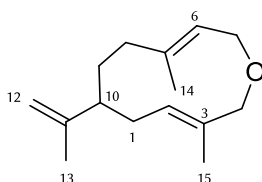
Biotransformationsprodukt 160



Die Transformation von **155a** (33.0 mg, 73.0 μmol , 1.0 Äq.) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 mL mit Tween® 20 (0.05 %) für 3.5 h und lieferte eine helle, wachsartige Substanz (3.0 mg, 13.0 μmol , 18 %) als Rohprodukt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.94 (dd, $J = 17$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, 2-H), 5.45-5.38 (m, 1H, 6-H), 5.32-5.24 (m, 1H, 10-H), 5.22 (dd, $J = 3$ Hz, $J = 17$ Hz, 1H, 1-H_a), 5.08 (dd, $J = 3$ Hz, $J = 10$ Hz, 1H, 1-H_b), 3.88 (d, $J = 6.90$ Hz, 2H, 9-H₂), 3.82 (s, 2H, 8-H₂), 2.23-2.12 (m, 1H, 5-H_a), 2.12-2.02 (m, 1H, 5-H_b), 1.74 (s, 3H, 12-H₃), 1.66 (s, 3H, 13-H₃), 1.65 (s, 3H, 14-H₃), 1.65-1.54 (m, 2H, 4-H₂), 1.29 (s, 3H, 15-H₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 144.9 (C-2), 136.8 (C-11), 132.6 (C-7), 127.4 (C-6), 121.3 (C-10), 111.8 (C-1), 76.1 (C-8), 73.3 (C-3), 65.9 (C-9), 41.8 (C-4), 39.1 (C-5), 27.9 (C-15), 25.8 (C-12), 18.0 (C-13), 14.0 (C-14); GC-MS [EI], m/z (%): 238 (0.01), 220 (1), 217 (2), 205 (8), 161 (24), 151 (33), 107 (100), 93 (76), 68 (86), 67 (100).

Biotransformationsprodukt 166



Die Transformation von **156a** (30.0 mg, 67.0 μmol , 1.0 Äq.) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 mL mit Tween® 20 (0.05 %) für 4 h und lieferte die Zielverbindung als helle, wachsartige Substanz (5.0 mg, 23.0 μmol , 34 %) als Rohprodukt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.41-5.36 (m, 1H, 2-H), 5.30-5.25 (m, 1H, 6-H), 4.70-4.68 (m, 1H, 12-H_a), 4.61-4.59 (m, 1H, 12-H_b), 4.25-4.13 (m, 2H, 5-H₂), 4.04 (d, $J = 12$ Hz, 1H, 4-H_a), 3.86 (d, $J = 12$ Hz, 1H, 4-H_b), 2.15-2.09 (m, 1H, 8-H_a), 2.07-2.01 (m, 1H, 10-H₂), 1.93-1.85 (m, 2H, 1-H₂), 1.79-1.72 (m, 1H, 8-H_b), 1.74-1.73 (m, 3H, 13-H₃), 1.69 (br s, 3H, 14-H₃), 1.68 (br s, 3H, 15-H₃), 1.60 (br s, 1H, 9-H_a), 1.44-1.39 (m, 1H, 9-H_b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 151.8 (C-11), 137.4 (C-7), 135.6 (C-3), 126.7 (C-2), 124.7 (C-6), 107.8 (C-12), 79.9 (C-4), 69.2 (C-5), 48.6 (C-10), 39.8 (C-8), 33.5 (C-1), 32.9 (C-9), 19.6 (C-13), 17.8 (C-14), 14.6 (C-15); GC-MS [EI], m/z (%): 220 (4), 205 (14), 121 (25), 107 (36), 93 (51), 68 (100), 67 (71).

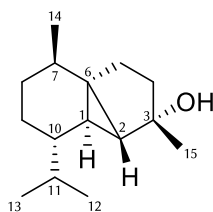
ALLGEMEINE VORSCHRIFT ZUR SEMIKONTINUIERLICHEN BIOTRANSFORMATION

Für Biotransformationen im Fed-Batch-Prozess wurde die Reaktion zunächst entsprechend der Startbedingungen (Tabelle 43 und Tabelle 44) angesetzt. Die verwendeten STCN sind zuvor heterolog in *E. coli* exprimiert, mittels IMAC gereinigt und in den Reaktionspuffer überführt worden. Der in einigen Fällen verwendete hydrophobe Adsorber wurde zunächst mit *n*-Pentan konditioniert und vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch mit Wasser gewaschen. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln, während das Substrat kontinuierlich zugeführt wurde. Bei Biotransformationen mit Tps32 und GcoA war das Substrat zuvor mit Tween® 20 (10 µL) versetzt worden. Im Abstand von 3 – 5 h erfolgte die portionsweise Zugabe von weiterem Enzym (4 – 6 mg). Währenddessen erfolgte zudem 1 – 2 Mal die erneute Zugabe der PPase (1 U). Nach Eintragen des Substrats wurde für weitere 8 – 10 h inkubiert, bevor die Reaktion durch Proteinase K (3 – 6 mg) und CaCl₂ (1 mM) beendet wurde. Abschließend wurde für weitere 3 – 5 h inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch mehrfache Extraktion mit *n*-Pentan oder durch Abtrennen des hydrophoben Adsorbers. Dieser wurde zunächst mit Wasser gewaschen, bevor das Produkt mit *n*-Pentan eluiert wurde. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und bei 40 °C und unter vermindertem Druck (900 mbar) eingengt. Das verbleibende Lösungsmittel wurde bei –5 °C unter einem Stickstoffstrom entfernt.

Tabelle 43: Detaillierte Werte der semipräparativen Biotransformationen von FPP (8) sowie den FPP-Derivaten 156a, 156b und 155b durch Cop4 und GcoA. Die Aufarbeitung erfolgte bei GcoA durch einen Adsorber, dessen Masse [g] ebenfalls angegeben ist.

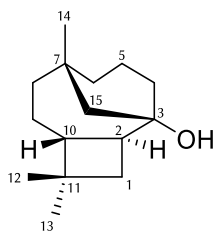
Enzym	Cop4	Cop4	Cop4	GcoA	GcoA
Substrat	FPP (8)	156a	156b	FPP (8)	155b
Produkt	Cubebol (37)	166	186	Caryolan-1-ol (9)	174
Reaktionspuffer (pH)	TRIS (8.0)	TRIS (8.0)	TRIS (8.0)	HEPES (7.5)	HEPES (7.5)
Volumen [mL]	400	280	280	400	400
Startbedingungen					
Substratkonzentration [µM]	50	50	50	10	10
Enzymkonzentration [g/L]	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
Tween® 20 [%]	0.005	0.01	0.01	0.075	0.075
PPase [U]	1	1	1	1	1
Mg-Konzentration [mM]	10	10	10	5	5
Inkubation und Substratzugabe					
Temperatur [°C]	30	30	30	30	30
Rotation [Upm]	130	130	130	70	70
Substrat (gesamt) [µmol]	180	157	155	85	100
Zugabe [µmol/h]	12	9	9	5	5
Dauer [h]	15	18	18	17	20
Aufarbeitung					
Extraktion (E) oder Elution von Adsorber (A) [g]	E	E	E	A 1.6	A 1.6
Ausbeute					
[mg]	12.2	12.9	10.6	3.0	4.0
[µmol]	54.8	58.5	41.7	13.5	16.9
[%]	30	37	27	16	17

Cubebol (37)



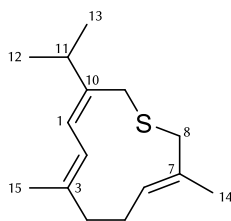
$^1\text{H-NMR}$ und HSQC (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.88-1.80 (m, 1H, 5- H_a), 1.69-1.61 (sept., 1H, 7-H), 1.68-1.59 (m, 1H, 8- H_a), 1.65-1.59 (m, 1H, 11-H), 1.57-1.51 (dd, 1H, 4- H_a), 1.55-1.49 (m, 1H, 5- H_b), 1.40-1.41 (dd, 1H, 4- H_b), 1.28 (d, 3H, 15- H_3), 1.02-0.98 (m, 1H, 10-H), 0.97 (d, 3H, J = 6.8 Hz, 12- H_3), 0.93 (d, 3H, J = 2.7 Hz, 14- H_3), 0.92 (d, 3H, J = 6.8 Hz, 13- H_3), 0.86 (d, 1H, J = 3.3 Hz, 2-H), 0.84-0.80 (m, 2H, 9-H), 0.82 (q, 1H, 1-H), 0.58-0.46 (m, 1H, 8- H_b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 80.4 (C-3), 44.2 (C-10), 39.1 (C-2), 36.4 (C-4), 33.7 (C-11), 33.5 (C-6), 31.7 (C-8), 30.9 (C-7), 29.6 (C-5), 27.9 (C-15), 26.5 (C-1), 22.6 (C-9), 20.1 (C-12), 19.7 (C-13), 18.8 (C-14); GC-MS [EI], m/z (%): 222 (4), 207 (77), 204 (47), 161 (100), 105 (53). Die Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[116]

(+)-Caryolan-1-ol (95)



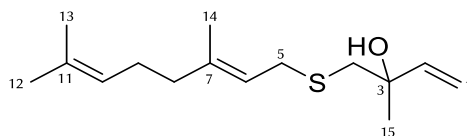
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.29-2.20 (m, 1H, 2-H), 1.86-1.79 (m, 1H, 10-H), 1.79-1.67 (m, 2H, 5- H_2), 1.75-1.67 (m, 1H, 15- H_a), 1.64-1.57 (m, 1H, 4- H_a), 1.56-1.42 (m, 2H, 1- H_2), 1.56-1.48 (m, 1H, 8- H_a), 1.48-1.44 (m, 1H, 9- H_a), 1.41-1.34 (m, 1H, 6- H_a), 1.36-1.26 (m, 2H, 4- H_b , 9- H_b), 1.15-1.10 (m, 1H, 8- H_b), 1.12-0.92 (m, 3H, 12- H_3), 1.10-1.02 (m, 1H, 6- H_b), 1.06-0.99 (m, 1H, 15- H_b), 1.05-0.97 (m, 3H, 13- H_3), 0.88 (s, 3H, 14- H_3); $^{13}\text{C-NMR}$ und HMBC (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 71.0 (C-3), 48.8 (C-15), 44.8 (C-10), 39.5 (C-2), 38.6 (C-4), 37.5 (C-6), 36.6 (C-8), 35.0 (C-11), 34.8 (C-7), 34.4 (C-1), 33.2 (C-14), 30.5 (C-12), 21.9 (C-9), 20.9 (C-13), 20.8 (C-5). GC-MS [EI], m/z (%): 222 (1), 207 (9), 204 (14), 161 (31), 111 (100). Die Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[62]

Biotransformationsprodukt 174



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.86 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 1-H), 5.72 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 2-H), 5.19-5.13 (m, 1H, 6-H), 3.26 (s, 4H, 8-H₂, 9-H₂), 2.35-2.27 (m, 1H, 11-H), 2.23-2.12 (m, 2H, 5-H₂), 2.10-2.05 (m, 2H, 4-H₂), 1.68-1.66 (m, 3H, 15-H₃), 1.39-1.41 (m, 3H, 14-H₃), 1.07 (s, 3H, 12-H₃), 1.05 (s, 3H, 13-H₃); $^{13}\text{C-NMR}$ und **HMBC** (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 144.6 (C-10), 134.0 (C-7), 132.9 (C-3), 127.1 (C-6), 125.1 (C-2), 117.2 (C-1), 45.3 (C-8), 38.7 (C-4), 33.7 (C-11), 30.7 (C-9), 28.7 (C-5), 22.10 (C-12), 22.09 (C-13), 16.3 (C-15), 14.6 (C-14); **GC-MS** [EI], m/z (%): 236 (49), 221 (10), 121 (54), 107 (40), 99 (67), 93 (53), 85 (100).

Biotransformationsprodukt 186



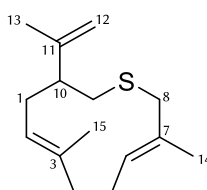
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.89 (dd, 1H, 2-H, $J = 10.7$ Hz, $J = 17.1$ Hz), 5.30 (dd, 1H, 1-H_a, $J = 1.3$ Hz, $J = 17.1$ Hz), 5.26-5.20 (m, 1H, 6-H), 5.10 (dd, 1H, 1-H_b, $J = 1.3$ Hz, $J = 10.7$ Hz), 5.05-5.11 (m, 1H, 10-H), 3.20 (d, 2H, 5-H₂, $J = 8.0$ Hz), 2.75 (d, 1H, 4-H_b, $J = 13.5$ Hz), 2.59 (d, 1H, 4-H_a, $J = 13.5$ Hz), 2.14-1.96 (m, 4H, 8-H₂, 9-H₂), 1.68 (s, 3H, 13-H₃), 1.65 (s, 3H, 14-H₃), 1.60 (s, 3H, 12-H₃), 1.33 (s, 3H, 15-H₃); $^{13}\text{C-NMR}$ und **HMBC** (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 143.8 (C-2), 139.5 (C-7), 131.7 (C-11), 123.9 (C-10), 120.2 (C-6), 112.9 (C-1), 72.4 (C-3), 44.1 (C-1), 39.6 (C-8), 31.3 (C-5), 27.3 (C-15), 26.5 (C-9), 25.7 (C-13), 17.7 (C-12), 16.2 (C-14); **GC-MS** [EI], m/z (%): 254 (0.2), 236 (1), 37 (21), 57 (33), 175 (100).

Experimenteller Teil

Tabelle 44: Detaillierte Werte der semipräparativen Biotransformationen von FPP (**8**) und den FPP-Derivate **155b**, **156b** und **201** durch Tps32. Die Aufarbeitung erfolgte meist durch einen Adsorber, dessen Masse [g] ebenfalls angegeben ist. *Da die Verbindungen nach der Biotransformation nicht gereinigt wurden, können die als Ausbeute angegebenen Werte noch Verunreinigungen enthalten.

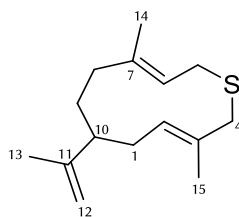
Enzym	Tps32	Tps32	Tps32	Tps32	Tps32
Substrat	FPP (8)	FPP (8)	155b	156b	201
Produkt	Vetispiradien (34)	Vetispiradien (34)	173	185	211
Reaktionspuffer (pH)	HEPES (7.5)	HEPES (7.5)	HEPES (7.5)	HEPES (7.5)	HEPES (7.5)
Volumen [mL]	325	325	2× 400	400	400
Startbedingungen					
Substratkonzentration [μ M]			10		
Enzymkonzentration [g/L]			0.02		
Tween® 20 [%]			0.075		
PPase [U]			1		
Mg-Konzentration [mM]			5		
Inkubation und Substratzugabe					
Temperatur [° C]	30	30	37	37	30
Rotation [Upm]	130	130	70	80	70
Substrat (gesamt) [μ mol]	72.7	72.7	174	53.5	85.4
Zugabe [μ mol/h]	4	4	5	3.6	5
Dauer [h]	19	19	18	15	17
Aufarbeitung					
Extraktion (E) oder Elution von Adsorber (A) [g]	E	A 2	A 3.6	A 2.5	A 1.6
Ausbeute					
[mg]	8.7	4.5	7.2	2.5	4.4
[μ mol]	42.6	22.0	30.5	10.6	21.6
[%]	59*	30	18	20	25

Biotransformationsprodukt 173



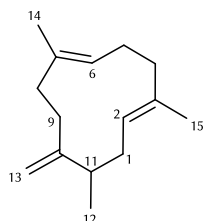
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.25-5.19 (m, 1H, 2-H), 5.03-4.97 (m, 1H, 6-H), 4.81-4.78 (m, 1H, 13- H_a), 4.78-4.74 (m, 1H, 13- H_b), 3.16-3.05 (m, 2H, 8- H_2), 2.48-2.34 (m, 2H, 9- H_2), 2.30-2.14 (m, 2H, 5-H), 2.20-2.08 (m, 2H, 4- H_2), 2.17-2.04 (m, 1H, 1- H_a), 1.94-1.86 (m, 1H, 10-H), 1.86-1.74 (m, 1H, 1- H_b), 1.74-1.68 (m, 3H, 12- H_3), 1.68-1.63 (m, 3H, 14- H_3), 1.56-1.54 (m, 3H, 15- H_3); $^{13}\text{C-NMR}$ und **HMBC** (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 147.1 (C-11), 135.1 (C-3), 130.5 (C-6), 125.9 (C-2), 110.8 (C-13), 51.9 (C-10), 43.4 (C-8), 39.1 (C-4), 32.4 (C-1), 30.6 (C-9), 25.5 (C-5), 19.9 (C-12), 15.3 (C-15), 14.1 (C-14). **GC-MS** [EI], m/z (%): 236 (26), 221 (21), 190 (19), 121 (37), 107 (45), 99 (67), 85 (100). Das Signal von C-7 ist weder im $^{13}\text{C-NMR}$ noch im HMBC oder HSQC auszumachen.

Biotransformationsprodukt 185



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.34-5.28 (m, 1H, 2-H), 5.23-5.16 (m, 1H, 6-H), 4.69-4.67 (m, 1H, 13- H_a), 4.60-4.57 (m, 1H, 13- H_b), 3.50 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J = 14.7$ Hz, 1H, 5- H_a), 3.18 (q, $J = 14.3$ Hz, 2H, 4- H_2), 3.13-3.06 (m, 1H, 5- H_b), 2.14-2.00 (m, 1H, 8- H_a), 2.07-2.00 (m, 1H, 1- H_a), 1.89-1.82 (m, 1H, 1- H_b), 1.83-1.81 (m, 1H, 10-H), 1.79-1.71 (m, 1H, 8- H_b), 1.75-1.71 (m, 3H, 12- H_3), 1.72-1.71 (m, 3H, 15- H_3), 1.67 (s, 3H, 14- H_3), 1.66-1.59 (m, 1H, 9- H_a), 1.43-1.36 (m, 1H, 9- H_b); $^{13}\text{C-NMR}$ und **HMBC** (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 151.9 (C-11), 135.2 (C-7), 133.4 (C-3), 125.1 (C-2), 124.6 (C-6), 107.8 (C-13), 48.5 (C-10), 44.5 (C-4), 39.7 (C-8), 34.0 (C-1), 32.7 (C-5), 32.6 (C-9), 19.6 (C-12), 17.4 (C-14), 15.0 (C-15); **GC-MS** [EI], m/z (%): 236 (26), 221 (21), 190 (19), 121 (37), 107 (45), 99 (67), 85 (100).

Biotransformationsprodukt 211



(Strukturvorschlag)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.18 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, 2/6-H), 4.90 (br s, 1H, 13- H_a), 4.9 (br s, 1H, 13- H_b), 2.27-2.22 (m, 1H, 11-H), 2.20-1.88 (m, 10H, 1- H_2 , 4- H_2 , 5- H_2 , 8- H_2 , 9- H_2), 1.54 (br s, 3H, 14/15- H_3), 1.50 (br s, 3H, 14/15- H_3), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 12- H_3); **GC-MS** [EI], m/z (%): 204 (11), 189 (25), 176 (26), 162 (34), 147 (46), 121 (65), 107 (83), 93 (100), 76 (62).

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Breitmaier, *Terpenes. Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*, WILEY-VCH, Weinheim, Germany, 2006.
- [2] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11570.
- [3] M. Gautschi, *Chimia* **2001**, *55*, 379.
- [4] D. Tholl, F. Chen, J. Petri, J. Gershenzon, E. Pichersky, *Plant J.* **2005**, *42*, 757.
- [5] O. Wallach, *Terpene und Campher; Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen*, Veit, Leipzig, 1909.
- [6] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *9*, 357.
- [7] H. K. Lichtenthaler, M. Rohmer, J. Schwender, *Physiol. Plant.* **1997**, *101*, 643.
- [8] J. M. Vinokur, T. P. Korman, Z. Cao, J. U. Bowie, *Biochemistry* **2014**, *53*, 4161.
- [9] a) M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565; b) M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564; c) W. N. Hunter, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21573; d) W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1401; e) J. W. Munos, X. Pu, S. O. Mansoorabadi, H. J. Kim, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2048.
- [10] a) P. F. Marrero, C. D. Poulter, P. A. Edwards, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21873; b) M. N. Ashby, P. A. Edwards, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13157; c) A. Joly, P. A. Edwards, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 26983; d) L. Song, C. D. Poulter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3044.
- [11] D. J. Miller, R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 60.
- [12] D. E. Cane, I. Kang, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 354.
- [13] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 13543.
- [14] P. Baer, P. Rabe, K. Fischer, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, M. Groll, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7652.
- [15] J. Degenhardt, T. G. Köllner, J. Gershenzon, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621.
- [16] M. Seemann, G. Zhai, K. Umezawa, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 591.
- [17] a) Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078; b) P. Rabe, J. Rinkel, T. A. Klapschinski, L. Barra, J. S. Dickschat, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 158.
- [18] A. Vattekkatte, S. Garms, W. Boland, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2855.
- [19] D. E. Cane, C. Abell, R. Lattman, C. T. Kane, B. R. Hubbard, Harrison, Paul H. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4081.
- [20] F. Lopez-Gallego, S. A. Agger, D. Abate-Pella, M. D. Distefano, C. Schmidt-Dannert, *Chembiochem* **2010**, *11*, 1093.
- [21] D. E. Cane, J. L. Pawlak, R. M. Horak, T. M. Hohn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5476.
- [22] K. Back, J. Chappell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 6841.
- [23] F. López-Gallego, G. T. Wawrzyn, C. Schmidt-Dannert, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7723.
- [24] J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1787.
- [25] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1732.
- [26] M. Seemann, G. Zhai, J.-W. de Kraker, C. M. Paschall, D. W. Christianson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7681.
- [27] V. Falara, T. A. Akhtar, T. T. H. Nguyen, E. A. Spyropoulou, P. M. Bleeker, I. Schauvinhold, Y. Matsuba, M. E. Bonini, A. L. Schillmiller, R. L. Last et al., *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 770.
- [28] T. M. Hohn, F. Vanmiddlesworth, *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *251*, 756.
- [29] R. F. Vesonder, A. Ciegler, A. H. Jensen, W. K. Rohwedder, D. Weisleder, *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, *31*, 280.
- [30] a) D. E. Cane, S. Swanson, P. P. N. Murthy, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2136; b) T. M. Hohn, M. N. Beremand, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1500.
- [31] L. S. Vedula, J. Jiang, T. Zakharian, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *469*, 184.

- [32] L. S. Vedula, Y. Zhao, R. M. Coates, T. Koyama, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *466*, 260.
- [33] Y. J. Hong, D. J. Tantillo, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4601.
- [34] D. J. Tantillo, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 10172.
- [35] D. E. Cane, Q. Xue, B. C. Fitzsimons, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12369.
- [36] D. E. Cane, W. Zhen, J. S. Oliver, T. M. Hohn, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 416.
- [37] T. M. Hohn, R. D. Plattner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *275*, 92.
- [38] D. E. Cane, J. H. Shim, Q. Xue, B. C. Fitzsimons, T. M. Hohn, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2480.
- [39] L. S. Vedula, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12719.
- [40] L. S. Vedula, M. J. Rynkiewicz, H.-J. Pyun, R. M. Coates, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6153.
- [41] V. Siewers, M. Viaud, D. Jimenez-Teja, I. G. Collado, C. S. Gronover, J.-M. Pradier, B. Tudzynski, P. Tudzynski, *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **2005**, *18*, 602.
- [42] C. Pinedo, C.-M. Wang, J.-M. Pradier, B. Dalmais, M. Choquer, P. Le Pêcheur, G. Morgant, I. G. Collado, D. E. Cane, M. Viaud, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 791.
- [43] I. G. Collado, A. J. Macías Sánchez, J. R. Hanson, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 674.
- [44] C.-M. Wang, R. Hopson, X. Lin, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8360.
- [45] S. C. Wang, D. J. Tantillo, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4827.
- [46] D. J. Tantillo, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2847.
- [47] S. A. Agger, F. Lopez-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Mol. Microbiol.* **2009**, *72*, 1181.
- [48] a) D. E. Cane, A. M. Tillman, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 122; b) D. E. Cane, C. Abell, A. M. Tillman, *Bioorg. Chem.* **1984**, *12*, 312.
- [49] D. E. Cane, C. Pargellis, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *254*, 421.
- [50] a) P. Gutta, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6172; b) D. E. Cane, S. W. Weiner, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 118.
- [51] C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, *277*, 1820.
- [52] C. A. Lesburg, M. D. Lloyd, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2436.
- [53] L. Zu, M. Xu, M. W. Lodewyk, D. E. Cane, R. J. Peters, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11369.
- [54] M. W. Lodewyk, D. Willenbring, D. J. Tantillo, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 887.
- [55] M. Isegawa, S. Maeda, D. J. Tantillo, K. Morokuma, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1555.
- [56] D. E. Cane, J. S. Oliver, Harrison, Paul H. M., C. Abell, B. R. Hubbard, C. T. Kane, R. Lattman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4513.
- [57] D. E. Cane, J.-K. Sohng, C. R. Lamberson, S. M. Rudnicki, Z. Wu, M. D. Lloyd, J. S. Oliver, B. R. Hubbard, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5846.
- [58] X. Lin, R. Hopson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6022.
- [59] B. Zhao, X. Lin, L. Lei, D. C. Lamb, S. L. Kelly, M. R. Waterman, D. E. Cane, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8183.
- [60] B. Zhao, X. Lin, L. Lei, D. C. Lamb, S. L. Kelly, M. R. Waterman, D. E. Cane, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8183.
- [61] R. Li, Chou, Wayne K W, J. A. Himmelberger, K. M. Litwin, G. G. Harris, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2014**, *53*, 1155.
- [62] C. Nakano, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27980.
- [63] I. M. Whitehead, A. L. Atkinson, D. R. Threlfall, *Planta* **1990**, *182*, 81.
- [64] D. E. Cane, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1089.
- [65] J. R. Mathis, K. Back, C. Starks, J. Noel, C. D. Poulter, J. Chappell, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8340.
- [66] J. Chappell, K. Back, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7375.
- [67] a) W. K. W. Chou, I. Fanizza, T. Uchiyama, M. Komatsu, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8850; b) J. G. de Sena Filho, I. C. Barreto, A. O. Soares Filho, P. C. L. Nogueira, A. V. Teodoro, A. V. Cruz da Silva, H. S. Xavier, A. R. C. Rabbani, D. J. Spakowicz, J. M. Durringer, *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1931.
- [68] G. Hughes, J. C. Lewis, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1.

- [69] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr., L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 8. Aufl., Springer Spektrum, Berlin, 2018.
- [70] a) S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science* 2016, 354, 1048; b) Z.-G. Zhang, L. P. Parra, M. T. Reetz, *Chemistry* 2012, 18, 10160.
- [71] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.
- [72] S. Bansal, G. Goel, S. Ojha in *Industrial Enzymes. Trends, Scope and Relevance* (Hrsg.: V. Beniwal, A. K. Sharma), Nova Science Publishers, Incorporated, New York, 2014, 49-71.
- [73] L. Ray, D. Bera in *Conventional and Advanced Food Processing Technologies* (Hrsg.: S. Bhattacharya), John Wiley & Sons, Hoboken, 2015, S. 387-410.
- [74] a) R. B. Rucker, W. Chowanadisai in *Encyclopedia of food and health* (Hrsg.: B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldrá), Academic Press, Elsevier, Oxford, 2016, S. 206-224; b) H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* 2011, 111, 4165.
- [75] S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* 2001, 30, 332.
- [76] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3336.
- [77] X. Tang, R. K. Allemann, T. Wirth, *Eur. J. Org. Chem.* 2017, 414.
- [78] U. Krings, R. G. Berger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49, 1.
- [79] a) L. Caputi, E. Aprea, *Recent. Pat. Food. Nutr. Agric.* 2010, 3, 9; b) E. Jongedijk, K. Cankar, M. Buchhaupt, J. Schrader, H. Bouwmeester, J. Beekwilder, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2927.
- [80] a) O. Cascón, S. Touchet, D. J. Miller, V. Gonzalez, J. A. Faraldos, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* 2012, 48, 9702; b) A. Vattekkatte, N. Gatto, E. Schulze, W. Brandt, W. Boland, *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 4776; c) J. P. Noel, N. Dellas, J. A. Faraldos, M. Zhao, B. A. Hess, L. Smentek, R. M. Coates, P. E. O'Maille, *ACS Chem. Biol.* 2010, 5, 377; d) D. J. Miller, F. Yu, R. K. Allemann, *Chembiochem* 2007, 8, 1819; e) J. A. Faraldos, Y. Zhao, P. E. O'Maille, J. P. Noel, R. M. Coates, *Chembiochem* 2007, 8, 1826; f) F. Yu, D. J. Miller, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* 2007, 4155; g) D. J. Miller, F. Yu, D. W. Knight, R. K. Allemann, *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 962.
- [81] D. E. Cane, G. Yang, Q. Xue, J. H. Shim, *Biochemistry* 1995, 34, 2471.
- [82] a) Y. J. Hong, D. J. Tantillo, *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 4101; b) D. E. Cane, T. E. Bowser, *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* 1999, 9, 1127.
- [83] R. Lauchli, K. S. Rabe, K. Z. Kalbarczyk, A. Tata, T. Heel, R. Z. Kitto, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 5571.
- [84] X. Tang, M. Demiray, T. Wirth, R. K. Allemann, *Bioorg. Med. Chem.* 2017.
- [85] K. A. Rising, C. M. Crenshaw, H. J. Koo, T. Subramanian, K. A. H. Chehade, C. Starks, K. D. Allen, D. A. Andres, H. P. Spielmann, J. P. Noel et al., *ACS Chem. Biol.* 2015, 10, 1729.
- [86] a) G. Bian, Z. Deng, T. Liu, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017, 48, 234; b) M. Demiray, X. Tang, T. Wirth, J. A. Faraldos, R. K. Allemann, *Angew. Chem.* 2017, 129, 4411.
- [87] K. Seidel, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2017.
- [88] B. Schröder, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2018.
- [89] M. A. Umbreit, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 5526.
- [90] I. J. S. Fairlamb, J. M. Dickinson, M. Pegg, *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 2205.
- [91] a) V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremler, M. Muehlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 4768; b) R.K. Keller, R. Thompson, *J. Chromatogr. A* 1993, 645, 161.
- [92] a) L. S. Vedula, Y. Zhao, R. M. Coates, T. Koyama, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 466, 260; b) D. E. Cane, G. Yang, R. M. Coates, H. J. Pyun, T. M. Hohn, *J. Org. Chem.* 1992, 57, 3454.
- [93] T. Frister, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2015.
- [94] C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. S. Dickschat, A. Kirschning, *Angew. Chem.* 2018, 130, 11976.
- [95] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, M. J. E. Sternberg, *Nat. Protoc.* 2015, 10, 845.
- [96] a) D. B. Little, R. B. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, 402, 120; b) B. Felicetti, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 7212.

- [97] J. H. Miyazaki, R. Croteau, *Enzyme Microb. Technol.* **1990**, *12*, 841.
- [98] a) J. E. Diaz, C.-S. Lin, K. Kunishiro, B. K. Feld, S. K. Avrantinis, J. Bronson, J. Greaves, J. G. Saven, G. A. Weiss, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1597; b) Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078 EP -.
- [99] R. Lauchli, J. Pitzer, R. Z. Kitto, K. Z. Kalbarczyk, K. S. Rabe, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4013.
- [100] N. J. Turner, *Nat. Chem Biol.* **2009**, *5*, 567 EP -.
- [101] a) S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science (New York, N.Y.)* **2016**, *354*, 1048; b) A. Ilie, M. T. Reetz, *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 51; c) U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137; d) M. T. Reetz, J. D. Carballera, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891; e) Z. Sun, Y. Wikmark, J.-E. Bäckvall, M. T. Reetz, *Chemistry* **2016**, *22*, 5046.
- [102] E. W. Sayers, T. Barrett, D. A. Benson, E. Bolton, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, S. Federhen et al., *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D38-D51.
- [103] a) X. Huang, W. Miller, *Adv. Appl. Math.* **1991**, *12*, 337; b) Swiss Institute of Bioinformatics, "LALIGN", zu finden unter http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html.
- [104] Audrius Meskauskas, "Reverse complement", zu finden unter <http://reverse-complement.com/>.
- [105] New England Biolabs, "Tm Calculator", zu finden unter <http://tmcalculator.neb.com>.
- [106] Swiss Institute of Bioinformatics, "ExpASy - Compute pI/Mw tool", zu finden unter http://web.expasy.org/compute_pi/.
- [107] Swiss Institute of Bioinformatics, "ExpASy - ProtParam tool", zu finden unter <http://web.expasy.org/protparam/>.
- [108] a) K.-C. Liu, L.-C. Lee, *Arch. Pharm.* **1976**, *309*, 1019; b) J. Gros, S. Nizet, S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8853.
- [109] A. H. Trotta, *Organic letters* **2015**, *17*, 3358.
- [110] A. M. Bogazkaya, C. J. von Bühler, S. Kriening, A. Busch, A. Seifert, J. Pleiss, S. Laschat, V. B. Urlacher, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1347.
- [111] T. Galaka, M. Ferrer Casal, M. Storey, C. Li, M. N. Chao, S. H. Szajnman, R. Docampo, S. N. J. Moreno, J. B. Rodriguez, *Molecules* **2017**, *22*.
- [112] T. N. Van, N. de Kimpe, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7969.
- [113] S. Combemale, J.-N. Assam-Evoung, S. Houaidji, R. Bibi, V. Barragan-Montero, *Molecules* **2014**, *19*, 1120.
- [114] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113.
- [115] G. Blay, L. Cardona, A. M. Collado, B. García, V. Morcillo, J. R. Pedro, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7294.
- [116] E. Gorobets, N. E. Wong, R. S. Paton, D. J. Derksen, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 484.

7 ANHANG

7.1 Gen- und Proteinsequenzen

Tabelle 45: Sequenzen der synthetischen STCn-Gene *bot2*, *cop4*, *cyc1*, *penA*, *gcoA*, *tri5*, *hvs1* und *tps32*.

<i>bot2</i>	1213 bp
<p>GAATTCATATGGCCATTCCGGCACTGGAGCCGAGCTGCATGATGCCGATACAAGCAGCAACAACATGAGCAGCAACAGCAC CGATAGTGGCTATGACACCAACAGCACCACCCGCTGAAAAAAGCGAAAAGCCGAATACCCAGGAGCTGAAAACAGCAGCAGT TAGATCCGAAGCCCGCCGCTTTGTGCGCGTTCTGATCTGTTGGTAGCATTATGAGCACCAGCCGGTGGTGAATCCTAAC TACTTCGACGCAAGCCCGTGGTACCCTGGATGCCCGTGTGATGAACTTCAACAAAGCCGTGGCCGACGCAACAGCAA AGTGGACCTGTGCTTTCTGGCCAGTATGTGGCACCCGATGCACCCGAAAGATCGTCTGGTATGATGCTGGATTGGAACCACT GGGTGTTCTGTTGATGACAGTGTGACGAGGGTACCTGAAAGAAGATCCGGCCGACGCGCCGAAGAAGTGAAGCAGACC ATTGCCATTATGGGCGGTAACGCACCCGCTTACCCGCCGAAAGCAACCCGATCCGTTACGTGTTTACGAGTGTGGGATCG TCTGAAAGCCGTGAGCACTCAGGAAATGCAGCAGCTGGATGACCAAGCCTACTTCGATCAGCTGTTAGTGCAAG TGGACAGCAGGTGGTGGTGAAGACTTTACCCGTGATGTGGAAGCATATATGGACCTGCGCCGCGTACCAATGGTGTGAT CCTGCCATCAGCCTGAGTGAATGAGTATGGCGCAGGCGTTAATGTTCCGACGACGCTGATGACCATCCGAGCCTGCAGGAATGCAT GAAAGTGACGCGGATCTGGTGAACCTGGTGAACGAGCTGCTGAGTACCAGCAAGCACTTGAAGTGGGCGTGGACCATAACC TGATGAGCTGCTGATGACAGCTGACAATCTGAGCGCACAACAGGCGTGGACGTGATCGCGCATATGGTGAATGATGCTAT CGCCGCTGGTATCTGGCAGCTGGCAGAACTGCCGAGCTACCGTGAAGAAGATCGATTACAATGTGATGAAATTTGTGGAGATTTG CCGTGCCGTTGCCAGGTAACCTGTAAGTGTTCAGACCCGCGCTATCTGGTCCGAGGGCCACGAAGTGCACGAAA CCGGTATCATGTACCTGCCCGCCGCAAAATTTAGTGGTGGCCTAAGCTT</p>	
<i>cop4</i>	1051 bp
<p>GAATTCATATGCGCCCTACCGCAGCTCAGTTTACCCTGCCGATCTGTTTACGATCTGCCCTCTGCAGGACGCCACCAATCC GTGGTATAAACAGGCCCGCCGAAAGCCGTGCCTGGATTAATAGCTACAATATTTTACCGATCGAAGCGCCTTCTTTA TCCAGGGCAGCAACGAAGTGTATGACAGCCAGTGTATGCCTACGCGGCTATGAACAATTTGCACCTGCTGCGACTTCGTG AATCTGCTGTTCTGTTGGTGGACGAAATCAGCGATGATCAGAACGGTCAGGATGCCCGCGCCACCGGTGCGATTTTCGTGAATGC CATGCGCGATGCCATTGGGATGATGGCAGCATCCTGGCCAAAATACCACGAGTTCGTTGAGCGCTTTGTTCTGCTGGCAG GTCGGAAGACCGTGGCCGTTTTGCCGATCTGTGCGAGAGTTATACCGATTGCGTGGCACGCGAAGCCGAAGTGCCTGAGCCT AATCAGGTGCTGGGCTTAAATGACTTTATCGCCCTGCGCCGTGAGAACAGTGCCTGCTGCTGTGCTATAGCCTGGTGAATA CATCCTGGGCATCGACCTGGATGATGAGGTGTACGAAGACCCGACATTTGCCAAAGCCTACTGGGCAGCCTGCGATTTCTGTG GTTGGGCCAATGACGTGTACAGCTACGATATGGAGCAGGCCAAGGGTCAACCGGCAACAATGTGGTGGCCGTGCTGATGAAG GAAAAGACCTGAGCCTGCAGGAAGCCAGCGATTACATTTGGCCGCGAGTGCAGAAACAGATGCGTACTACCTGGAGGCAAA GAGTCACTGCTGCAGAGCAGGATCTGCCGAGGAAGCAGTTCGCTACATTGAAGCCCTGGGCTACTGGATGGTTGGCAACC TGGTTTGGAGCTTTGAGAGTCAAGCCTACTTCCGCGCCAGCATGAACCGGTGAAAGCAACCCATGTGGTGCATCTGCGCCCG AGTAGCGTGTGGAAGCCAGCTGTGATAGCGATAGCGACAGTACTGCTAAGCTT</p>	
<i>cyc1</i>	1099 bp
<p>GAATTCATATGCACGCCTTTCCGCACGGTACAACCCGCAACCCCGACAGCAATCGCAGTGCCCGCAGCCTGCGTTTACCGGT TATTGAGGCCGCTTTCCGCGTCACTGATCCGATTTGGCCGAAGCTGCAGGAGACCACCCGCACATGGCTGCTGAAAAAAC GCCTGATGCCGGCAGACAAAGTGGAGGAGTACGCAGATGGTCTGTGCTACACCGATCTGATGGCAGGCTATTACCTGGGTGCA CCGGACGAAGTGTGACAGGCAATCGCCGATTACAGCGCCTGGTTTTCTGTTGGGATGACCGTCAATGATCGTATATCGTGCA TGGTCTGCGCGCGCATGGCGCCGTTTACGTGGTCTGCTGCATACCCGCTGGATAGCCCGGGTGACCATCTGCATCATGAAG ATACCTGGTGGCCGTTTTGCCGACGCGTGCCTGCTGTATGCAATTTCCGCGCCACATGGAATGCCCGCTTTGACAGT CACTTTACACCGTATCGAGGCTACGATCGCGAATTTACAACCCGACCCCGGTTTGTTCGGGGCTTGAGGAGTATCT GGAATGCGTGCCTGACCTTTGCCATTTGGATCTGGACCGATCTGCTGGAACCGAGTAGCGGTTGCGAAGTCCCGGACGCG TGCCGAAACATCCGGCATACGCGTGCAGCCCTGCTGAGCCAGGAGTTTGCAGCCTGGTACAACGATCTGTGAGCCTGCCG AAAGACATCGCCGCGCAAGTGCACAATCTGGTATCAGCCTGATCACCATCATAGCCTGACACTGGAGGAAGCCATTGG TGAAGTTCCGCGCCGCTTGAAGAATGCATACCGAGTTTCTGGCCGTGGAACGCGATGCCCTGCGTTTTGAGATGAACTGG CCGATGGTACCGTGCCTGGCAAAGAAGTGAAGCGTGCAGTGCCTGCCAATGTGGGCAACATGCGCAACTGGTTCAAGCAGCGT TACTGGTCCACCATGAGAGTGGCCGCTATATGGTTGACAGCTGGGATGATCGCAGCACCCCGCGTATGTGAATAATGAAGC AGCAGCCGAAAAATAAGCTT</p>	
<i>gcoA</i>	1021 bp
<p>GAATTCATATGAGCCAGATTACCCTGCCGGCCTTCCACATGCCGTTCCAGAGCGCAGGTTGTCATCCGGGTCTGGCAGAAAC CCGCAAGCCGATGGGAATGGGCAGCAGCAGAAGCCCTGGATCTGAGCGTTCGGGCCCGTGCAAAATGATTCGCACCCGTC CGGAACTGTGGATTAGCTGATCTTCCCGCAGGCAACCCAGGCCATCTGGATCTGTTCTGCCAATGGTTATCTGGGCTTT CTGGTGGACGATGAGTTTATGACGCGCCCGCAGTCTGATCCGCTGATGTGTGAGCGCGCAATGGCCGCTGTTGGTATGT GTTGATGGTGGCCCGCAATGGTCCGATGGAACGCGCACTGGCAGGTCTGCGTATCGTACATGCCCGGCTGATAGCCCGC AGTGAATCGTCACTTCCGCGTATACCGCAGCCTGGCTGTGGACCTACTATGCCGAAGCAGTTGAACGTGCAGCCGGCCAG GTTCTAGTCTGCGCAATTTGCCAAACACCCGCTGATAGCGTGGCAATGCAGCCGTTTCTGTGCTGCATGAGATTACCGC CGCATTTGATCTGCCGATAGTGGCCGTAAGCTGCCCGCATATCGCCCTGCGCAATGCCGCTGACCGATCATAGCCTGCTG GCAACGACATCTGCAGCTTCGAGAAAGAAAGCCCGCTGGCATATGAACATAACCGCCGTGCGTCTGATTACGCGTATCGCGGT AGCACACTGCAGGAAGCCGTTGATGAAGCAGGCATTCAGCTGGCCCGATTTGCCGAACGTTTCAAGCGTGCAGAACGCGAGCT GATTGAGGAAATCGAGGCCCGCCGATTTGATGGTCCGACACGTAACCGCCCTGGAACGTTGCGTGCAGGATTTCTGTTGGCCTGG TGCGCGGCGACTTTGATATCATGCCCGCCGCAACGCTATACAGTCCGGACCTGGTGGAACTGGACGAACGCGACAGCTTA AGTCGCTCACTTGGCCGATAAGCTT</p>	

<i>hvs1</i>	1681 bp
<p>GAATTCATATGGCACCGCAATCGTGATGAGCAATTACGAGGAAGAAGAGATCGTTCGCCGGTTGCAGACTTTAGTCCTAG TCTGTGGGGCGATCACTTCCACAGTTTTAGCGTGGATAAACCAGGTGGCCGAAAAGTATGCCAGGAGATTGAAACCCTGAAGG AACAGACCAGCACCATGCTGAGCGCCGCTGTGGCACAACACTGACCGAAAAGCTGAACCTGATCGATATTATCGAACGCCTG GGCATCGCCTACCATTCGAAAAACAAATTGAAGACATGCTGGATCACATTTACCGTGCAGATCCGTACTTCGAGGCCACGA ATATAACGACCTGAACACCAGCAGCGTGCAGTTCCGCTGCTGCGTCAGCACGGCTATAACGTGAGCCCGAACATCTTCAGCC GCTTCCAGGATGCAACGGCAAGTTCAGGAAAGCCTGCGCAGCGACATCCGTGGCCTGCTGAATCTGTACGAAGCCAGCCAT GTGCGTACCCATAAGGAAGACATCCTGGAGGAAGCCCTGGTGTTCAGCGTTGGCCATCTGGAAAGCGCCCTCATCTGAA GAGTCCGCTGAGCAACAGGTGACCCATGCCCTGGAACAAAGCTGCACAAAAGCATCCCTCGCCTTGAGATCCGCTATTTTA TTAGCATTTACGAAGAAGAATAATTTAAAAATGATCTGCTGCTGCTTCGCAAAGCTGGACTATAACCTGCTGCAAAATGCTG CACAAGCAGAACTGAGTGAGGTGAGCCGTTGGTGGAAAGGATCTGGATTTCTGTGACCACACTGCCGTATGCACGCGATCGTGC CGTGGAAATGCTATTTCTGGCAATGGGTGTGTATGCCGAGCCGAGTATAGCCAGGCCCGGTTATGCTGGCCAAGACCATTG CCATGATCAGTATCGTGGACACACCTTCGACGCCTTGGTATCGTGAAGAGTTAGAGGTGACACCCGCAATCCAGCGC TGGGATATTAGCCAGATTGATCGCCTGCCGGAGTACATGAAGATTAGCTACAAAAGCACTGCTGGATCTGTACGACGACTACGA AAAGGAGCTGAGCAAAGATGGTGCAGCGATGTGGTGCATTACGCCAAGGAGCGCATGAAAGAGATTGTGGTAATTAATTTTA TTGAAGGTAAGTGGTTCATCGAAGGCTACATGCCGAGCGTTAGCGAATACCTGAGCAATGCCCTGGCCACAAGCACCTACTAT CTGCTGACCACCACCGTTACCTGGCATGAAGAGCGCAAAAAGCACTTCGAGTGGCTGGCCACCAACCTAAGATTCT GGAAGCCAACGCAACCTGTGCCGCTTGTGGATGATATCGAACCTATGAAGTGGAAAAGGGCCGTGGCCAGATCGCCACCG GCATTGAGTGCTATATCGCTGACTACGCGTTCAGCCGAGGTGGCAATGGAGAAGTTCAGGAAATGGCCGATATCGCCTGG AAAGACGTGAATGAGGAGATCCTGCGCCCTACACCGGTGAGCAGTGAGATTCTGACCCGCATCCTGAATCTGGCCCGCATCAT CGATGTGACATAAGCATAACTCAGGACGGTTACACCCATCCGGAGAAAGTCTGAAACCGCACATCATCGCCCTGGTTGTGG ACAGTATCGACATCTAAGCTT</p>	
<i>penA</i>	1023 bp
<p>GGATCCATGCCGAGGACGTGGATTTTTCATATTCGCTGCTGGTTCGTCAGAGCCCGGATCATGCAGTGCAGAGGCCGAACA GTTAGCCTGGCCGCTAGTCTGGGCCTGATTTCGCAGCGATGCAGCAGCAGAACGCCACCTCGCTGGTGGCTATGCCGATCTGG CCAGCCGCTTCTATCCTCATGCCACAGGTGCAGATCTGGATCTGGGTGTGGACCTGATGAGCTGGTTTTTCTGTTTCGATGAT CTGTTGATGGCCCGGTGGCGAAAATCCGGAGGATACCAAACAGCTGACCGACCAGGTGGCCGCGCTTAGATGGTCCGCT GCCTGATACCGCACCCGCGATTGCCACGGTTTTGCAGATATCTGGCGTCTGACCTGTGAGGGCATGACCCCGCATGGTGTG CACGTAGCGCCCGTCAATGGCGCAACTATTTTCGATGGCTACGTGGATGAGGCCGAAAAGTCCGTTTTGGAATGCCCGTGGCAT AGCGCAGCCAGTATCTGGCATGCGCCGTACACCATCGGTGTGCAGCCGACCGTTGATCTGGCAGAACGCGCCGCTCGCTT TGAAGTGCCGCATCGCTTTTTGATAGTGGCTGATGATGCCATGCTGCAGATTGCCGTTGATGTGAACCTGCTGCTGAACG ATATCGCCAGCCTGGAAAAAGAAGAAGCTCGTGGCGAGCAGAATAACATGGTTATGATCCTGCGTGCGAACATGGCTGGAGC AAGAGCCGTAGCGTGAAGCATATGCAGAATGAAGTGCCTGCCCCCTGGAACAGTACCTGTTACTGGAAAAGTTGCTGCCGAA GGTGGGCGAAATCTATCAGCTGGACACCGCAGAACGCGAAGCCCTGGAGCGCTATCGTACCCGATGCCGTTCTGACCGTATTC GCGGAGTTATGATGCATCGTAGCAGCGCCGTTACGATGCCGAGTTGCACTGGCCGACGGCGCCAGGGTTATCTGGAA GAAGTGGTAGTAGCGCCATAAGCTT</p>	
<i>tps32</i>	1660 bp
<p>GAATTCATATGGCACTGCTGAATAATCAGGACGAGATCGTGGCCCGGTGGCAATTTTAGCCCTAGTCTGTGGGGTATCG CTTCCACAGCTTTAGCCTGGATAACCAAGTGGCCGATAAGTACGCCAGCAGATCGAGACCTGAAAGAACAGACCCGTAGCC TGCTGAGCGATGCAGCCTGTGGTACCACCCTGGCCGAGAAGTTAAACCTGATCGACATCGTGGAACGCTGGGTCTGGCATAT CCTTTCGAGAAGCAGTCCGAAGACATGCTGGATCAGATCTACAAAGCCGACCCGAATTTTCAGGCCCTGACCTGAACACCT GAGTCTGCAGTTCGTCATCCTGCGCCAGCATGGCTATAACATTAGTCAGAAAATTTTTAGTCTGTTTTTCAGGACGCCAACGGTA AGTTCAAAGAAAGCCTGAGCAACGATATCAAGGGCCTGCTGAACCTGTACGAGGCAAGTCAATGTGCGTACCCACGGTGAAGGAT ATTCGGAGGAAGCACTGGCCTTTAGCACCCGACATCTGGAAGTGGCCCGCCGATCTGAAGAGCCCTCTGAGTAAGCAGGT GACACAGCCCTGGAACAGAGTCTGCATAAAAAGCATCCCTGCGTGGAAAACCCGTTATTTATCAGATTTTTAGGGAAGAAG AGTTCAAAGTACGCTGCTGCTGCGCTTCGCAAGCTGGATTACAATCTGCTGCAGATGTTACATAAACAGGAACTGAGCGAA GTTAGCCGCTGGTGGAAAGACCTGGATTTCTGAGCCACTGCCGATGCCCCGTGATCGCCCGGTTGAATGTTACTTCTGGAC CATGGGTGTGACCCGAGCCGAGTATAGTACGGCCGCTGTGATGCTGGCAAGACCATCGCCATGATCAGCATCGTGGATG ACACCTTCGATGCCTATGGCATCGTGAAGGAGTTAGAGGTGTATACCGATGCCATCCAGCCGCTGGGATTTAGCCAGTGGAC CGCCTGCTGAATACATGAAAGTGAAGTCTTAAAGCATTACTGGATCTGTATGAAGACTATGAGAAGGAACTGAGCAAAGACGG CCGACGCGACGTGGTTCAGTACGCCAAGGAGCGCATGAAAGAAATCGTGCGAATTAATCTGTTGGAGGCCAAGTGGTTCATTG AAGGCTACATGCCCGCGTGGAGCAATACCTGAGCAACGCCCTGGCCACCAGCACCTATTAATCTGCTGACCACAACCGATTAT CTGGGTGTAAGAGCCGCAAAAGGAAGACTTCGAATGGCTGGCCGAAAATCCGAAAATCTTGAAGCCAAAGCTGACCTGTG CCGCGTGGTGGATGACATTTGCCACCTATGAAGTGGAGAAAGCCGTGGCCAGATCGCCACCGCATCGAATGTTACATGCGCG ATTACGGCGTGAACACCCAGGTTGCAATGGATAAATTTAGGAGATGGCCGAAAATCGCCTGAAAAGATGTGAACGAAGGCATT CTGCGTCCGACCCCGGTTAGCACAGAAATCCTGACACGCATCTTAAACCTGGCCCGCATTAATCGACGTGACATAAAGCAAA TCAAGACGGCTACACACACCCGAGAAAGTTCTGAAACCCGATATCATCGCACTGCTGGTTGACAGACTCGAGATTTAAGCTT</p>	
<i>tri5</i>	1138 bp
<p>GAATTCATATGGAGAACTTTCCGACCGAGTACTTCTGAAACCCACAGTGCCTGCTGGAGTATATTCGCTACCCGACAG CAACTACACCCGTGAGGAGCGCATCGAAAATTTACACTATGCCTATAAACAGGCCGCCACCATTTTGGCCAGCCGCTCAGC AGCAGTTACTGAAGTGGATCCGAAACGCCCTGCAGGCAAGCCTGCAGACCATCGTGGGCATGGTGGTGTATAGTTGGGCAAAG GTGACAAAGAGTGCATGGCAGACCTGACATCCACTACACTACACCTGGTTCTGGATGACAGCAAAGACGATCCGTAACCC GACCATGGTGAACACTTTGACGATCTGCAGGCGCGCCGTGAGCAAGCACATCCGTGGTGGCCCTGGTTAACGAACATTTCC CGAAGTGTGCTGCGTCAATTCGCCCCTTTTGTCAGTCTGAACCTGATCCGACGACCCCTGGACTTTTTCGAAGGCTGCTGGATC GAGCAGTACAATTTCCGCGGCTTTCCGGCAGTACGATTATCCGAGTTTCTGCGCCGATGAATGGTCTGGTCACTGTG GGTGGCAGCCTGTGGCTAAAGAGCAGTTCAACGAGCAGCAGCTGTTTTCTGGAGATTACCAGCGCAATCGCCAGATGGAAA ACTGGATGGTGTGGTGAATGACCTGATGAGCTTCTACAAAAGTGTGACGACGAGCGGATCAGATCAGCCTGGTTAAGAAC TACGTGGTGAAGCAGAGATCAGTCTGCACGAAGCACTGGAGAAGCTGACCCAGGATACACTGCACAGCAGCAAGCAGATGGT TCCCGTGTGTTAGCGACAAAAGACCCGAGGTGATGGATACCATGAGTGCTTCATGATGGCTATGTGACCTGGCATCTGTCG AGCCCGTTATCGTCTGAGCGAAATCTACGAAAAGTGAAGAGGAAAAGACCGAGGACGCCCAAGATTCTGCAAAATCTAC GAGCAGGCCGCAATGTGGGCGCAGTTAGCCGAGCGAATGGGCCTATCCGCTGTGGCACAGCTGGCAATGTGCGCAGCAA GGATGTGAAGAGGTGACAGAAGCCGTTCTGAGTAGTATTGAGCTGGTGGAGTAAGCTT</p>	

Anhang

Tabelle 46: Sequenzen der verwendeten Sesquiterpencyclasen nach Expression in pET28a(+). Farblich gekennzeichnet sind 6×His-Tag, Proteinsequenz der STC, DDXXD/E-Motiv, NSE/DTE-Motiv und Effektortriade. Das theoretische Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient wurden mit Hilfe des ProtParam tools ermittelt.

Bot2	Extinktionskoeffizient: 69330	47,43 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAIPALEPQLHDADTSSNMSSNSTDSGYDTNSTTPLEKSEKPNQELKQQQLDPKRPPFV RVPDFLFGSIMSTKPVVNPYFAAKARGDRWIARVMFNKAVAARNSKVDLCFLASMWAPDAPEDRLVMMLDWNHWVFLFDD QFDEGLHKEDPAAAAEVEKQTIAMGGNAPRYTAESNPIRYVFFQCWDRKAVSSQEMQQRWIDQHKRYFDQLLVQVDQVQ GGENFTRDVEAYMDLRGRTIGVYPATSLSEYGAGVNPQHVVYDHPSLQECMKVSADLVTLVNDVLSYRKDLELGDVHNLM LLMQRDNLSAQQAVDVGDMVNECYRRWYLALAEPSYGEKIDYNVMKFVEICRAVAQGNLYWSFQTGRYLGPGEVHET GIMYLPAAANLVVA</p>		
Cop4	Extinktionskoeffizient: 63830	41,86 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRPTARQFTLPDLFSICPLQDATNPWYKQAAAESRAWINSYNI FTDRKRAFFIQGSNELL SHVYAYAGYEQFRCCDFVNLFFVDEISDDQNGQDARATGRI FVNAMRDAHWDGSLAKITHEFRERFVRLAGPKTVRR FADLCESYTDVCVAREAEELRERNQVLGNDFIALRQNSAVLLCYSLVEYILGIDLDEVEYEDPTFAKAYWAACDFVCWAND VYSYDMEQAKGHTGNVVTVMKEKDL SLQEASDYIGRECEKQMRDYLEAKSQQLLQSTDL PQEAVRYIEALGYWMVGNL VW SFESQRYFGA QHERVKATHVHLRPSVLEASCDSDSDSDC</p>		
Cyc1	Extinktionskoeffizient: 86860	43,55 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMHAFPHGTTATPTAIAVPPSLRPLVPIEAAFPRQLHPYWPKLQETTRTWLLEKRLMPADKVE EYADGLCYTDLMAGYYLGAPDEVLQAIADYSAWFFVWDDRHDRDIVHGRAGAWRRRLGLLHTALDSPGDHLHEDTLVAGF ADSVRRLYAFLPATWNARFARHFHTVIEAYDREFHNRTRGIVPGVEEYLELRRLTFAHWIWTDLLEPSSGCELPDAVRKHP AYRRAALLSQEFAAWYNDLCSLPEIAGDEVHNLGISLITHHSLTLEEAI GEVRRRVEECITEFLAVERDALRFADELADG TVRGKELSGAVRANVGNMRNWFSVYWFHHESGRYMVDSDDRSTPPYVNEAAGEK</p>		
GcoA	Extinktionskoeffizient: 54430	40,07 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSQITLPAFHMPFQSAGCHPGLAETREAAEWAAAEGLDLSPARRKMIRTRPELWISLIF PQATQAHLDLFCQWFLWAFVLDDEFDDGPAGRDPLMCEARAIARLVDFVDGGAAPNGPMERALAGLDRTRCRGRSPQWNRQFR RDAAWLWYTYAAEVERAAGQVPSRAEFAKHRDVSAMQPFLCLHEITAGIDL PDSARSLPAYIALRNAVTDHSGLCNDIC SFEKEAALGYEHNAVRLIQRDRGSTLQEAVDEAGIQLARIAERVQRAERELIEEIEAAGIDGPTRTALERCVRDYRGLVRG DFDYHARAERYTRPDLVELDERDSL SRHFAA</p>		
Hvs1	Extinktionskoeffizient: 93170	66,48 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAPAIVMSNYEEEEIVRPVADFSPSLWGDHFSFSVDNQVAEKYAQEIETLKEQTSTMLSA ACGTTL TEKLNLDIIEERLGIAYHFEKQIEDMLDHIYRADPYFEAHEYNDLNTSSVQFRLLRQHGYNVSPNIFSRFQDANG KFKELSRSDIRGLLNLYEASHVRTHKEDILEEALVFSVGHLESAAPHLKSPLSKQVTHALEQSLHKSIPRVEIRYFISIIYE EEEEFKNDLLLRFKLDYNLLQMLHKHELSEVSRWWDLDVFTTLPYARDRAVECYFWTMGVYAEPPQYSQARVMLAKTIAMI SIVDDTFDAYGIVKELEVYTDAIQRWDISQIDRLPEYMKISYKALLDLYDYEKELSKDGRSDVVHYAKERMKEIVGNFYFI EGKWFIEGYMPSVSEYLSNALATSTYLLTTTSSYLGMSKATKEHFEWLAKNPKILEANATLCRVVDDIATYEVKGRGQIA TGIECYMRDYGVSTEVAMEKQEMADI AWKDVNEILRPTPVSEILTRILNLARIIDVYKHNQDGYTHPEKVLKPHIIA LVVDSIDI</p>		
PenA	Extinktionskoeffizient: 60390	43,07 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGGRGSMQDQVDFHIPLPGRQSPDHARAEAEQLAWPRSLGLIRSDAAAERHLR GGYADLASRFYPHATGADLDLGVDLMSWFFLFDLLFDGPRGENPEDTKQLTDQVAAALDGPLPDTAPPIAHGFADIWRRTC EGMTPAWCARSARHWRNYFDGYVDEAESRFWNAPCDSAAQYLAMRRHTIGVQPTVDLAERAGRFEVPHRVFDSAVMSAMLQ IAVDVNLLLNDIASLEKEEARGEQNNMVMILRREHGWSKRSVSHMQNEVRARLEQYLLLESCLPKVGEIYQLDTAEREAL ERYRTDAVRTVIRGSYDWHRSSGRYDAEFALAGAAGQYLEELGSSAHKLAAL EHHHHHH</p>		
Tps32	Extinktionskoeffizient: 87210	65,53 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMALLNNQDEIVRPVANFSPSLWGDHFSFSLDNQVADKYAQEIETLKEQTRSLSDAACGT TLAEKLNLDIIVERLGLAYHFEKQIEDMLDQIYKADPNFEAHDNLNTLSLQFRILRQHGYNISQKIFSRFQDANGKFKESLS NDIKGLLNLYEASHVRTHGEDILEEALAFSTAHLESAAPHLKSPLSKQVTHALEQSLHKSIPRVETRYFISIIYEEEEFKND VLLRFKLDYNLLQMLHKQELSEVSRWWDLDVFTTLPYARDRAVECYFWTMGVYAEPPQYSQARVMLAKTIAMISIVDDTF DAYGIVKELEVYTDAIQRWDISQMDRLPEYMKVSKALLDLYDYEKELSKDGRSDVVQYAKERMKEIVRNYFVEAKWFI GYMPPVSEYLSNALATSTYLLTTTSSYLGKVSATKEDFEWLAKNPKILEANVTLCRVVDDIATYEVKGRGQIATGIECYM RDYGVSTQVAMDKFQEMAEI AWKDVNEGILRPTPVSTEILTRILNLARIIDVYKHNQDGYTHPEKVLKPHIIALLVDSIE I</p>		
Tri5	Extinktionskoeffizient: 79300	46,16 kDa
<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMENFPTTEYFLNNTVRLLEYIRYRDSYTRREIENLHYAYNKAHHFALPRQQQLLKVDPK RLQASLQITIVGMVVYSWAKVSKEMADLSIHYYTYLVLDSSKDDPYTMVNYFDDLQAGREQAHPWALVNEHFPNVLRFH GPFCSLNIRSTLDFEFGCWEIEQYNFGGFPGSYDQFLRRMNLGHCVGASLWPKEQFNERSLFEITSAIAQMGEMWVW VNDLMSFYKEFDDERDQISLVKNYVVSDEISLHEALEKLTQDTLHSSKQMVAVFSDKDPQVMDTIECFMHGYVTVHLCDRR YRLSEIYEKVKEEKTEDAQKCFKRYEQAAVNGAVSPSEWAYPPVAQLANVRSKDVKEVQKPFLLSIELVE</p>		

7.2 Primersequenzen

Die zur Sequenzierung und für die Kolonie-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 47 zusammengefasst. Die Primer für die gezielte Mutagenese mittels PCR befinden sich in Tabelle 48.

Tabelle 47: Primer für Sequenzierung und Kolonie-PCR.

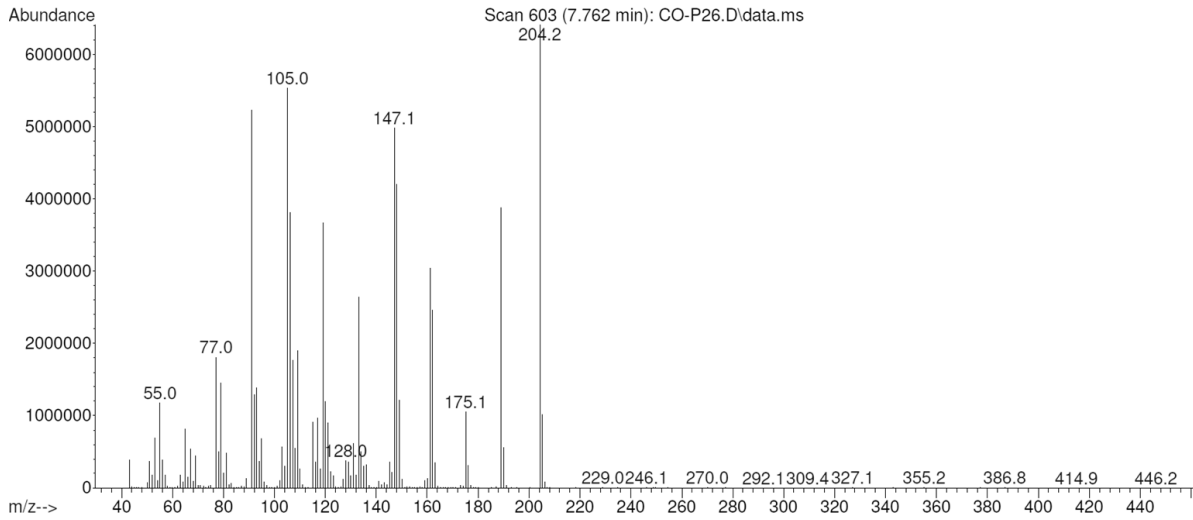
RP-Primer	5' CTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
T7minus-Primer	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Tabelle 48: Primer zur zielgerichteten Mutagenese mittels PCR. Im Vorwärtsprimer wurden die Basen markiert, die bei der Mutagenese ausgetauscht wurden.

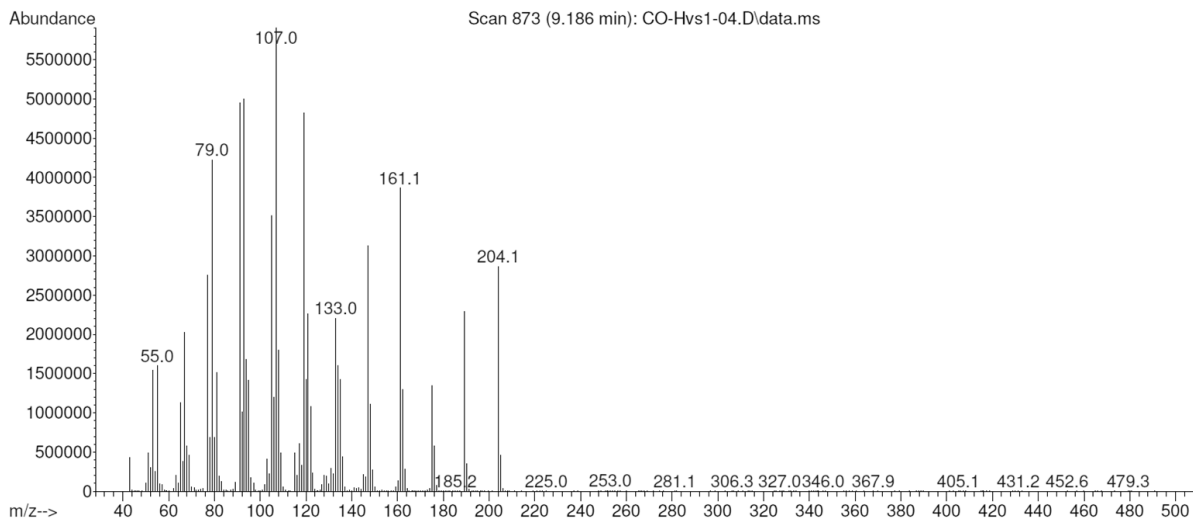
PenA-Mutanten	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Y50F	5' CCTGCGTGGTGGCTTTGCCGATCTGG 3'	5' CCAGATCGGCAAAGCCACCACGCAGG 3'
F77W	5' GAGCTGGTTTTGGCTGTTTCGATGATC 3'	5' GATCATCGAACAGCCAAAACCAGCTC 3'
F77Y	5' GAGCTGGTTTTATCTGTTTCGATGATC 3'	5' GATCATCGAACAGATAAAACCAGCTC 3'
Tri5-Mutanten		
Y93F	5' CCTGAGCATCCACTTCACCTACACCC 3'	5' GGGTGTAGGTGAAGTGGATGCTCAGG 3'
D100E	5' CCCTGGTTCTGGAAGACAGCAAAGACG 3'	5' CGTCTTTGCTGTCTCCAGAACCAGGG 3'
Cop4-Mutanten		
V83A	5' GCTGCGACTTCGCGAATCTGCTGTTTCG 3'	5' CGAACAGCAGATTCGCGAAGTCGCAGC 3'
F87V	5' CGTGAATCTGCTGGTCGTGGTGGACG 3'	5' CGTCCACCACGACCAGCAGATTCACG 3'

7.3 Ausgewählte Massenspektren von Biotransformationsprodukten

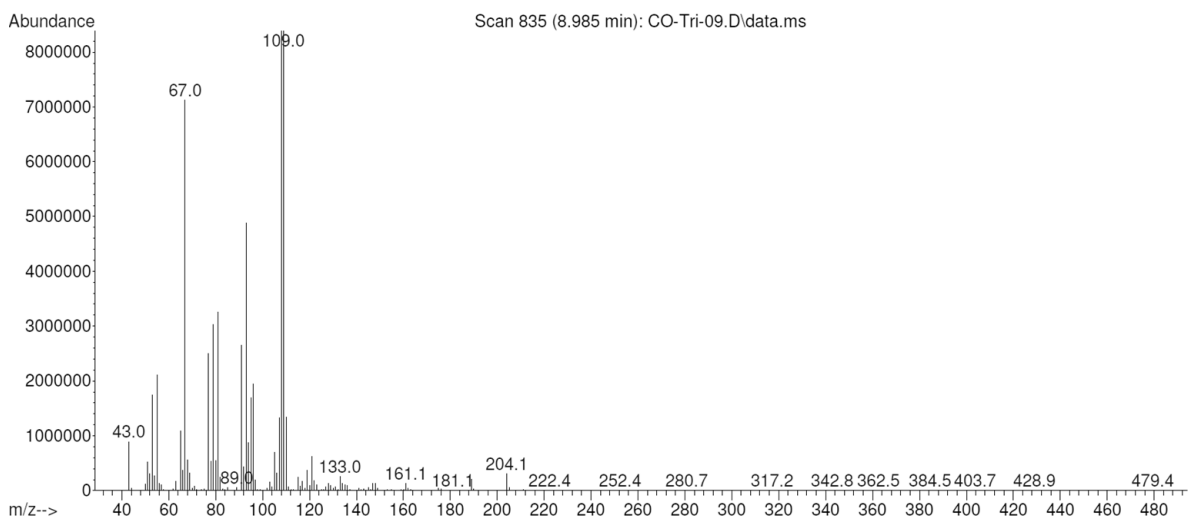
Pentalenen (33)



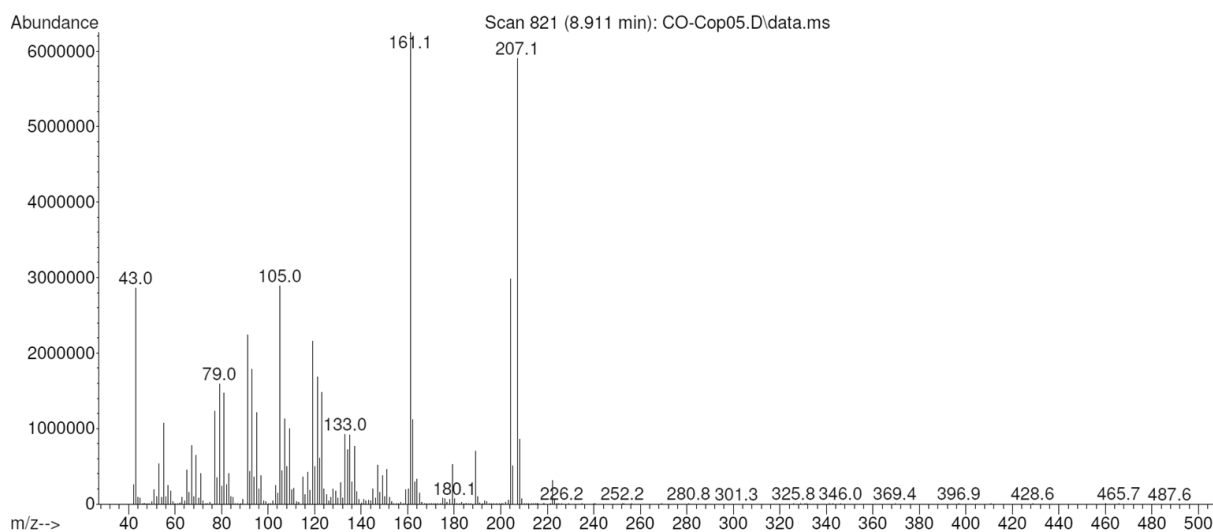
Vetispiradien (34)



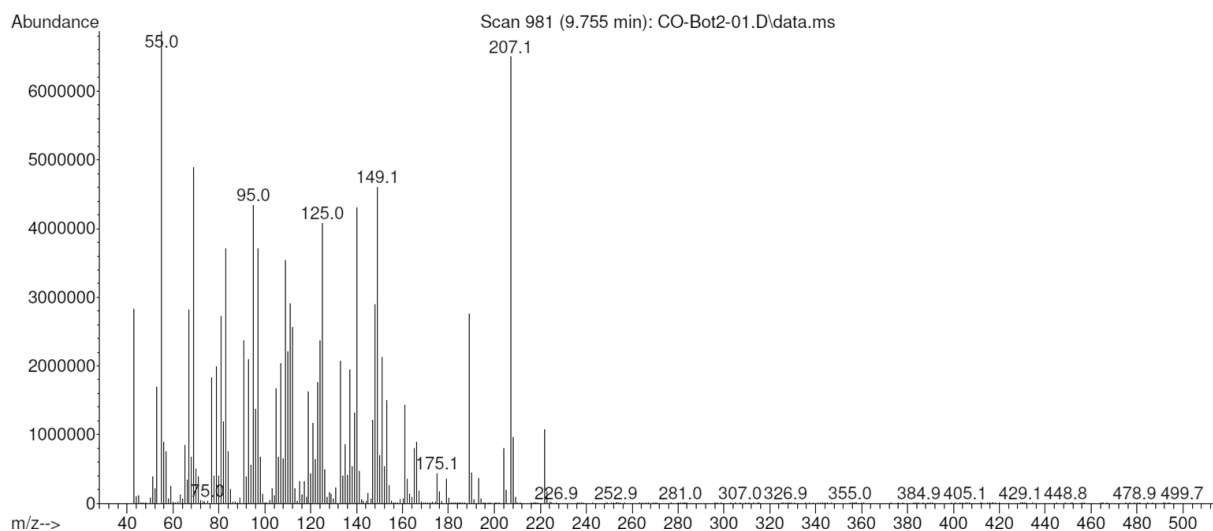
Trichodien (35)



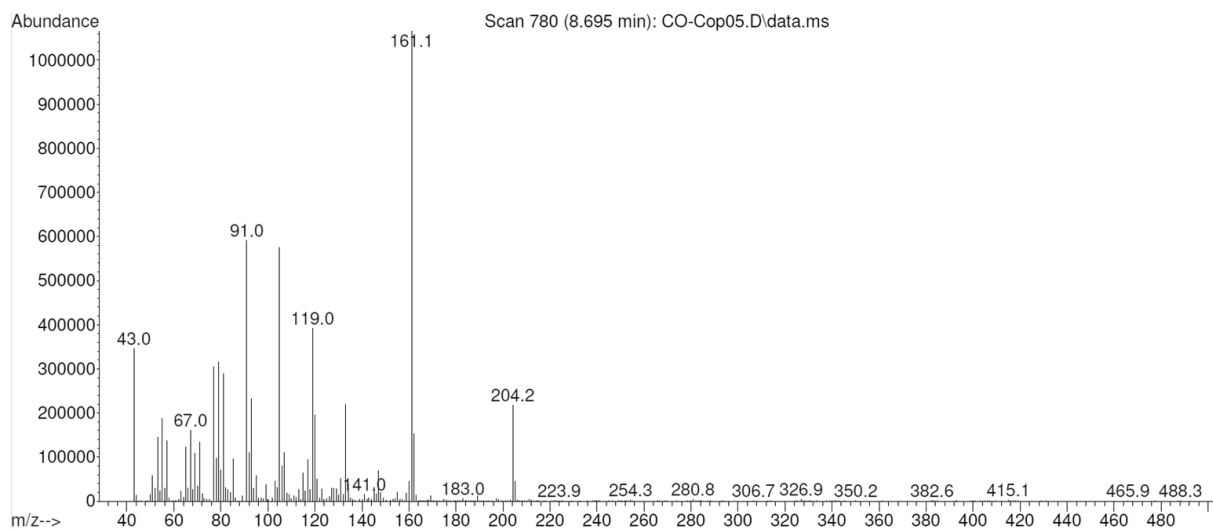
Cubebol (37)



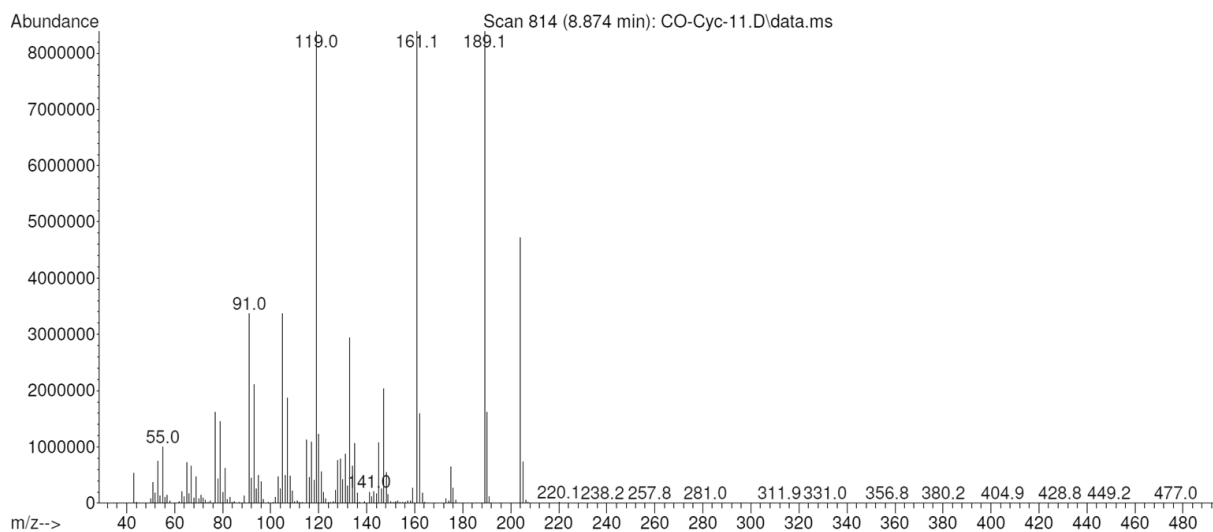
Presilphiperfolan-8- β -ol (61)



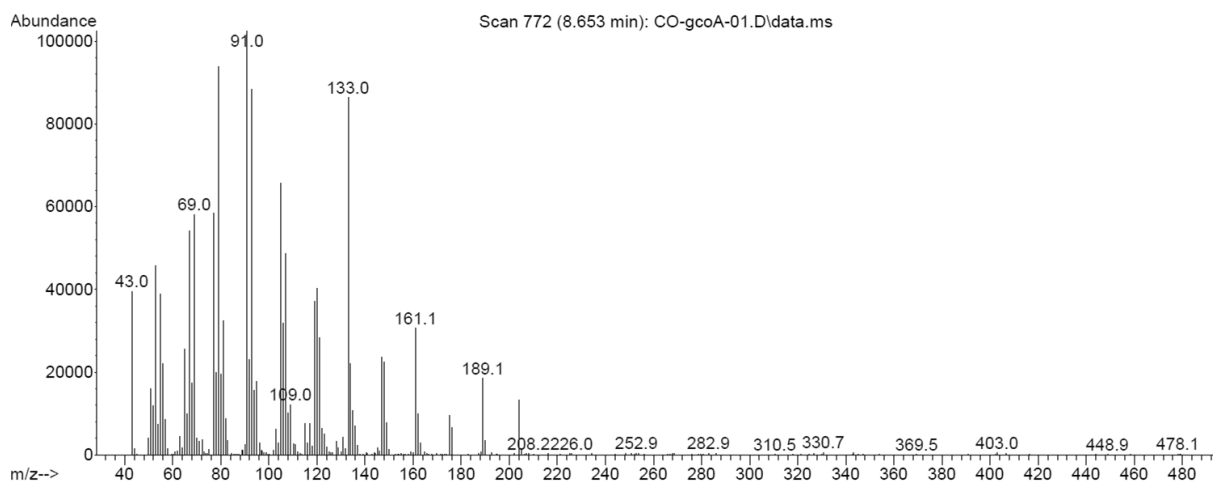
(-)-Germacren D (64)



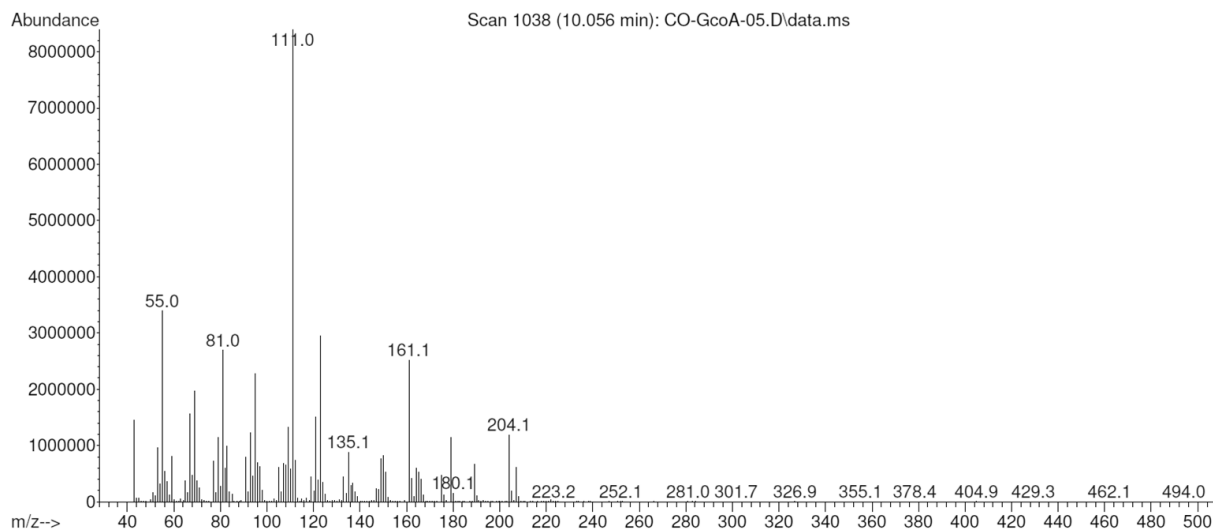
Epi-Isozizaen (92)



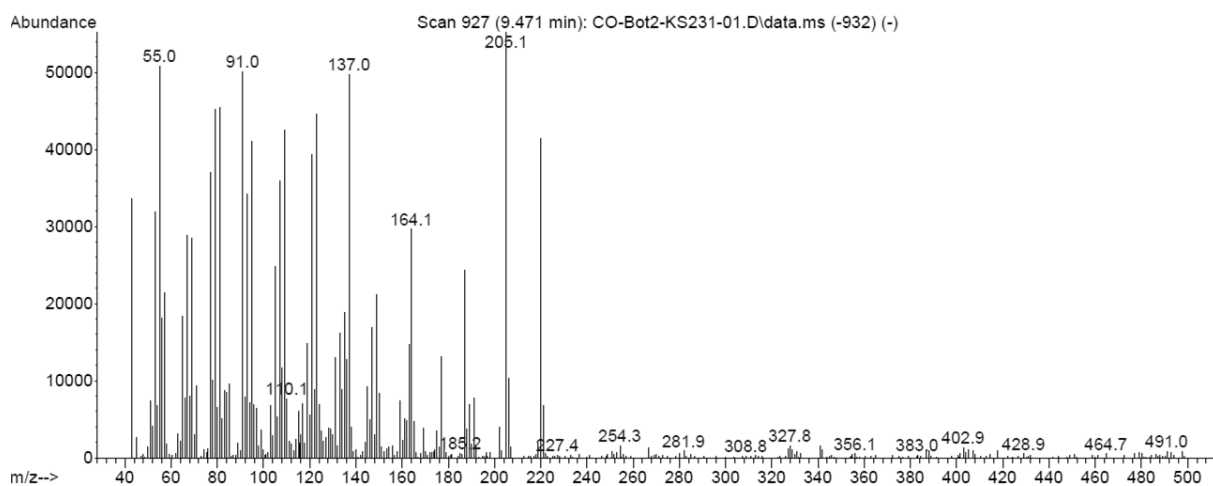
β -Caryophyllen (94)



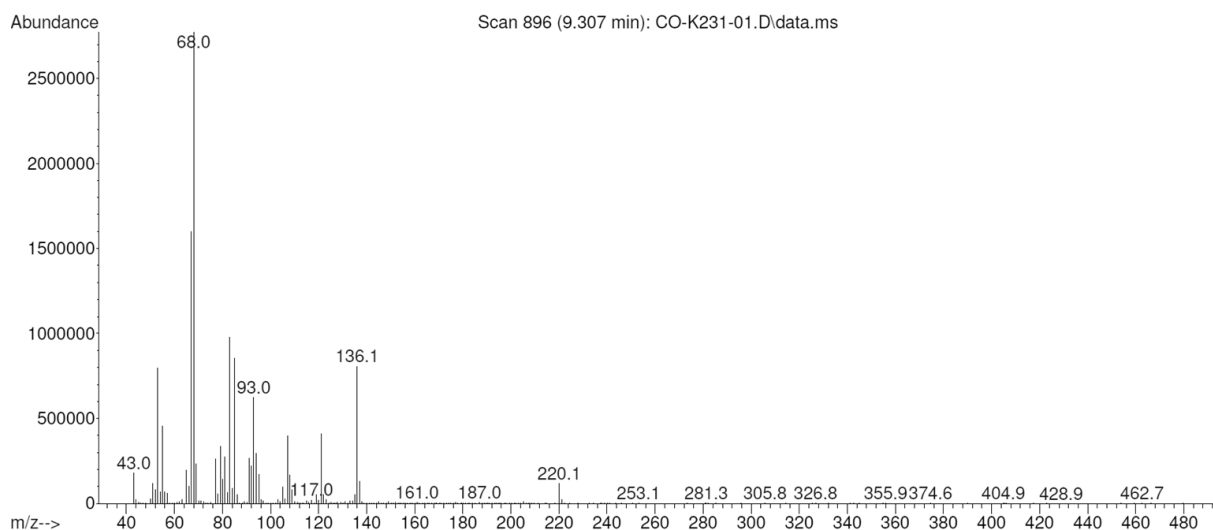
(+)-Caryolan-1-ol (95)



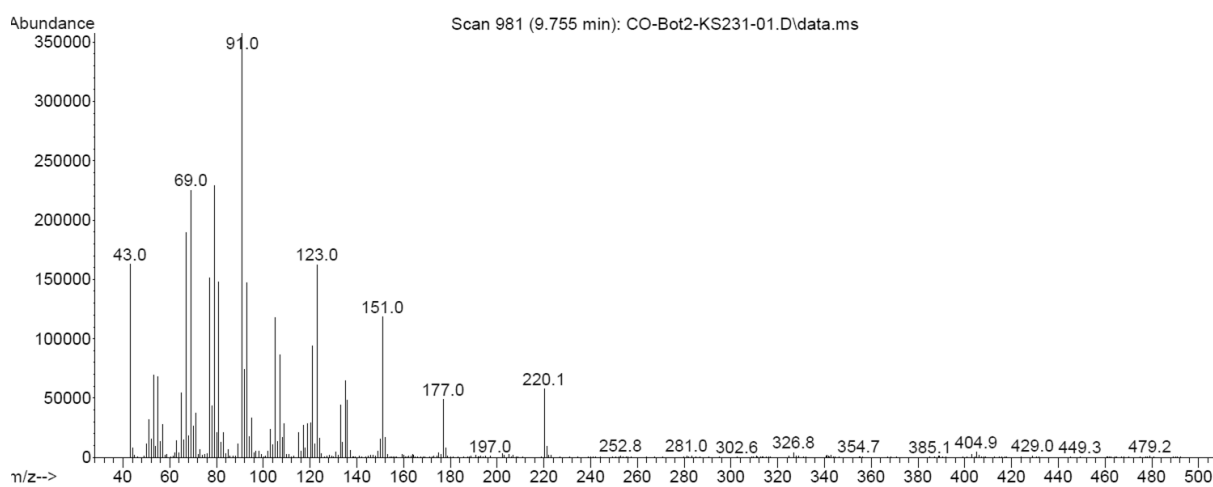
Sesquiterpenoid 157



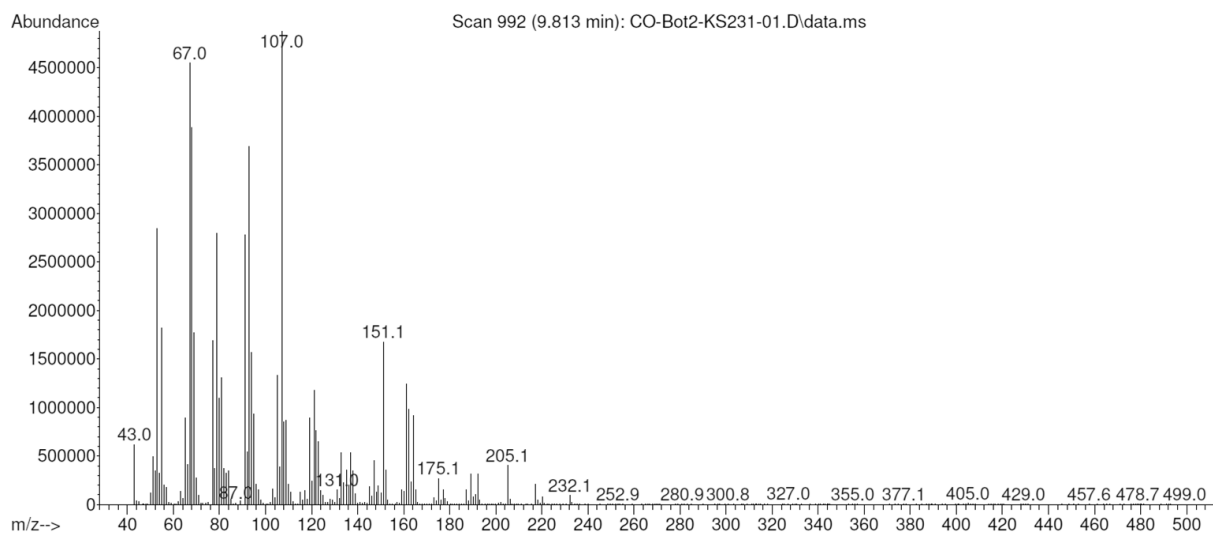
Sesquiterpenoid 158



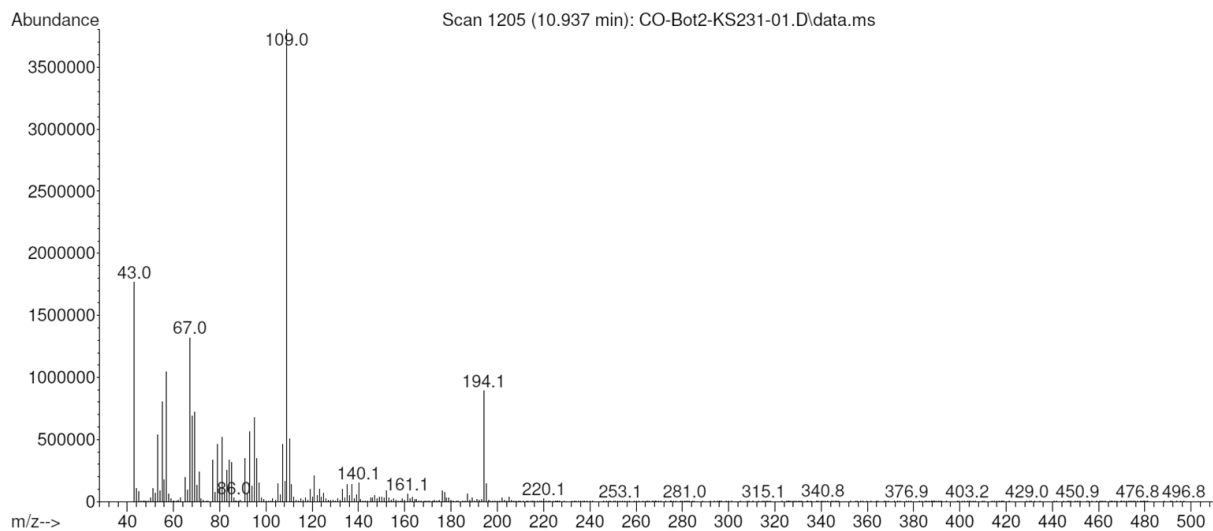
Sesquiterpenoid 159



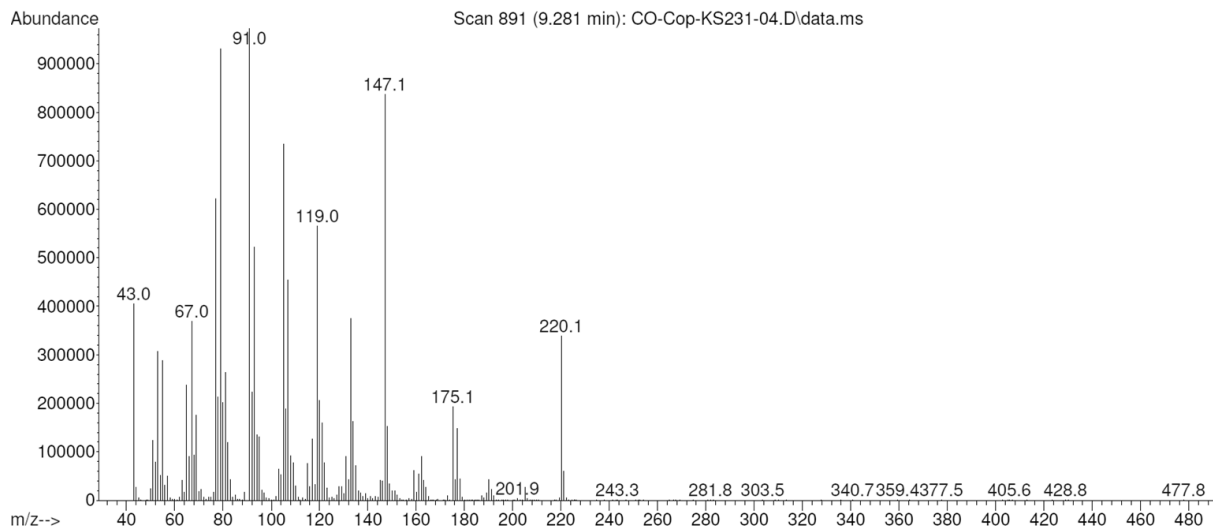
Sesquiterpenoid 160



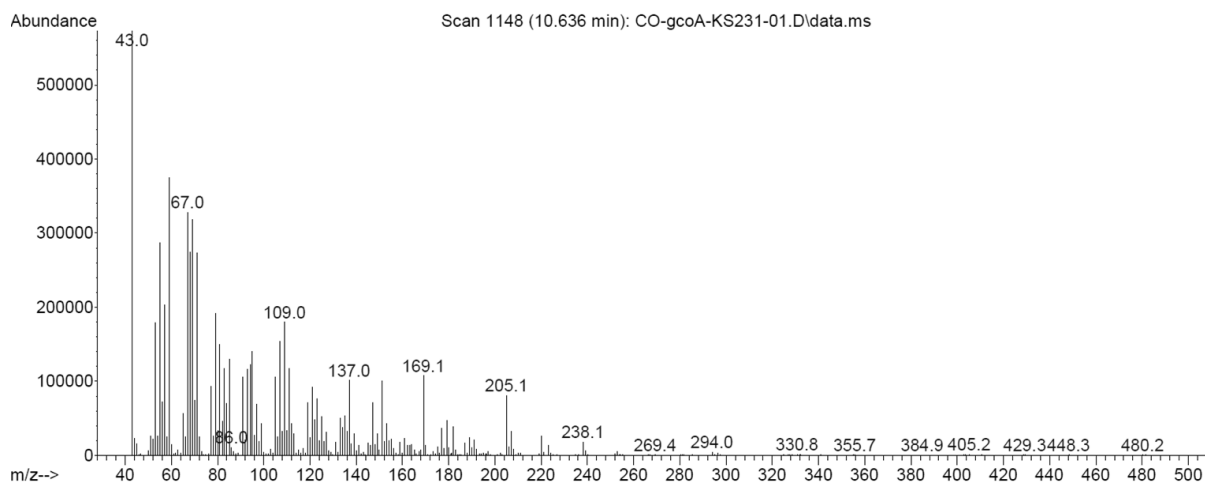
Sesquiterpenoid 161



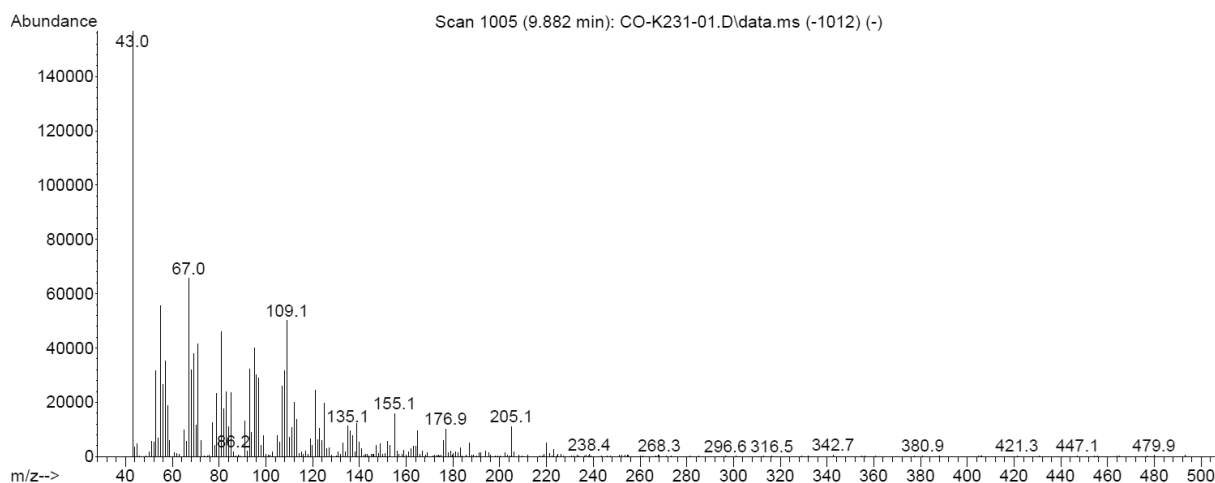
Sesquiterpenoid 162



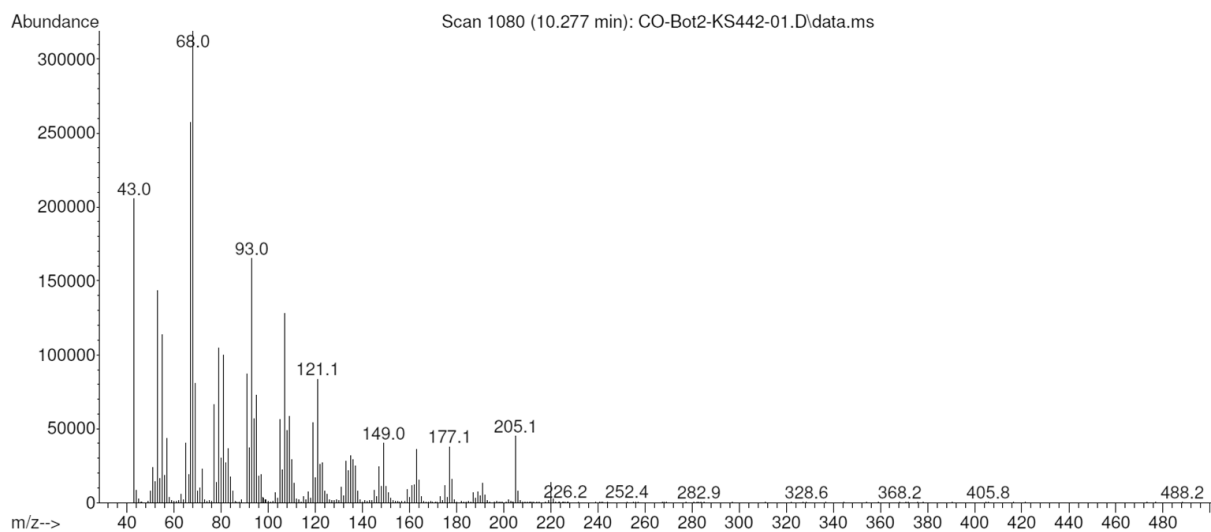
Sesquiterpenoid 163



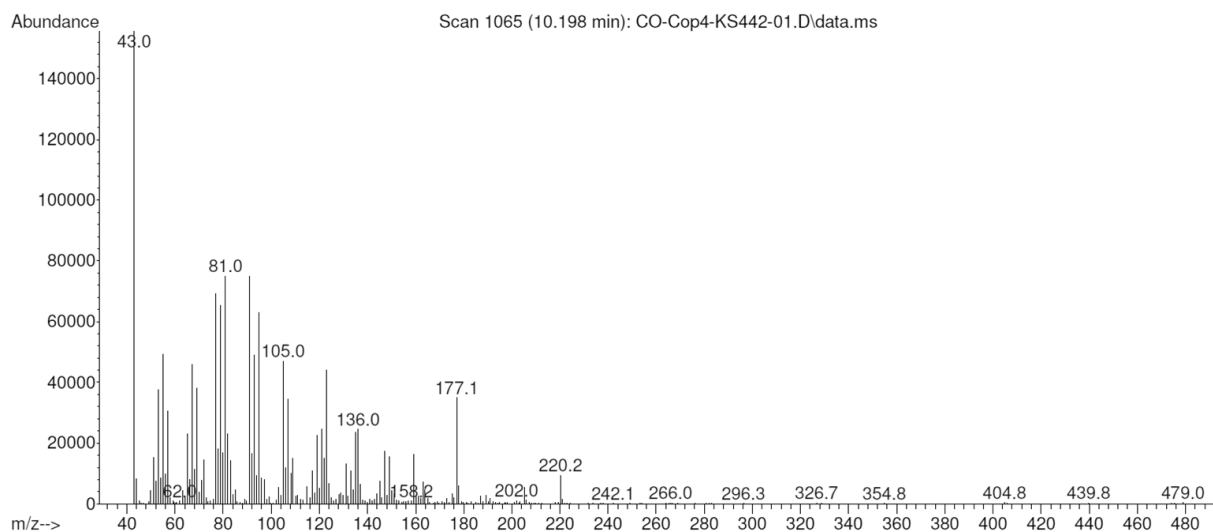
Sesquiterpenoid 164



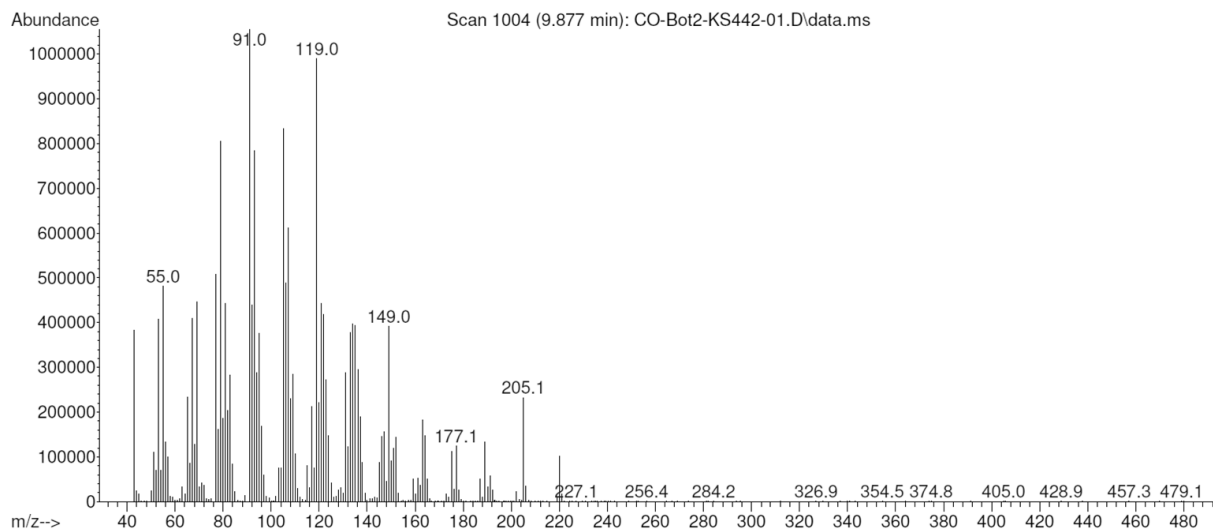
Sesquiterpenoid 166



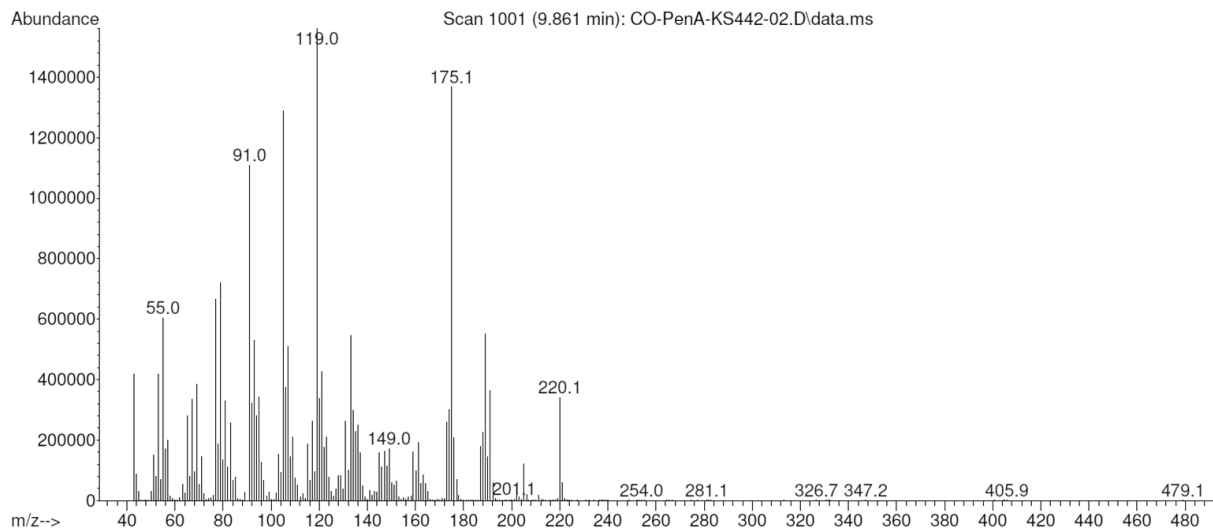
Sesquiterpenoid 167



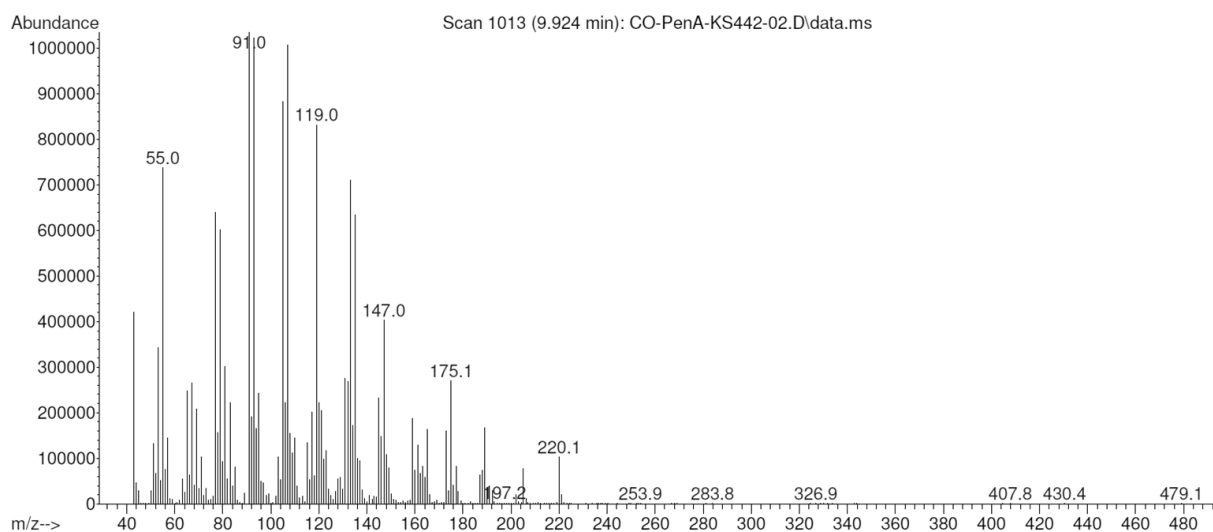
Sesquiterpenoid 168



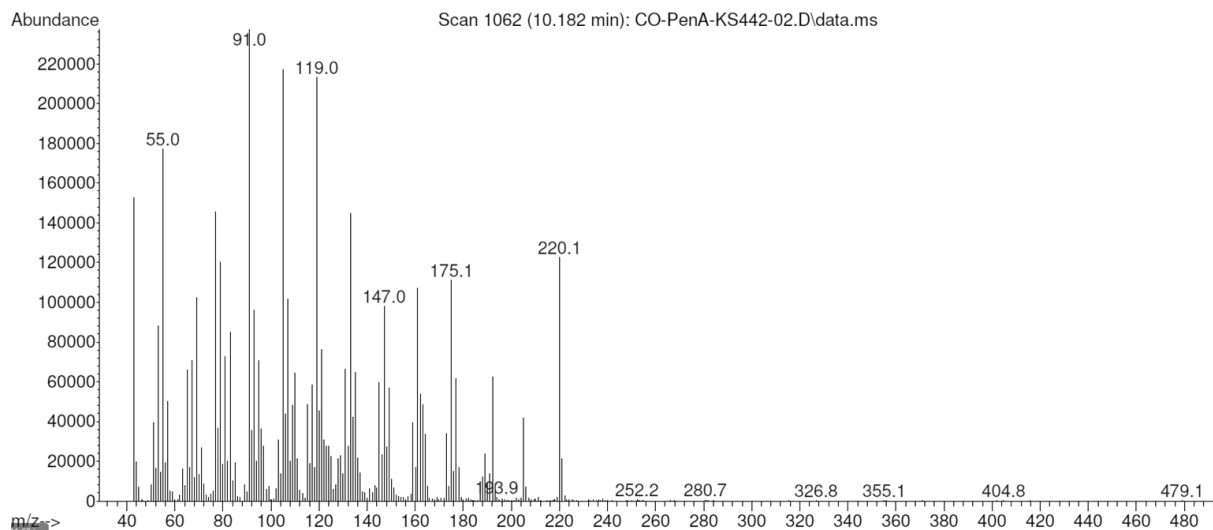
Sesquiterpenoid 169



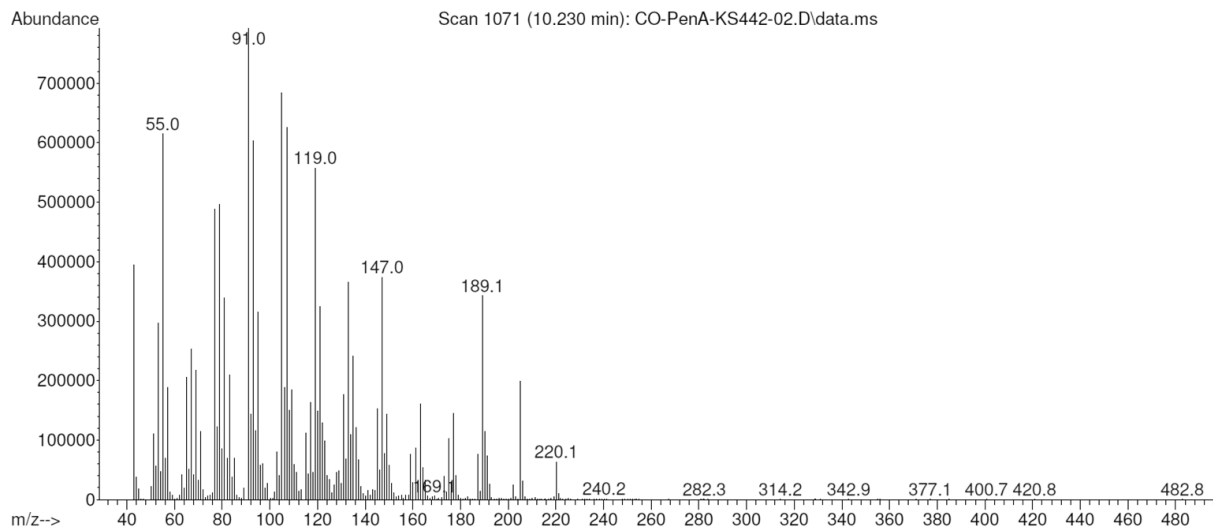
Sesquiterpenoid 170



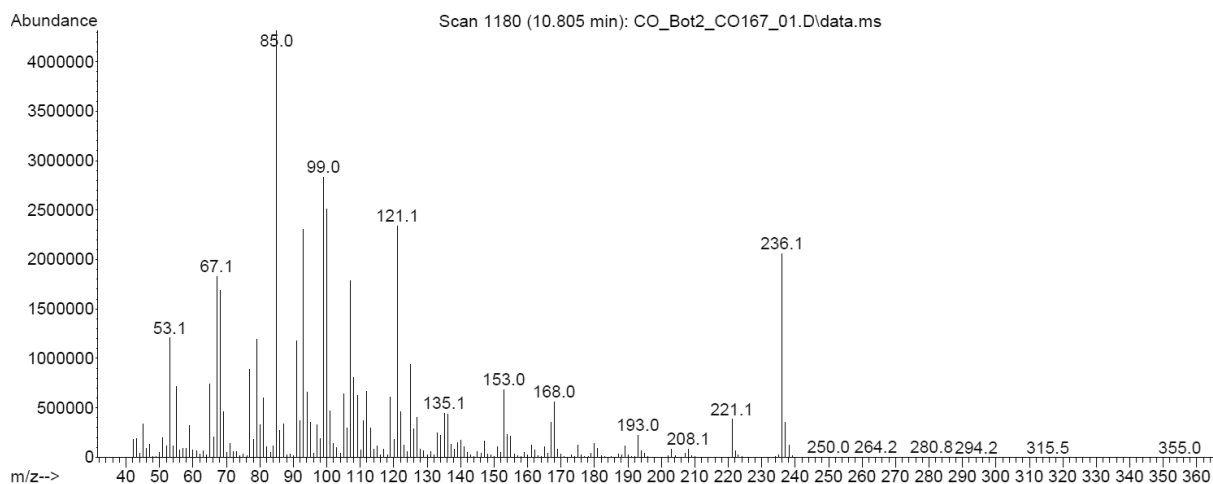
Sesquiterpenoid 171



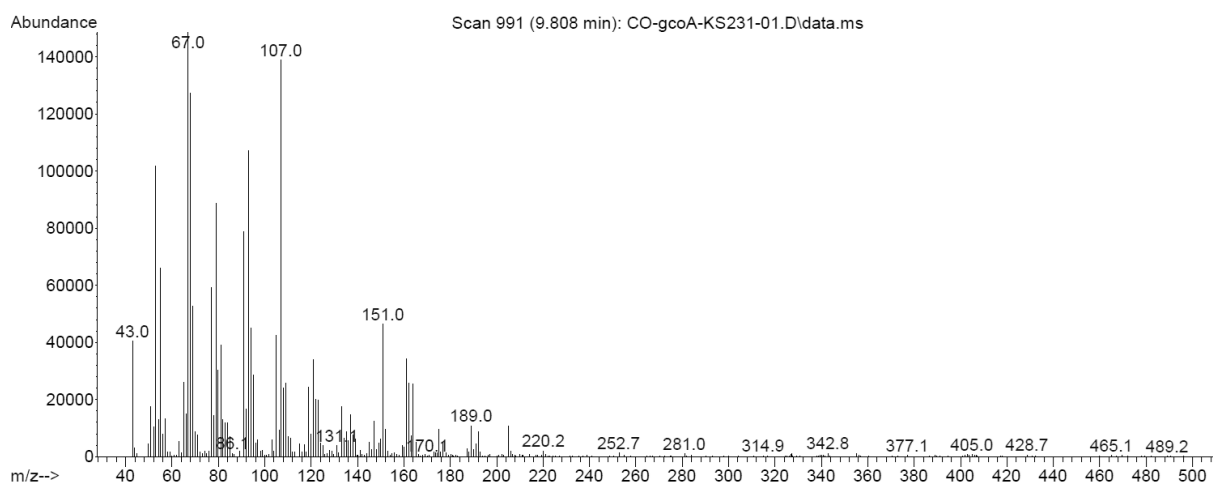
Sesquiterpenoid 172



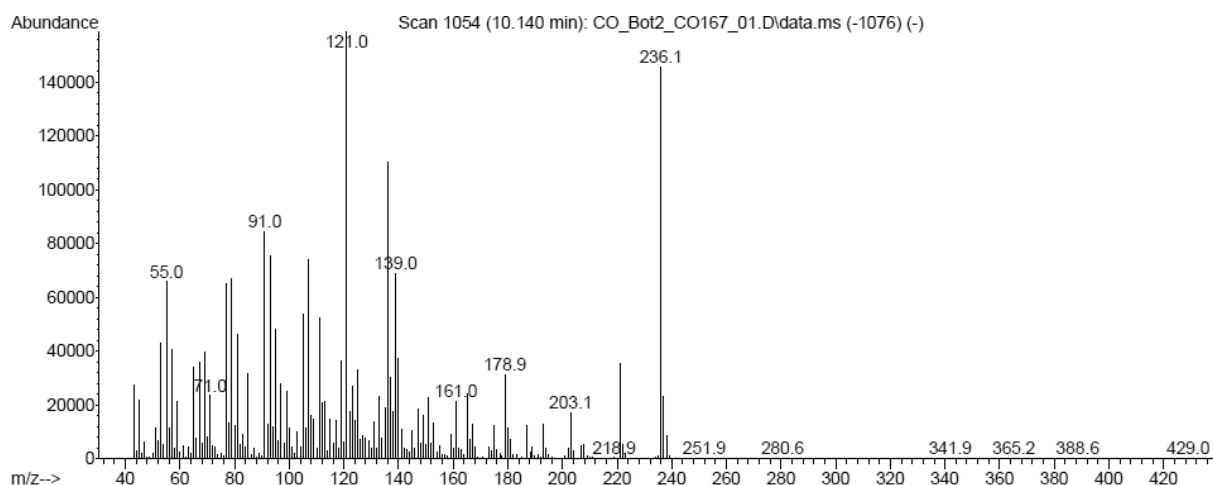
Sesquiterpenoid 173



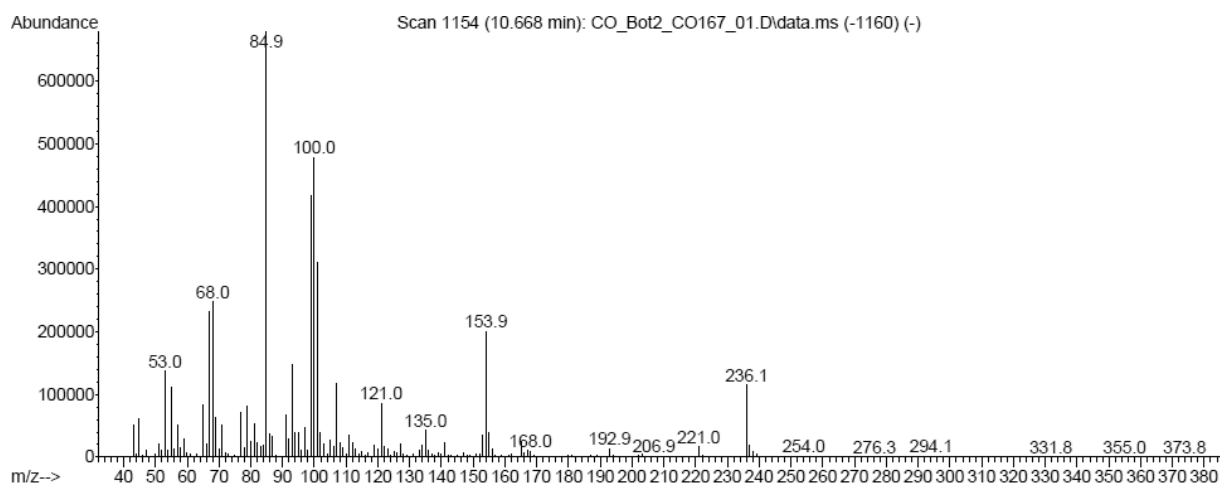
Sesquiterpenoid 174



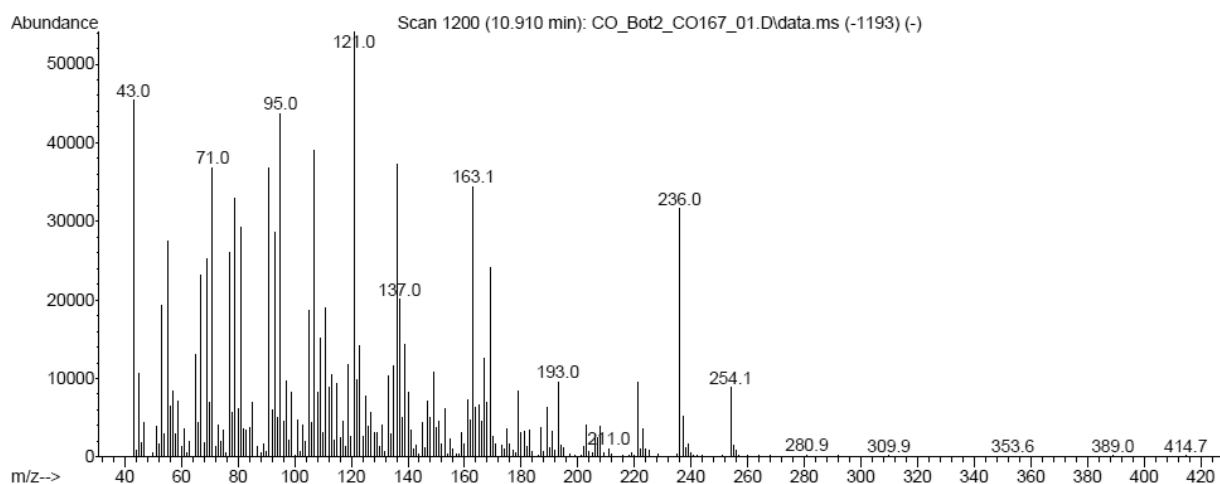
Sesquiterpenoid 175



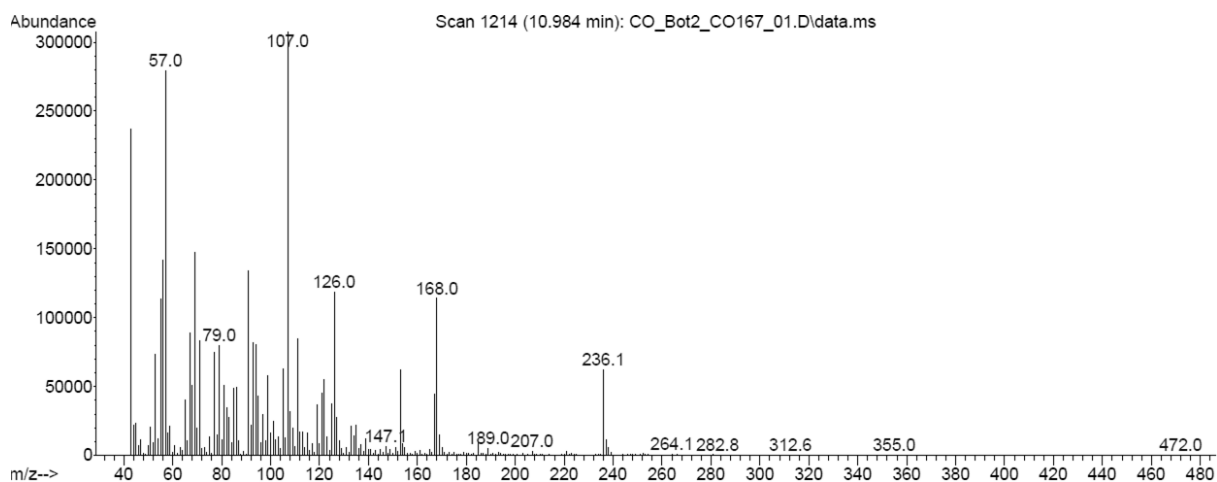
Sesquiterpenoid 176



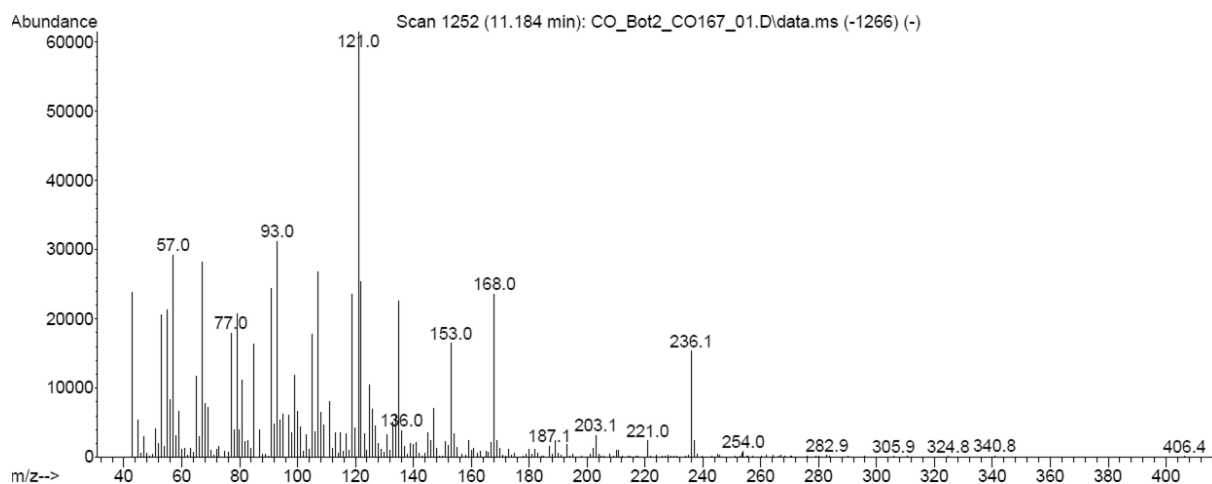
Sesquiterpenoid 177



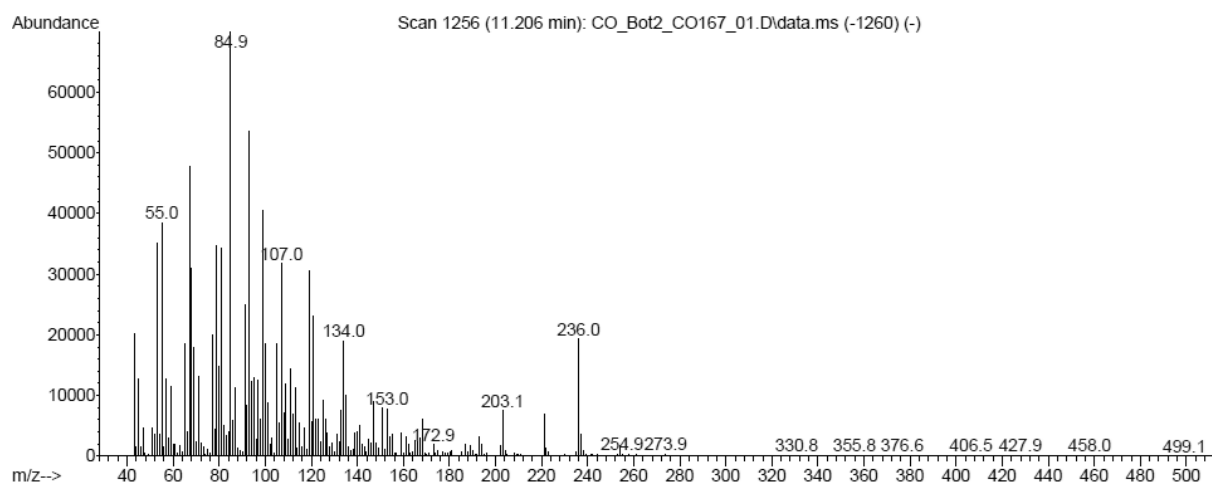
Sesquiterpenoid 178



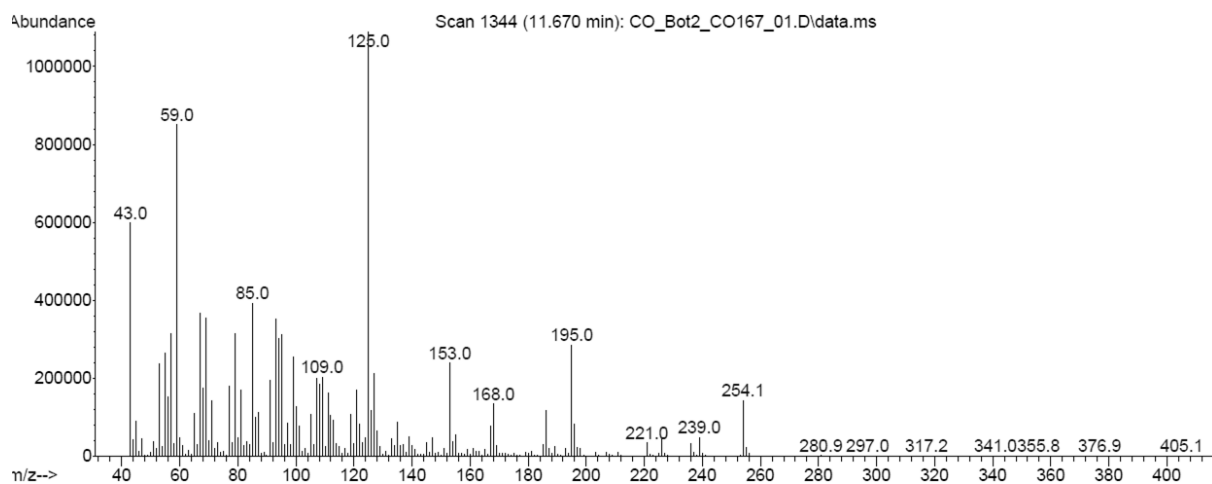
Sesquiterpenoid 179



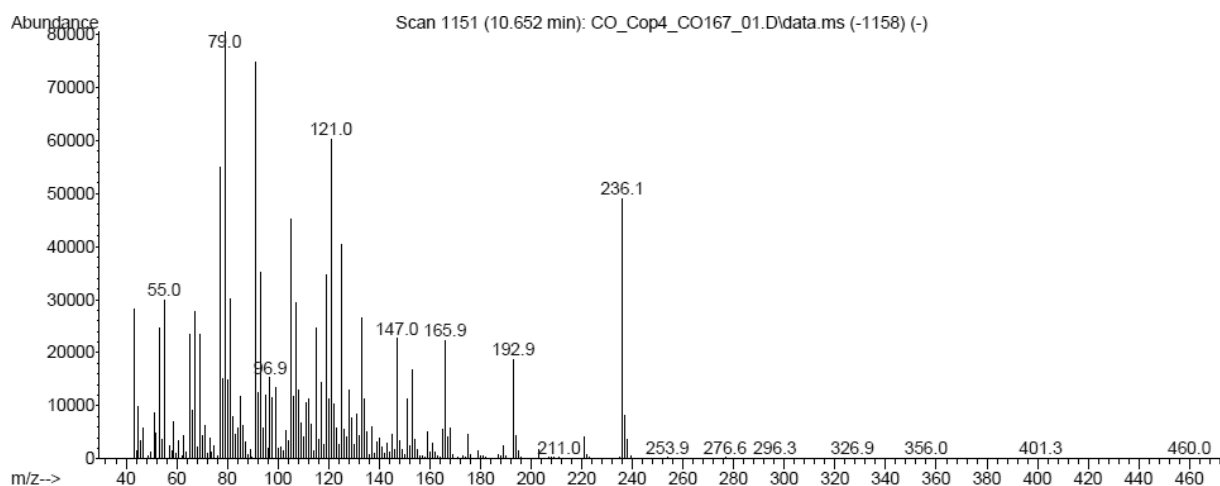
Sesquiterpenoid 180



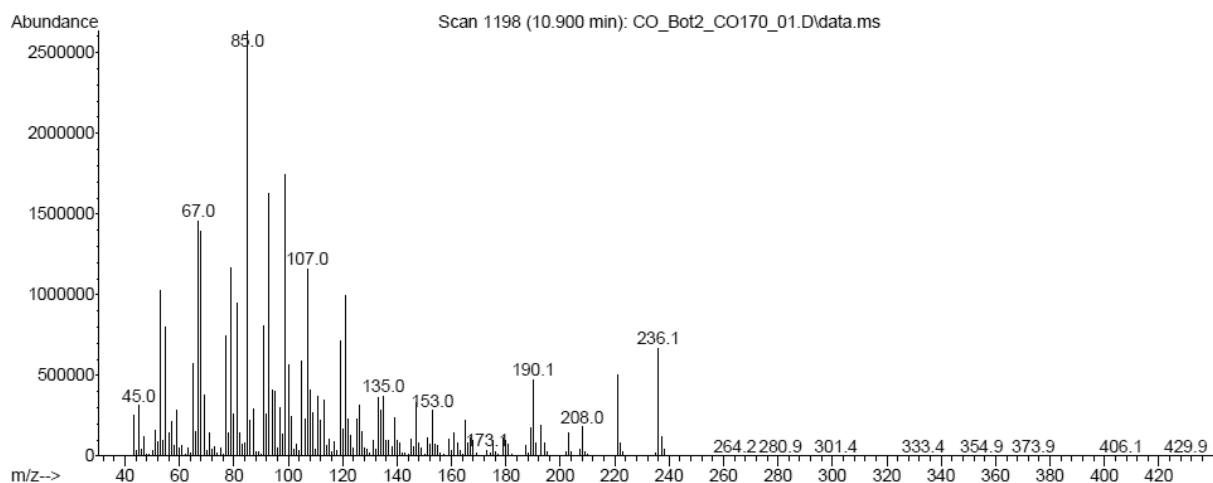
Sesquiterpenoid 182



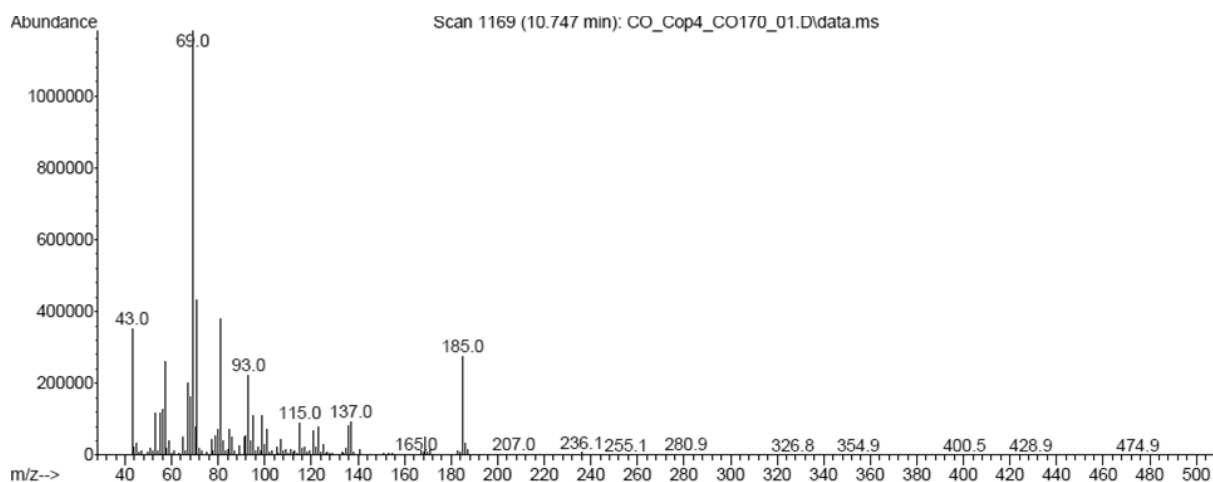
Sesquiterpenoid 183



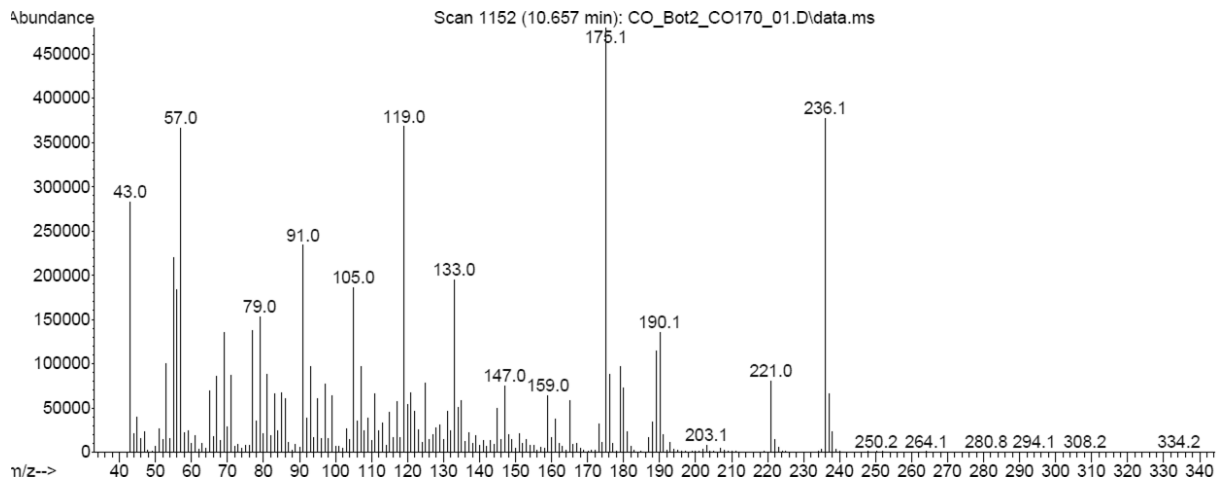
Sesquiterpenoid 185



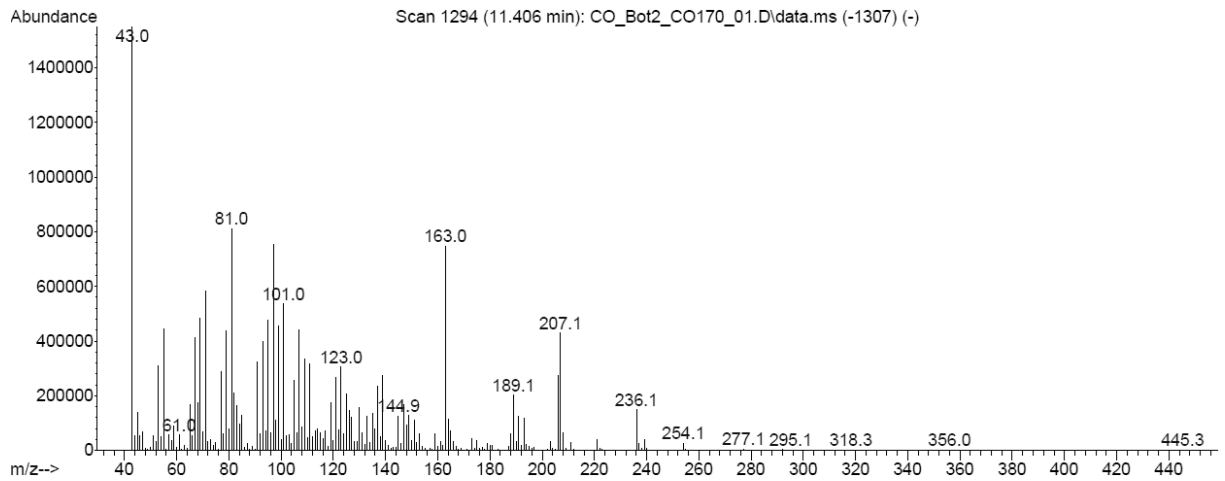
Sesquiterpenoid 186



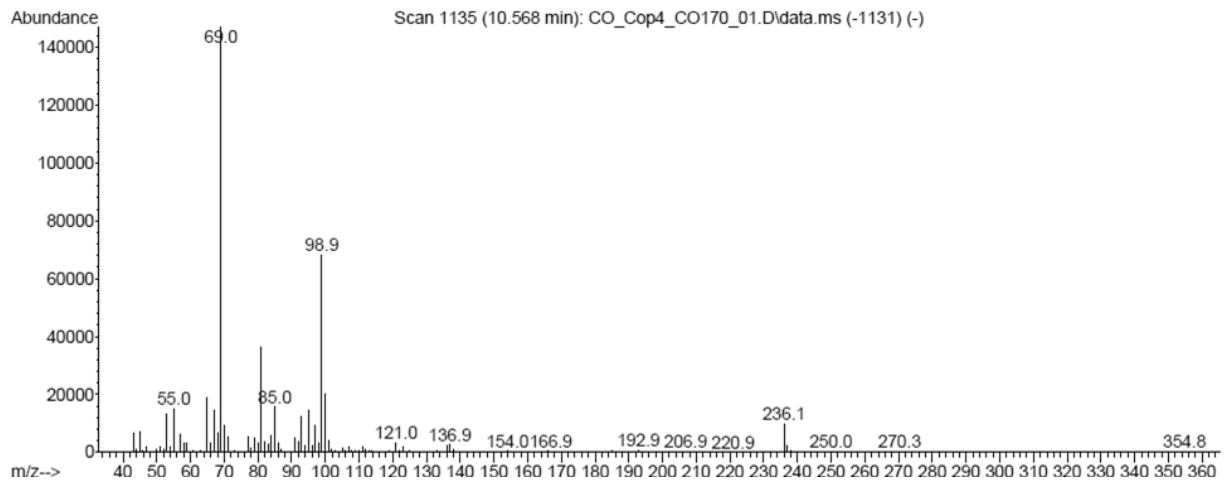
Sesquiterpenoid 187



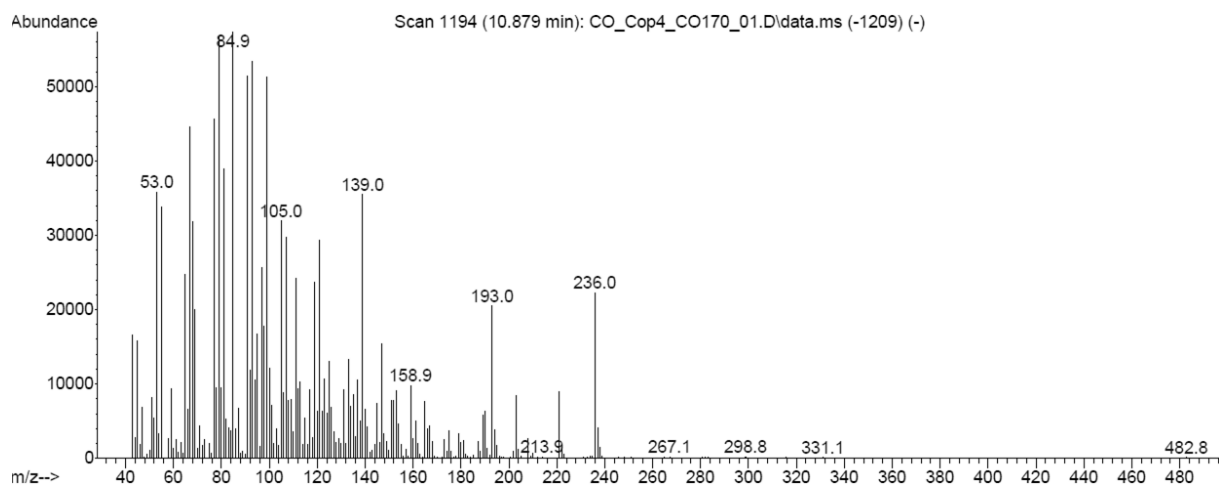
Sesquiterpenoid 188



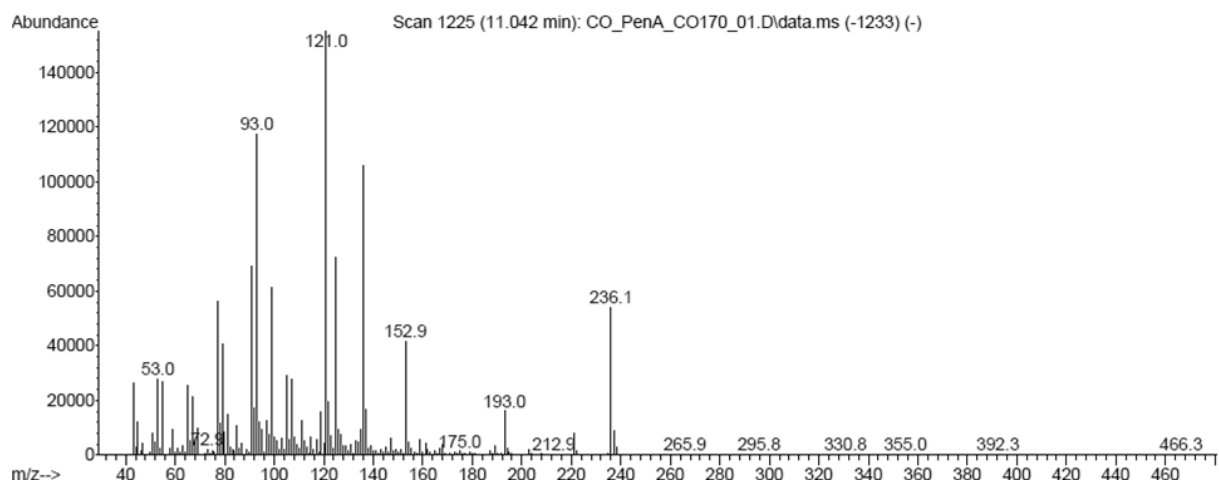
Sesquiterpenoid 189



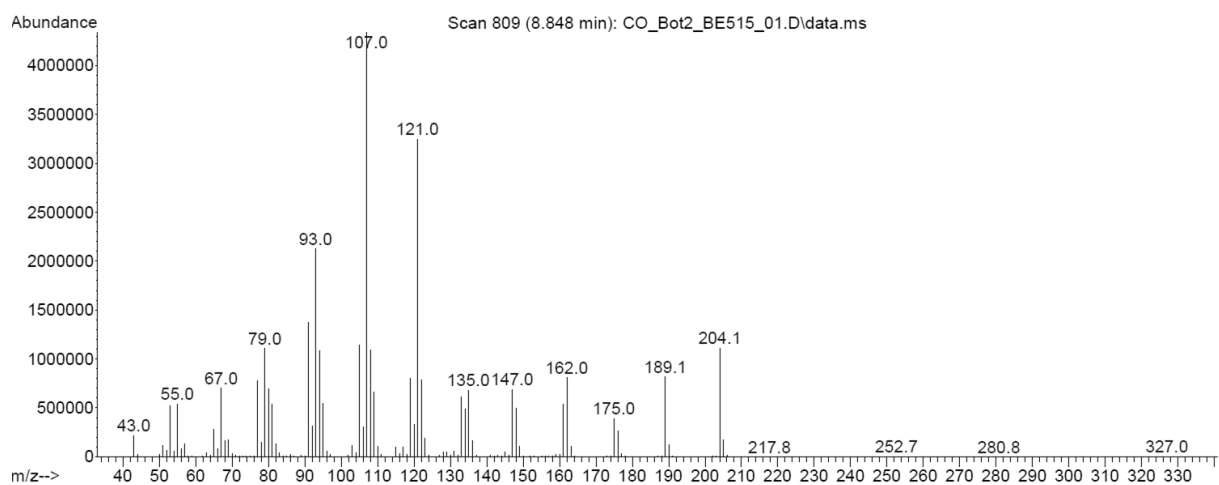
Sesquiterpenoid 190



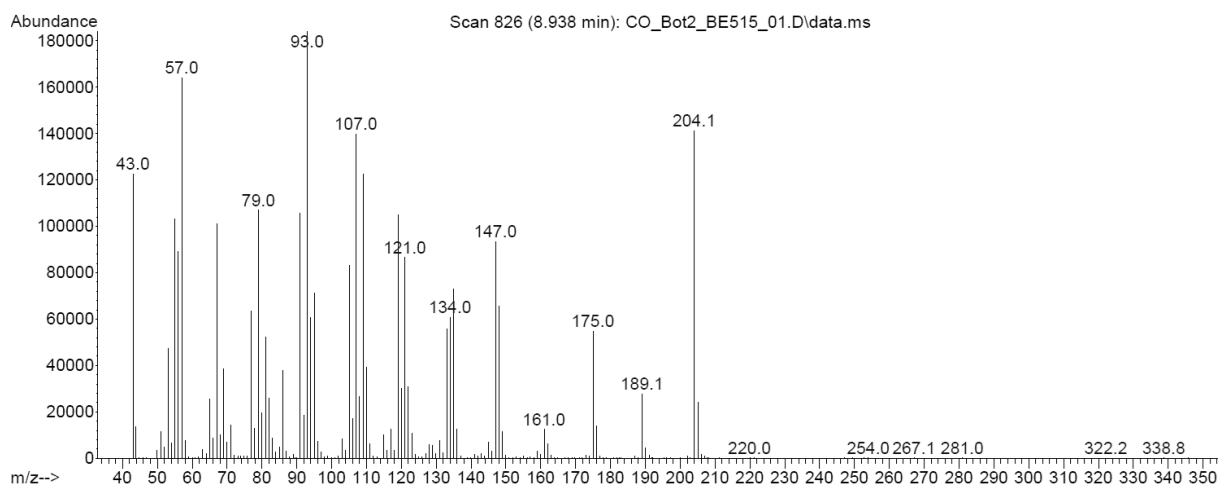
Sesquiterpenoid 191



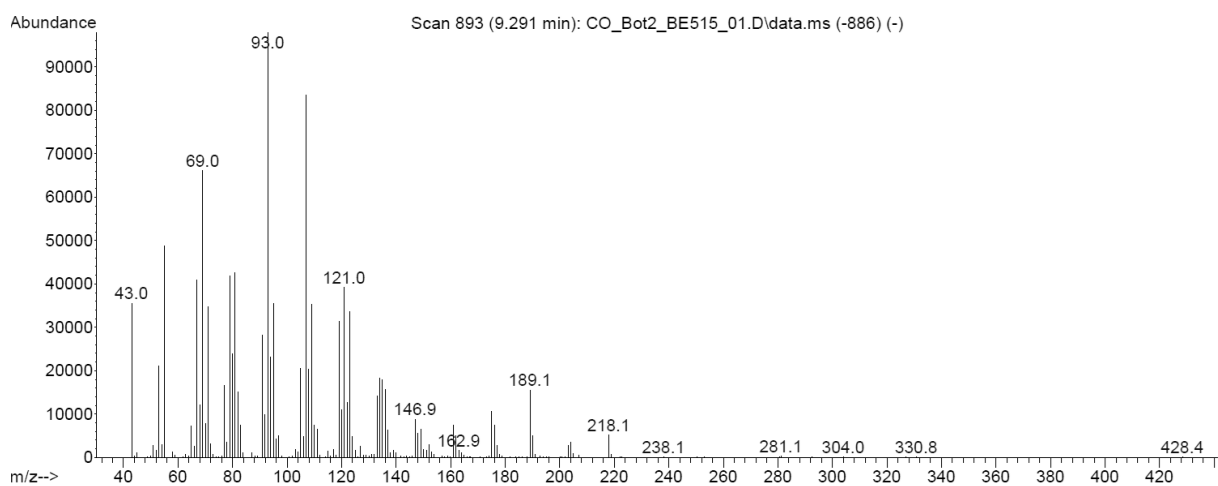
Sesquiterpenoid 206



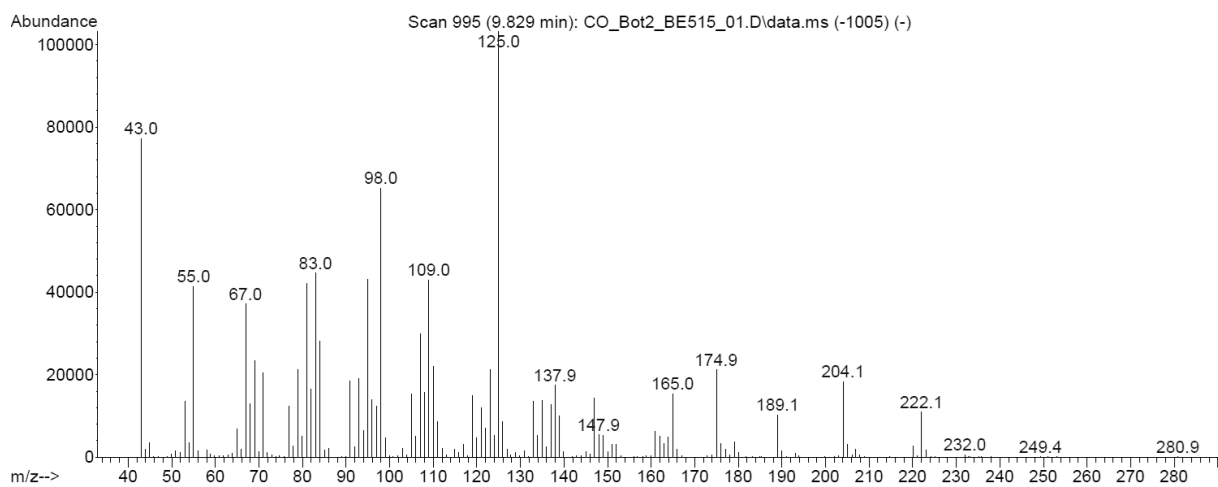
Sesquiterpenoid 207



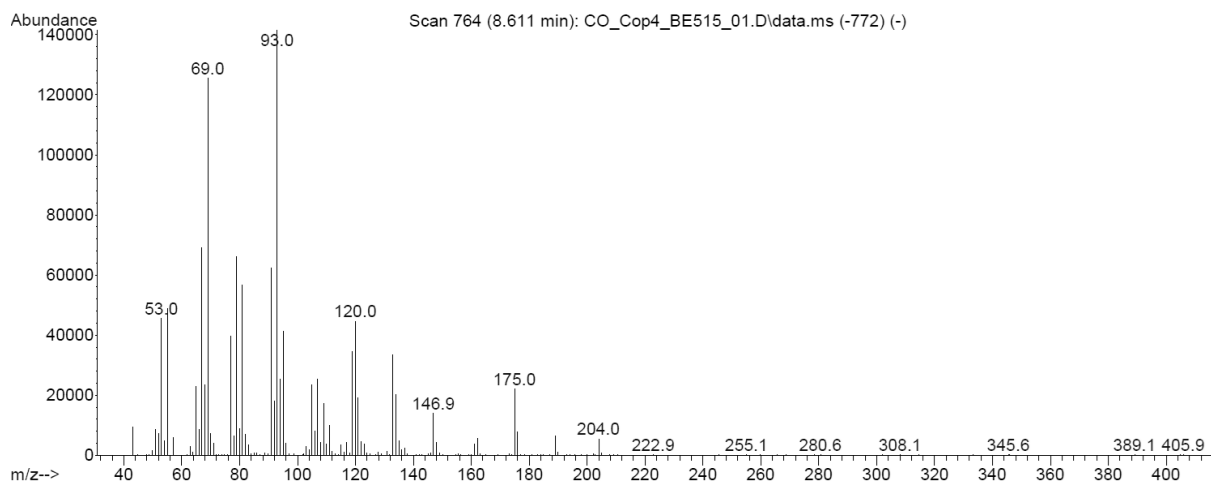
Sesquiterpenoid 208



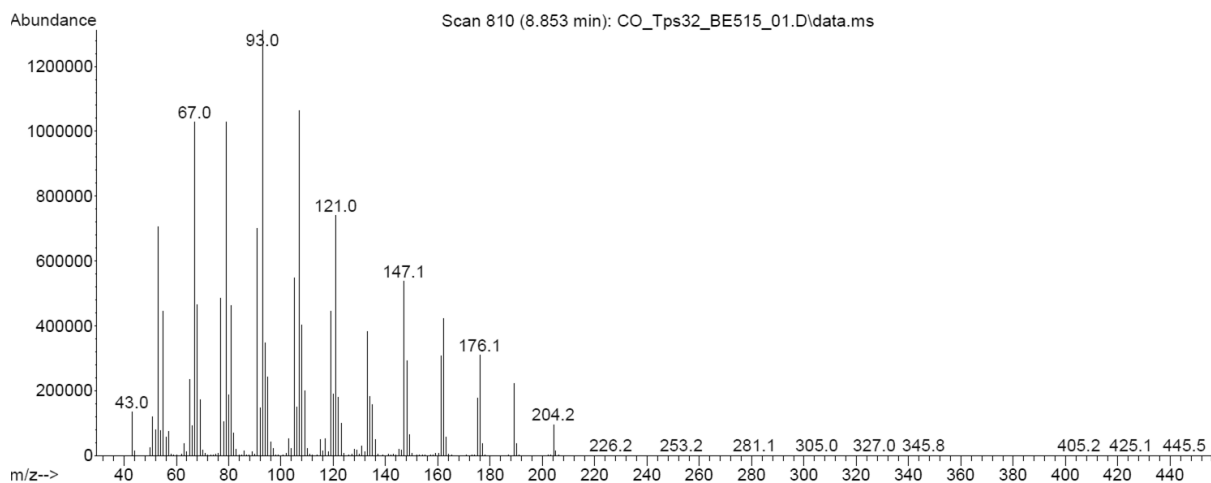
Sesquiterpenoid 209



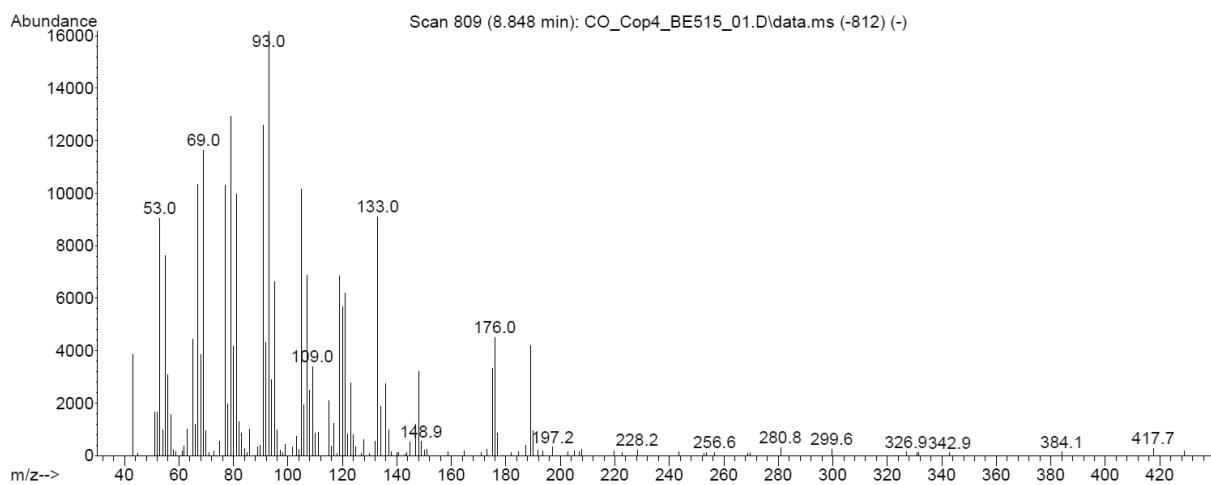
Sesquiterpenoid 210



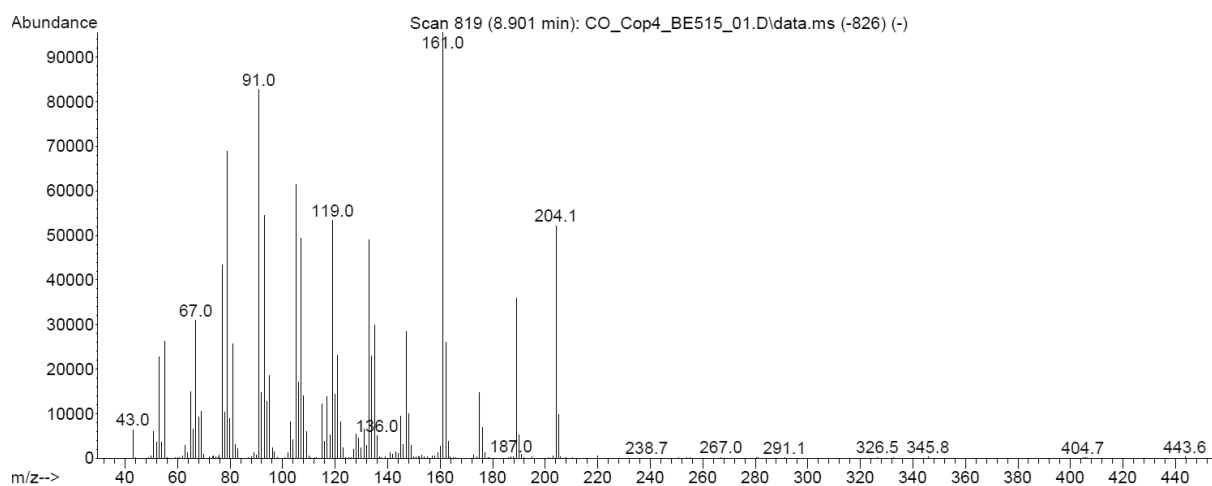
Sesquiterpenoid 211



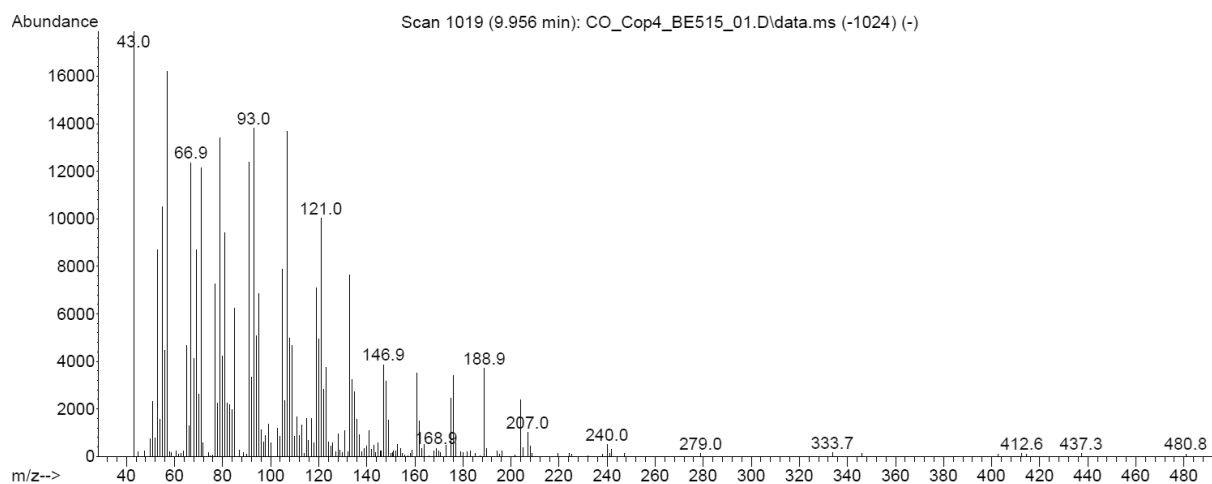
Sesquiterpenoid 212



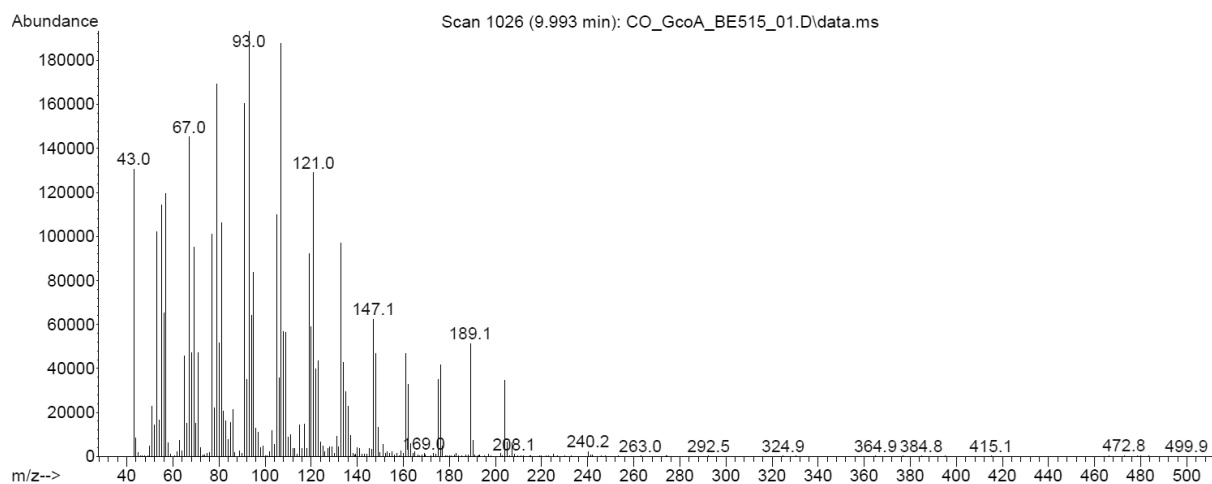
Sesquiterpenoid 213



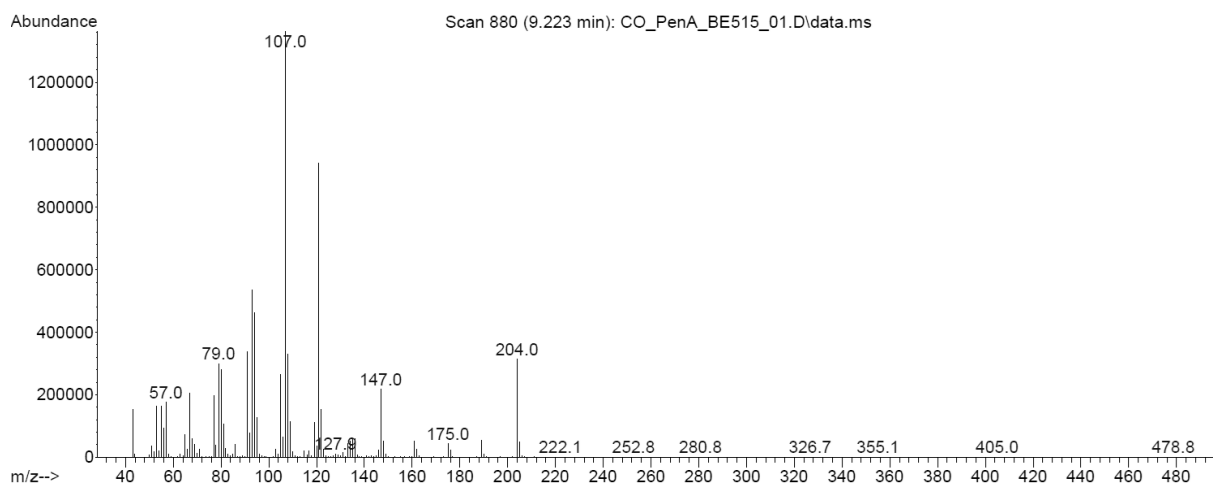
Sesquiterpenoid 214



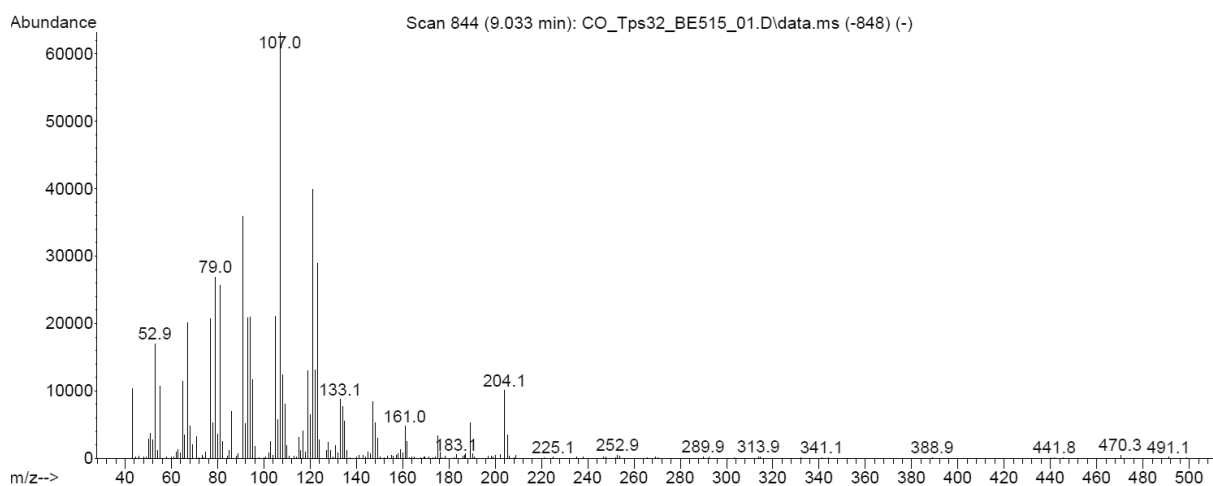
Sesquiterpenoid 215



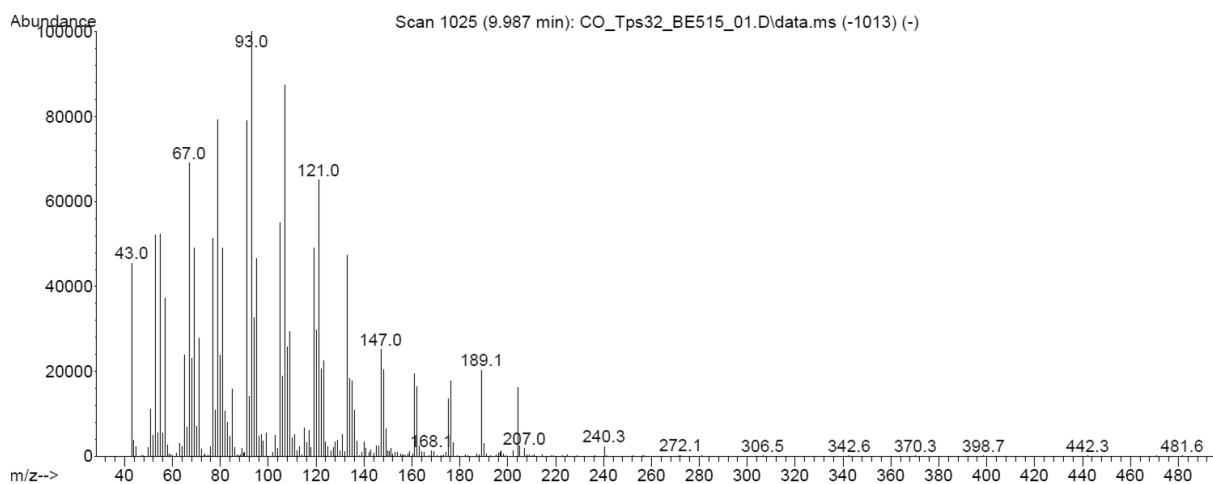
Sesquiterpenoid 216



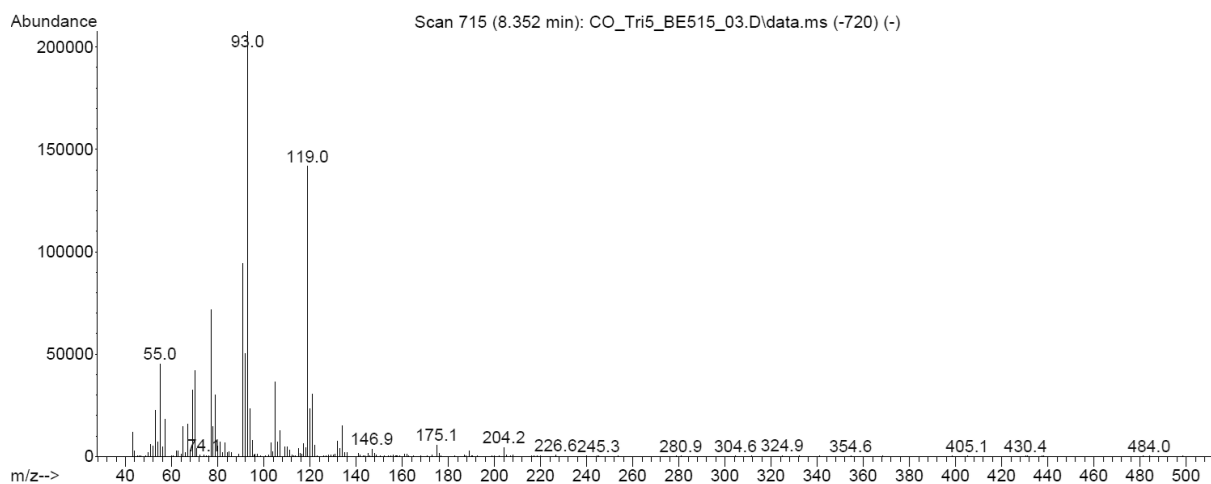
Sesquiterpenoid 217



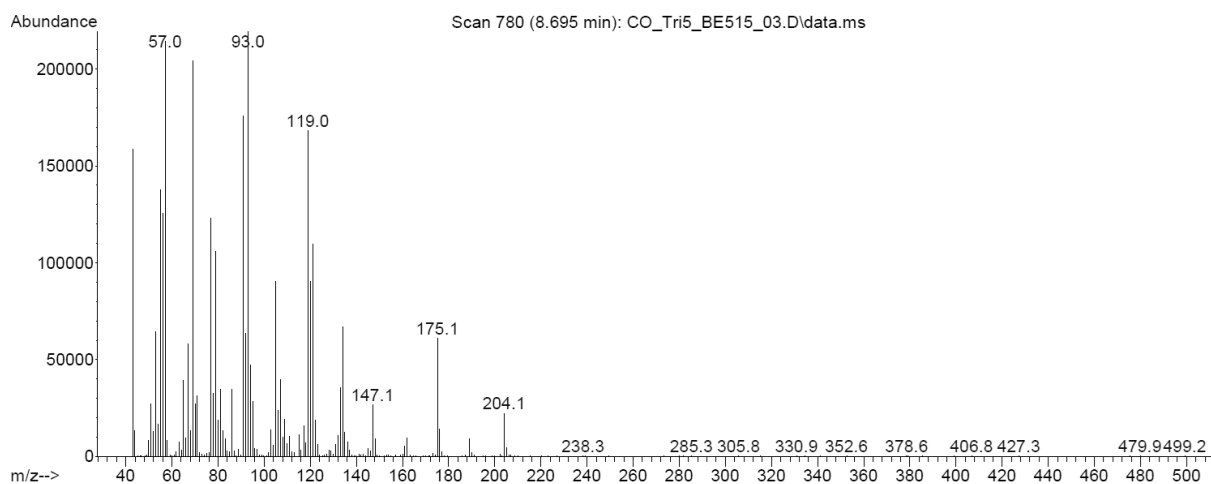
Sesquiterpenoid 218



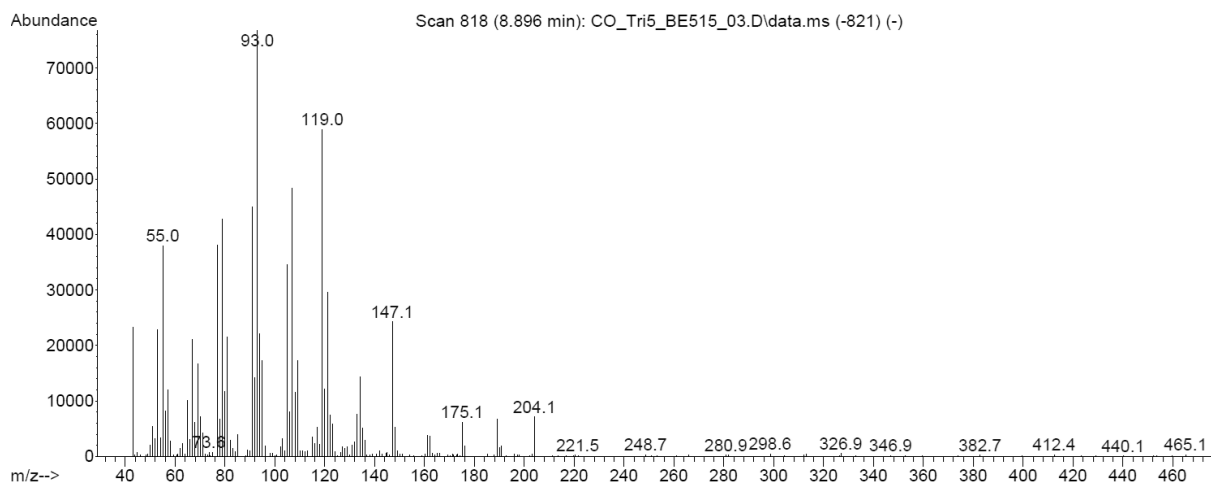
Sesquiterpenoid 219



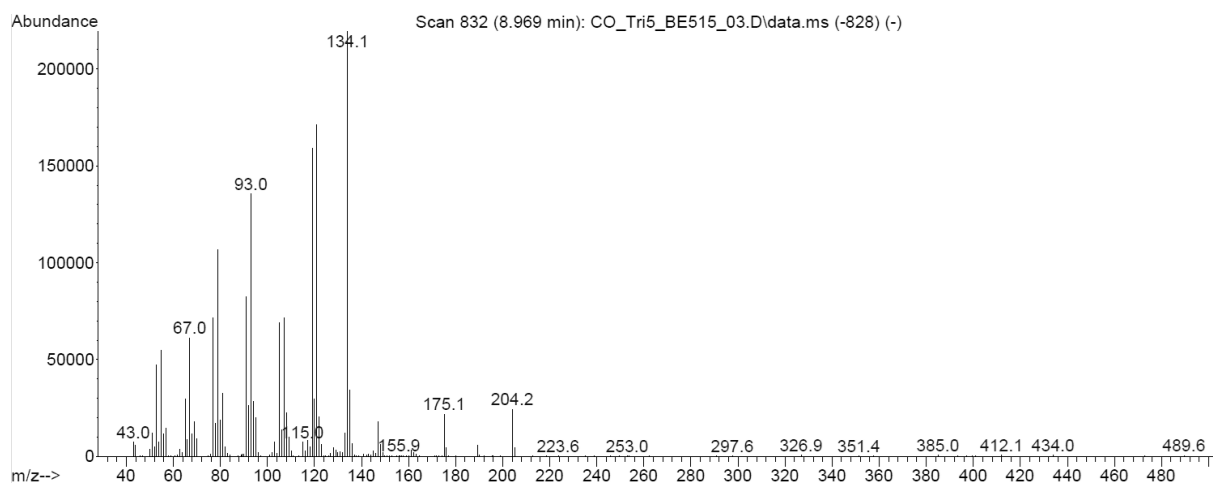
Sesquiterpenoid 220



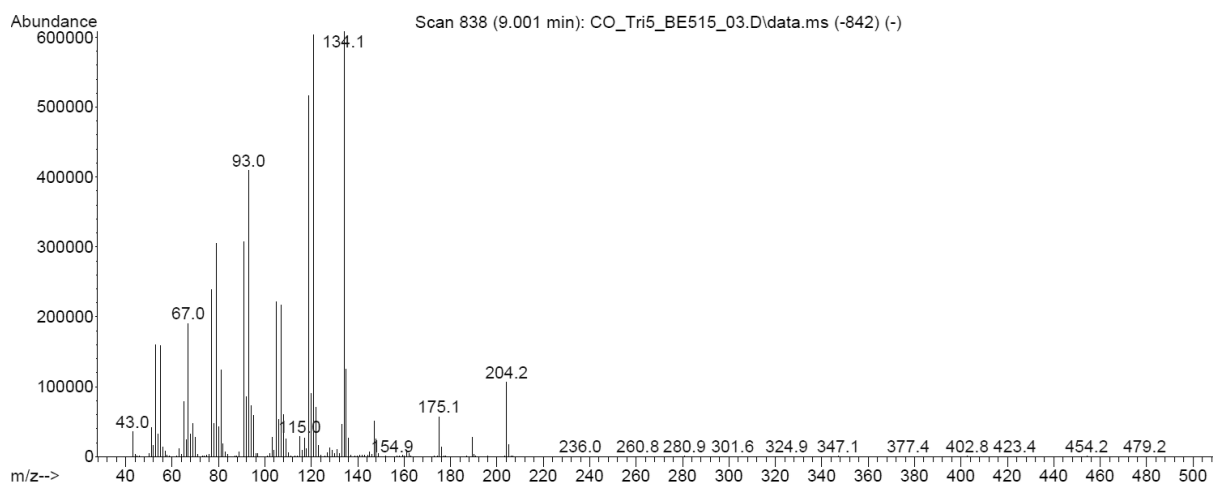
Sesquiterpenoid 221



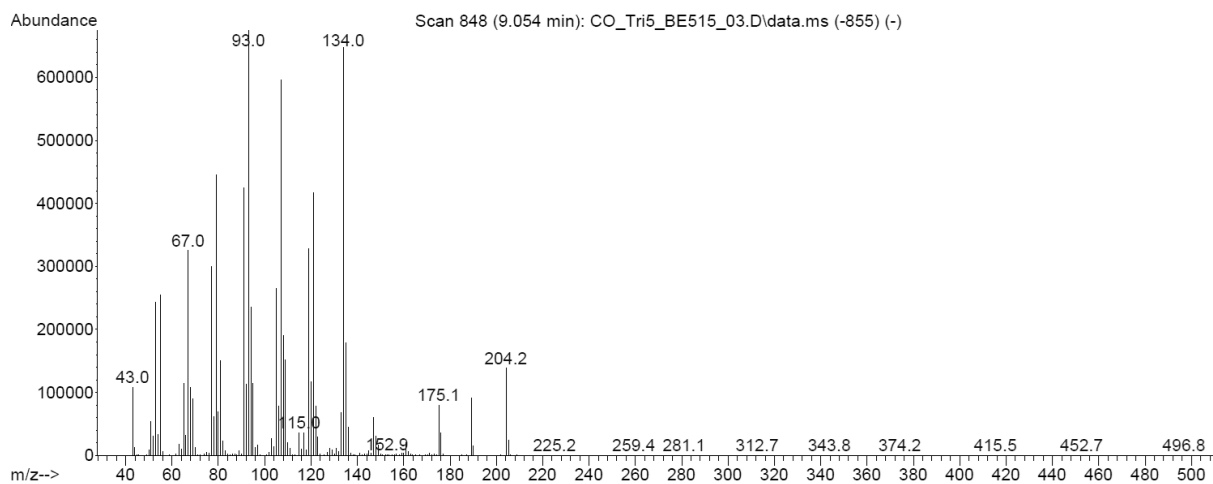
Sesquiterpenoid 222



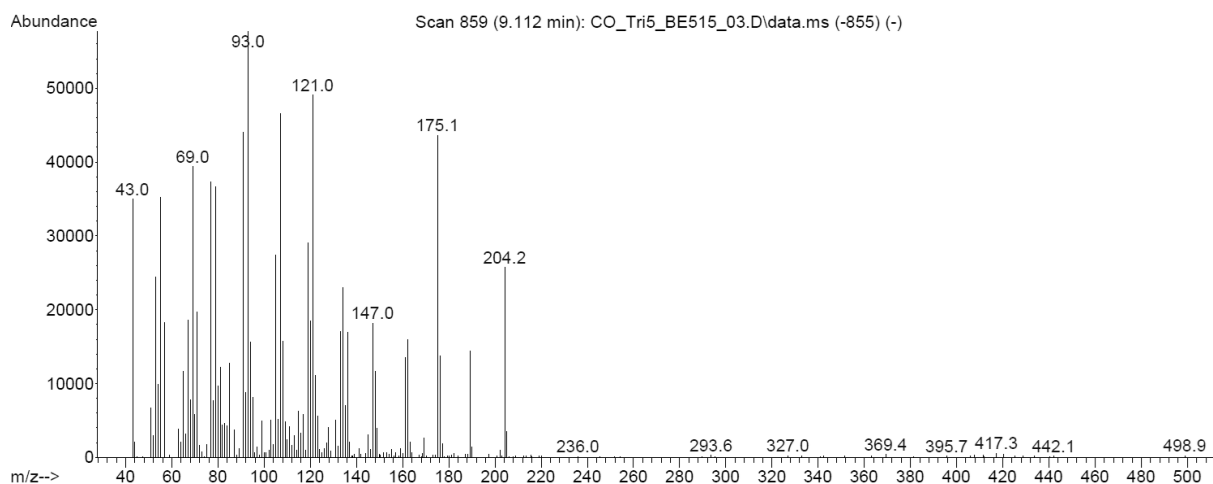
Sesquiterpenoid 223



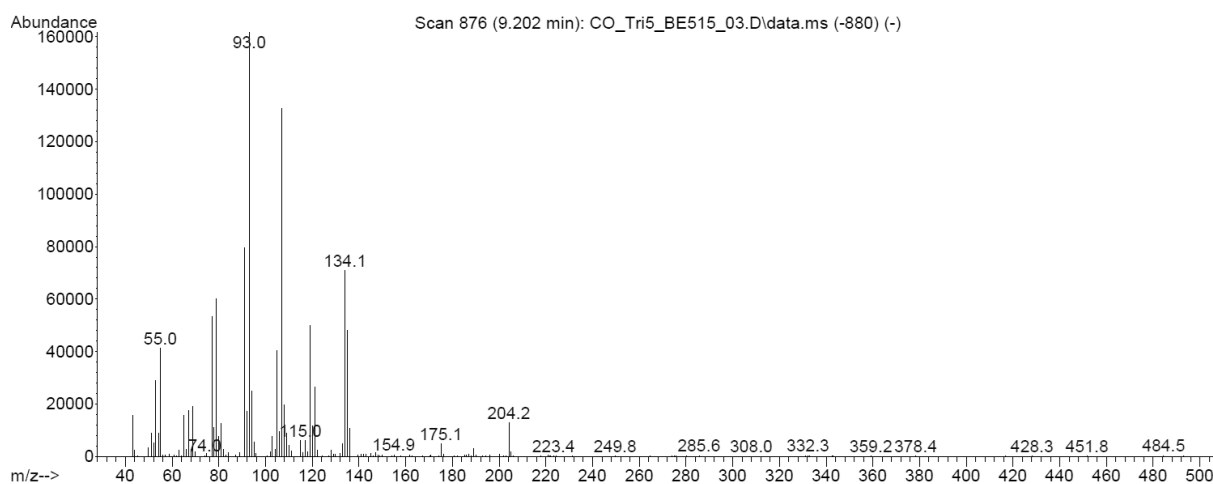
Sesquiterpenoid 224



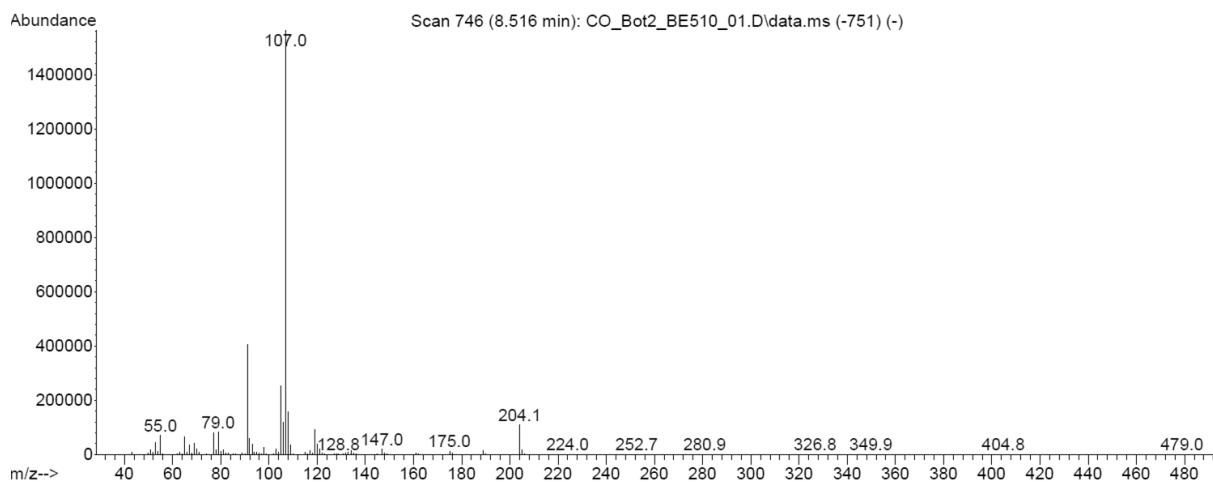
Sesquiterpenoid 225



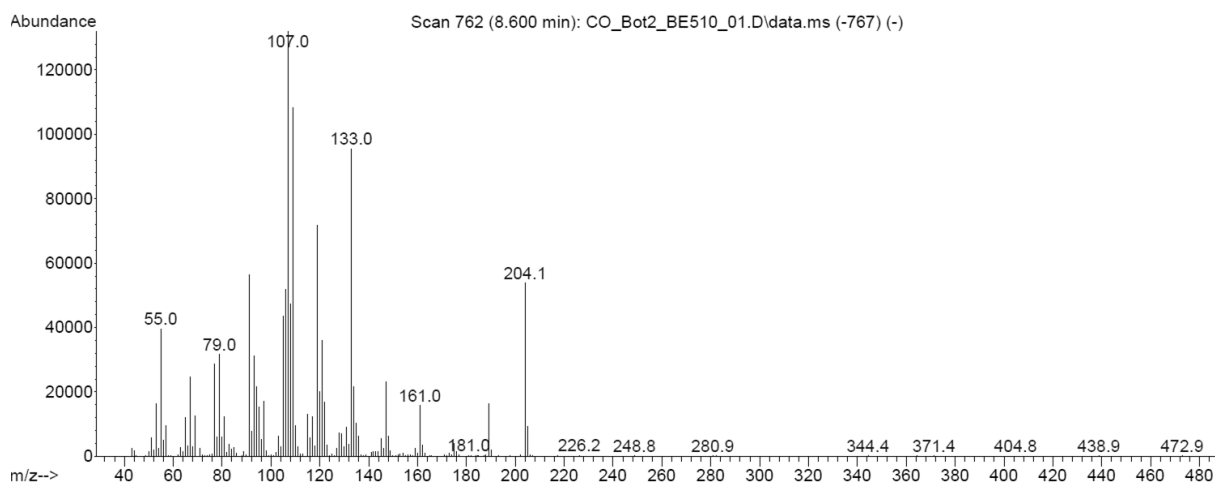
Sesquiterpenoid 226



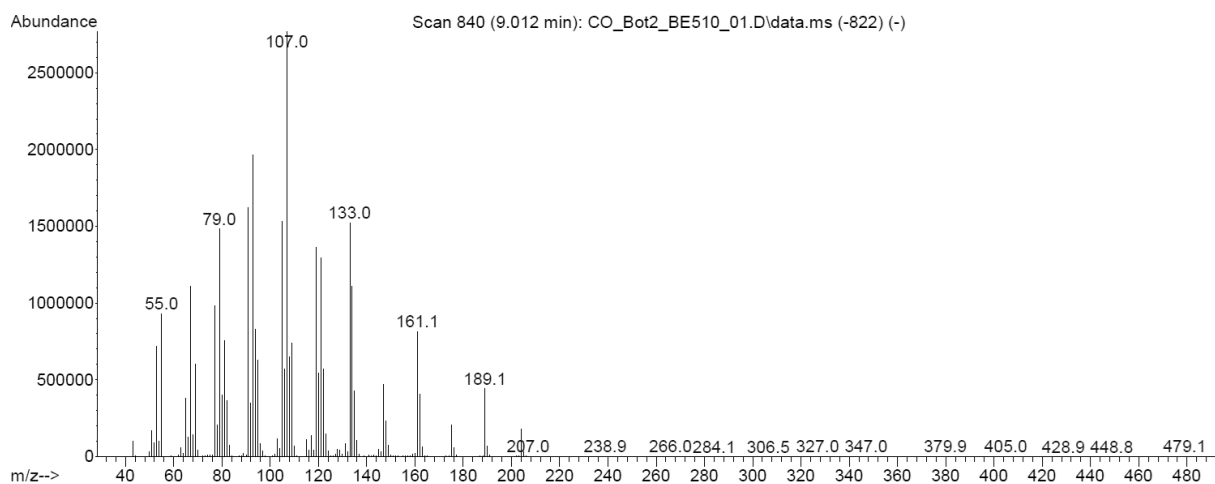
Sesquiterpenoid 229



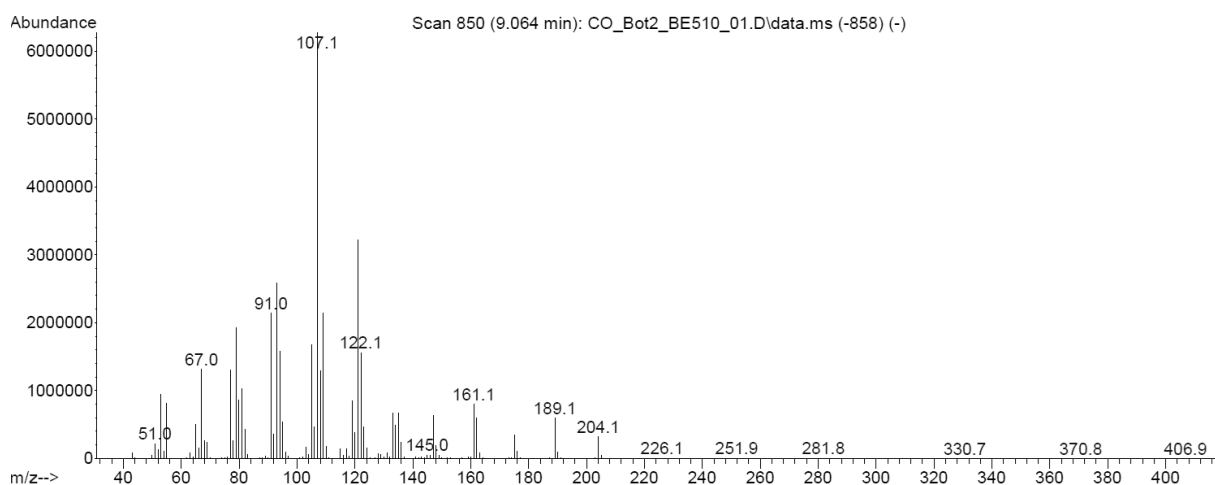
Sesquiterpenoid 230



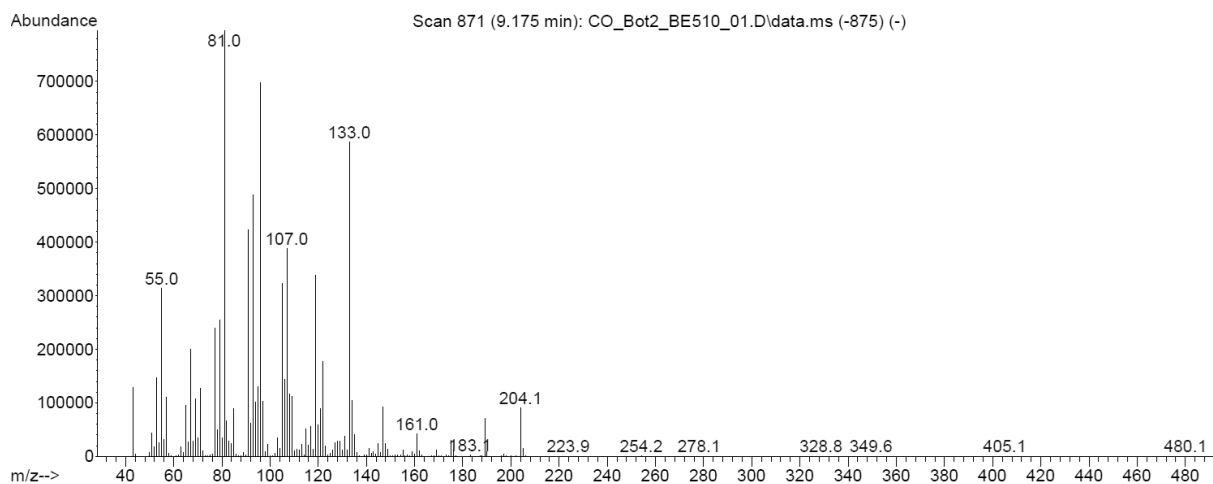
Sesquiterpenoid 231



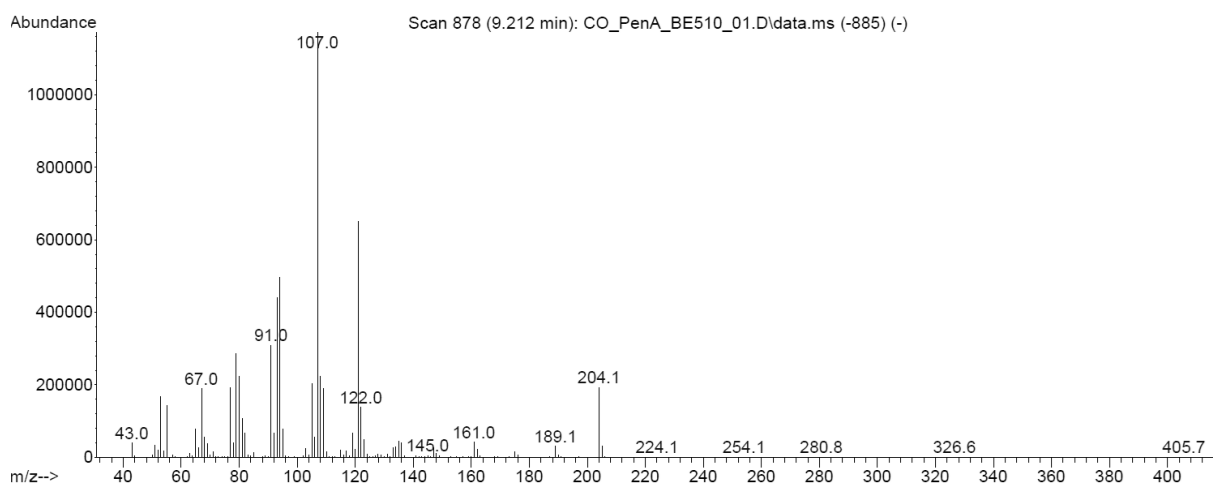
Sesquiterpenoid 232



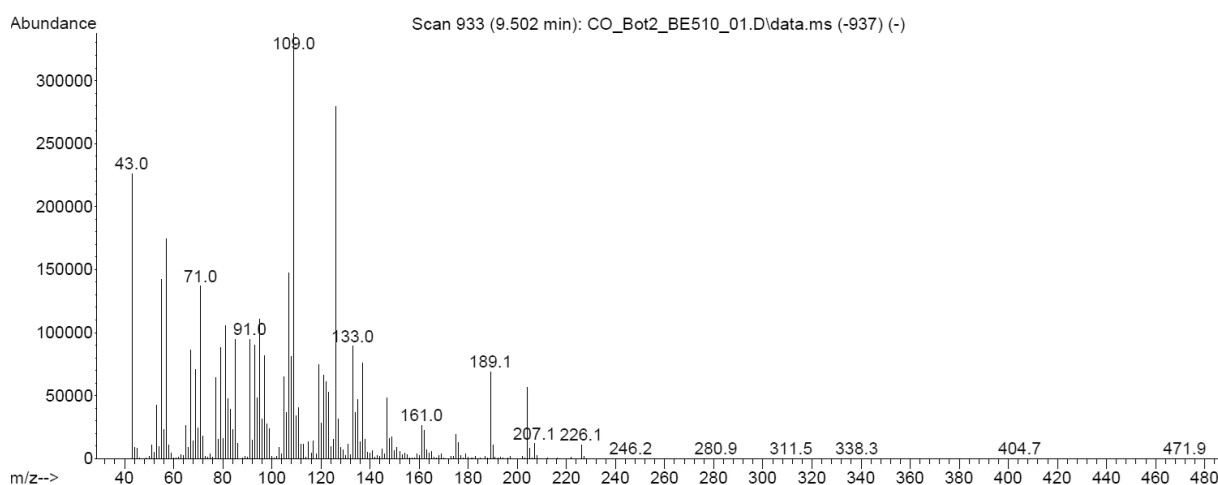
Sesquiterpenoid 233



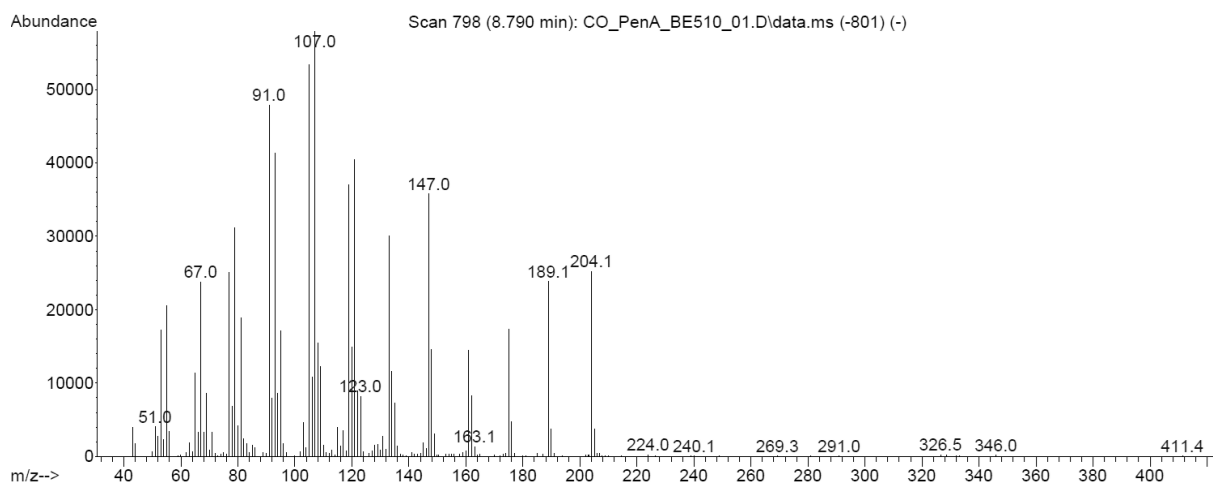
Sesquiterpenoid 234



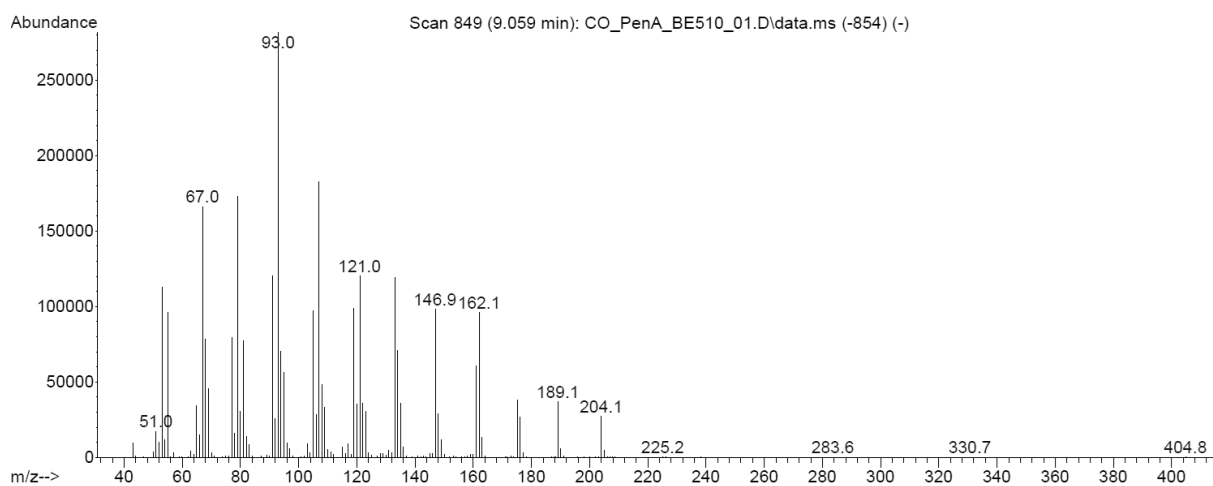
Sesquiterpenoid 235



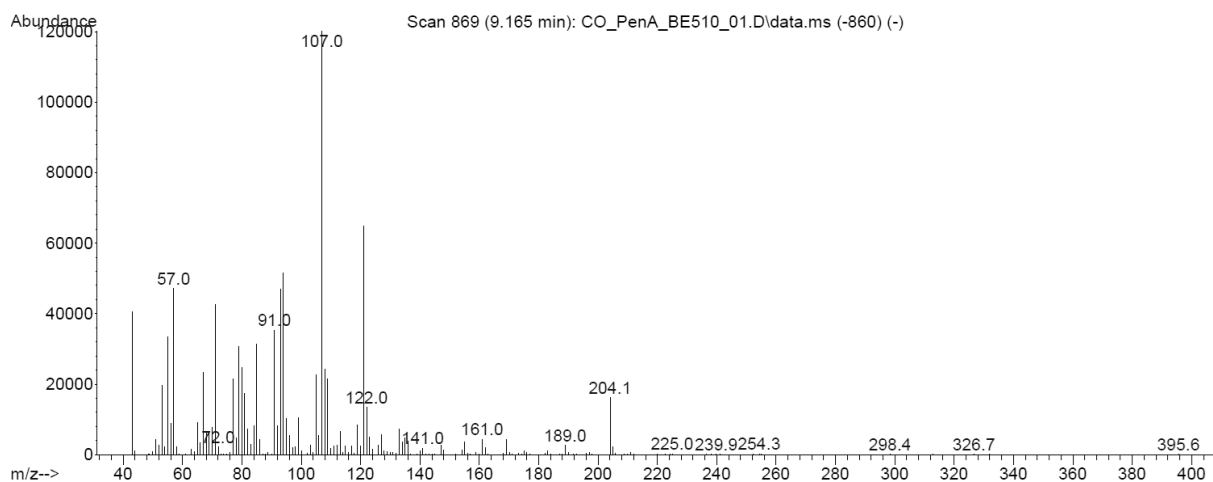
Sesquiterpenoid 236



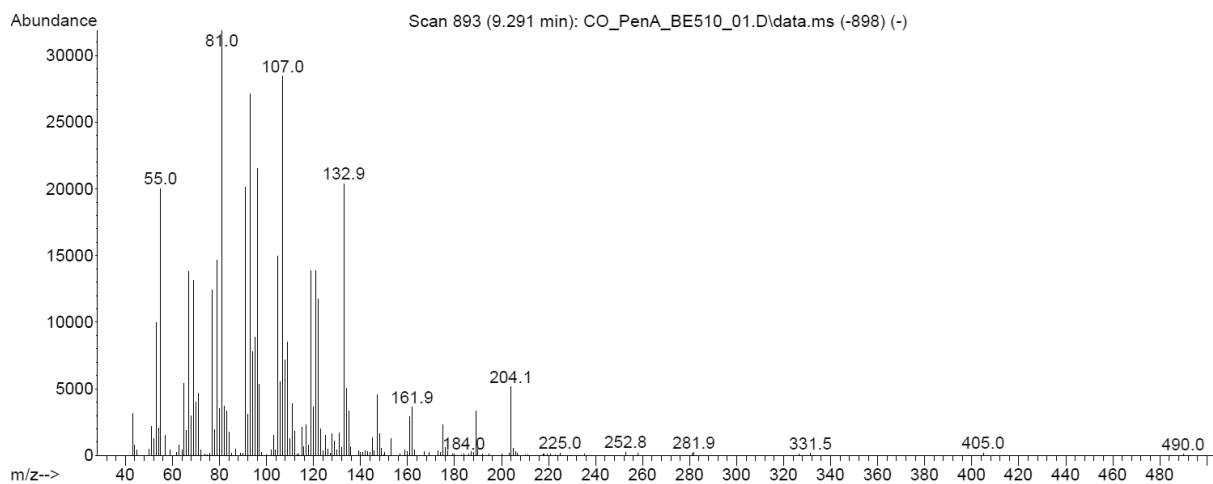
Sesquiterpenoid 237



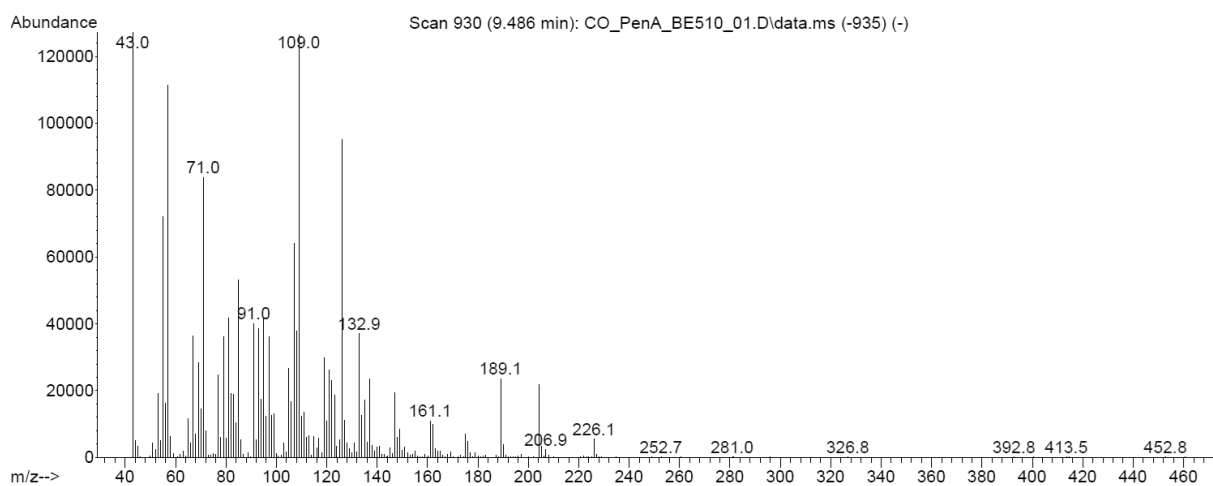
Sesquiterpenoid 238



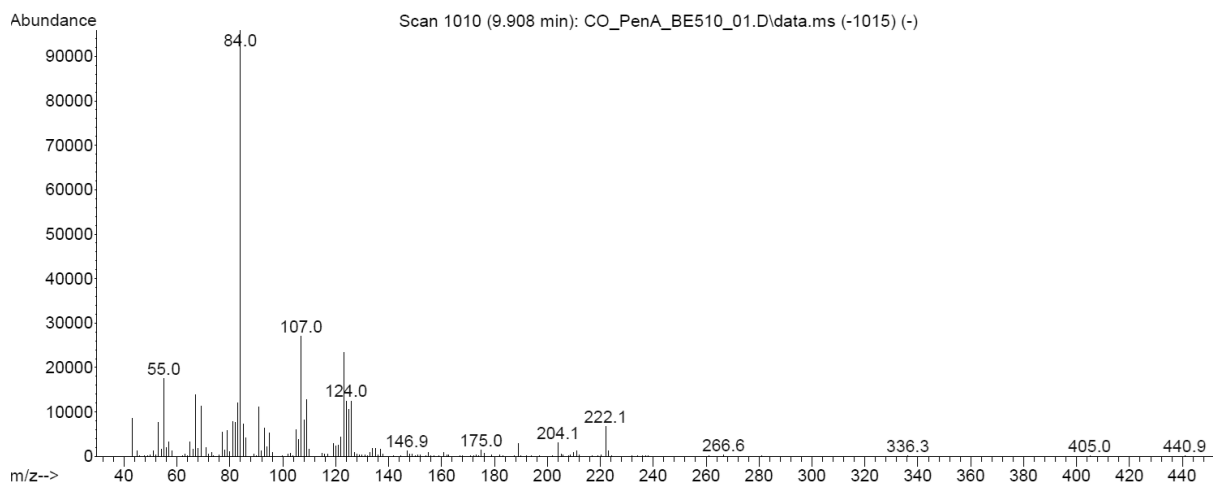
Sesquiterpenoid 239



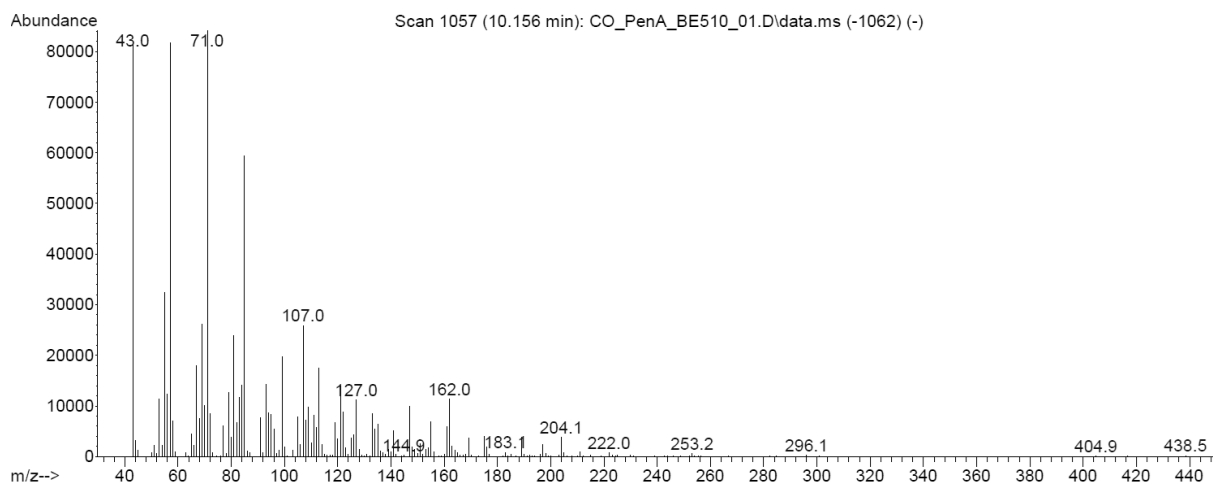
Sesquiterpenoid 240



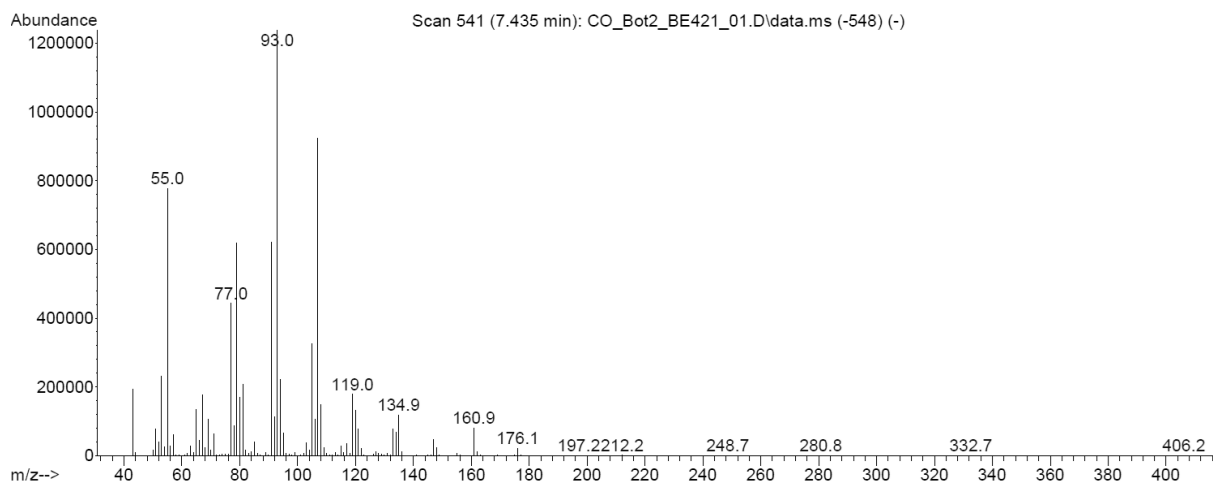
Sesquiterpenoid 241



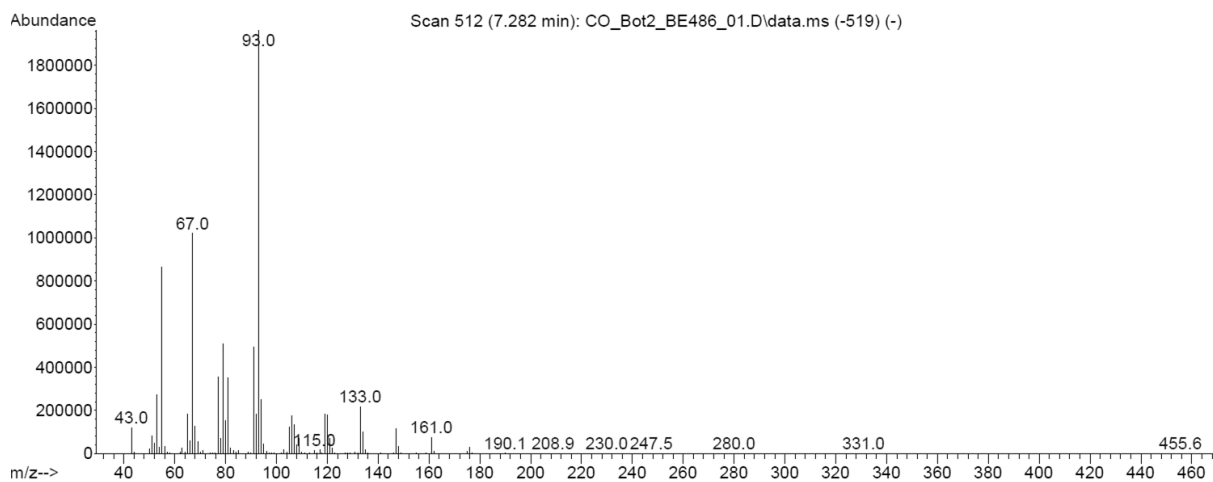
Sesquiterpenoid 242



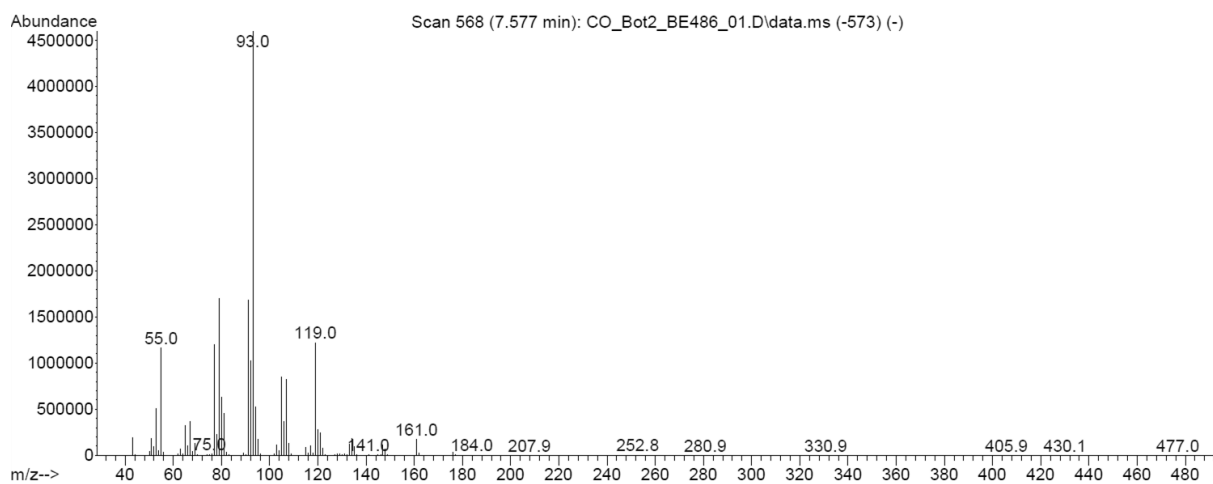
Sesquiterpenoid 243



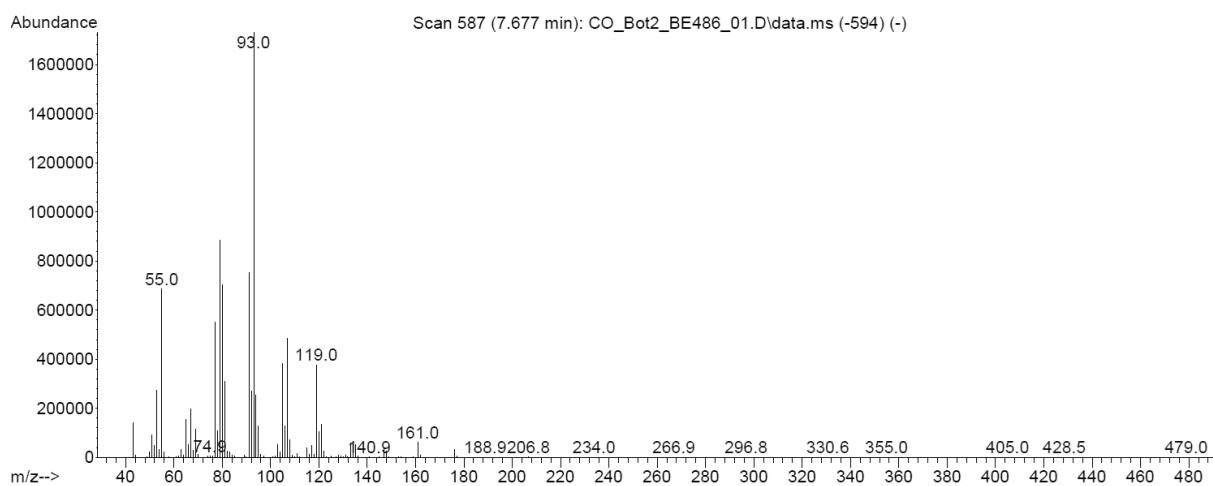
Sesquiterpenoid 244



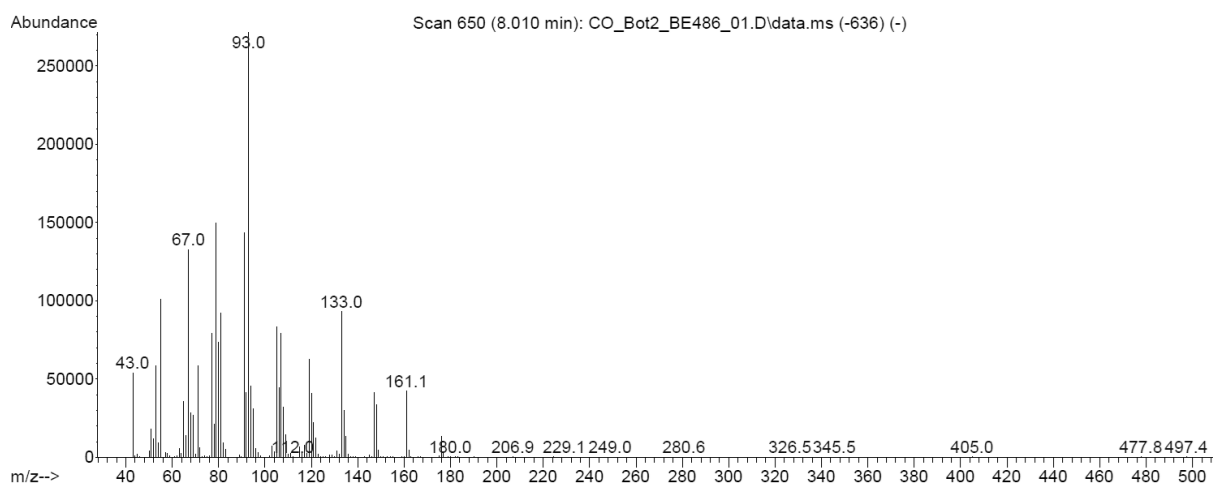
Sesquiterpenoid 245



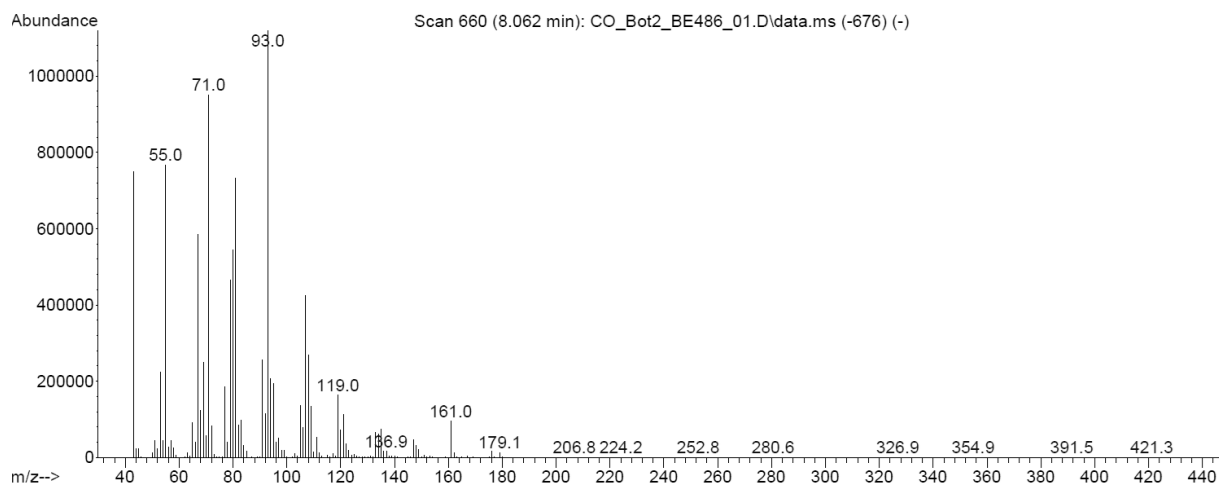
Sesquiterpenoid 246



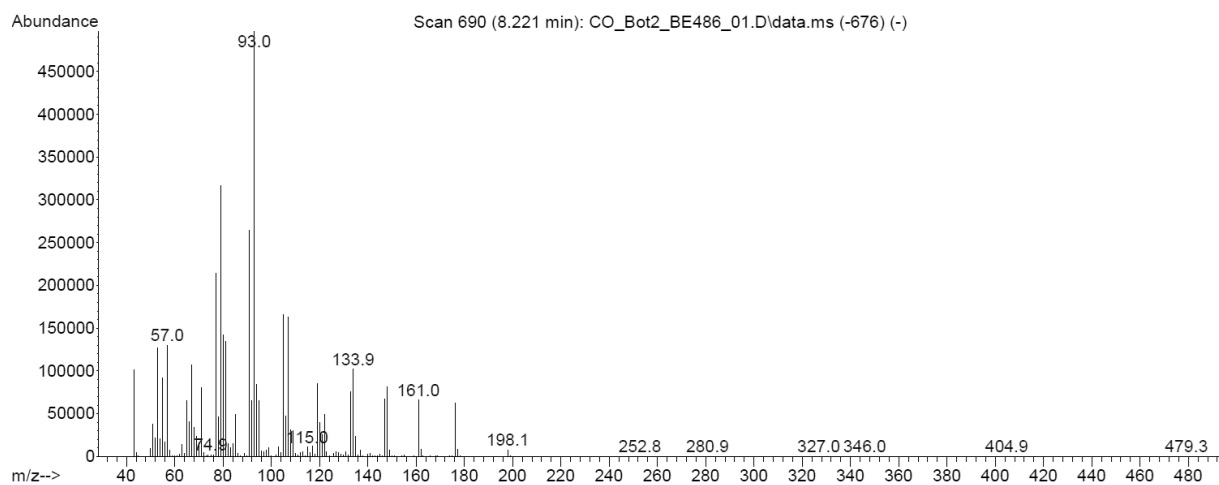
Sesquiterpenoid 247



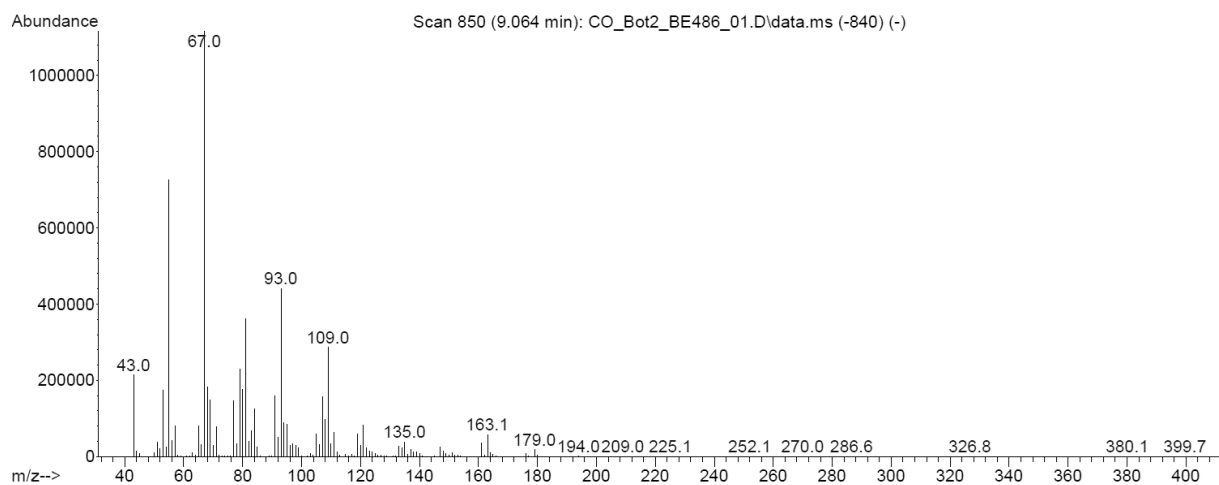
Sesquiterpenoid 248



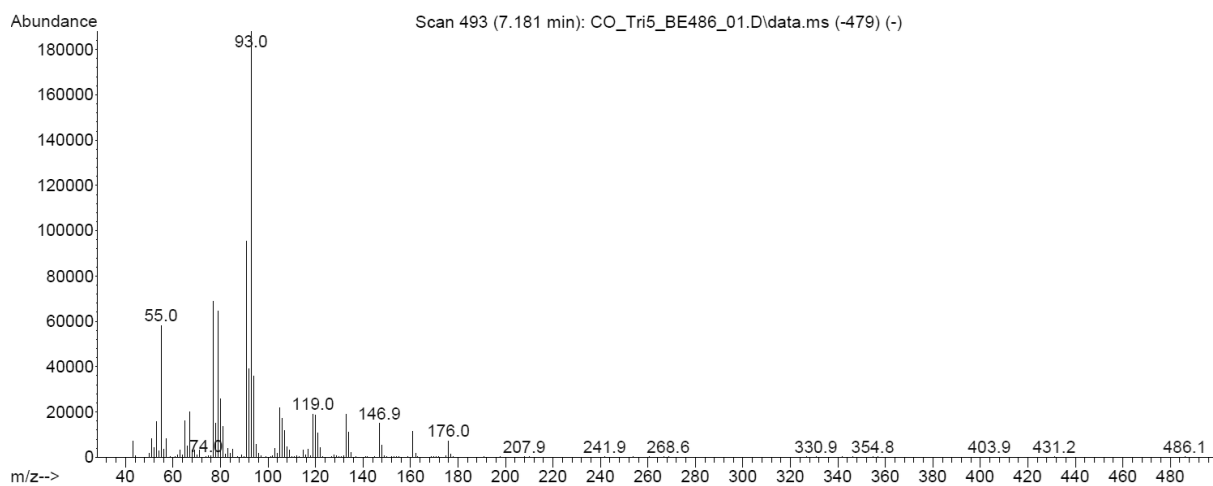
Sesquiterpenoid 249



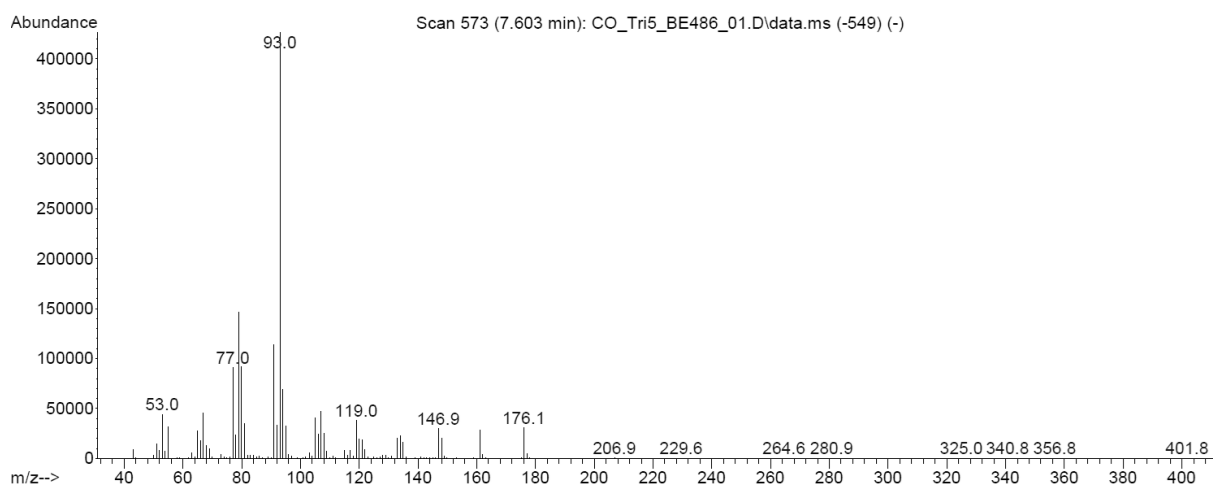
Sesquiterpenoid 251



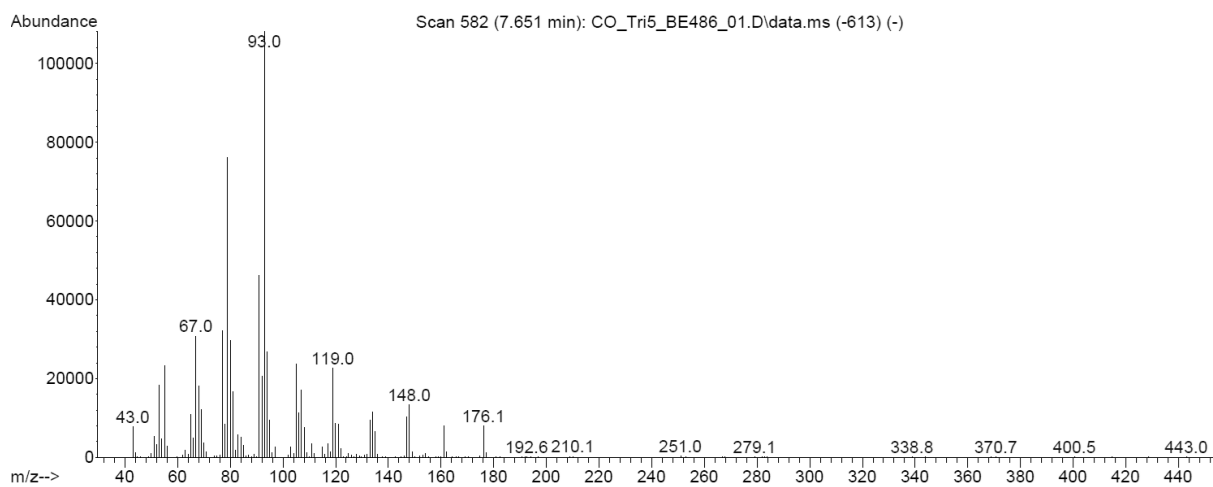
Sesquiterpenoid 252



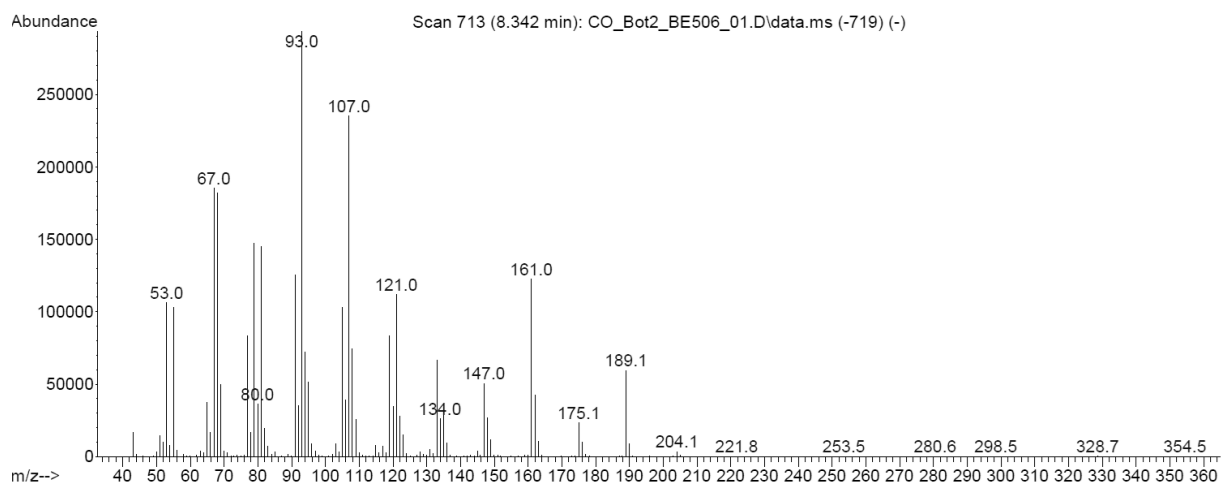
Sesquiterpenoid 253



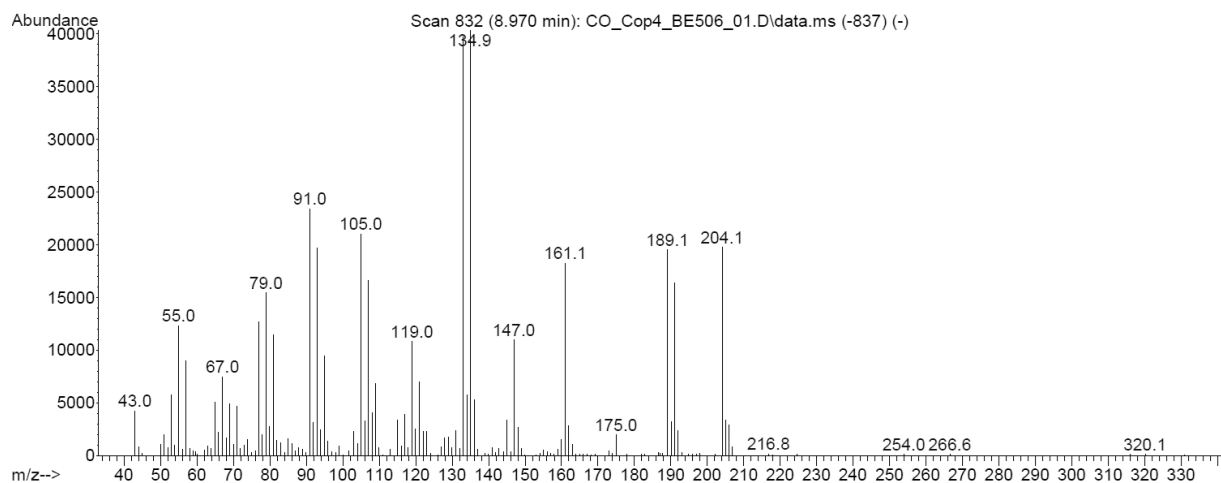
Sesquiterpenoid 254



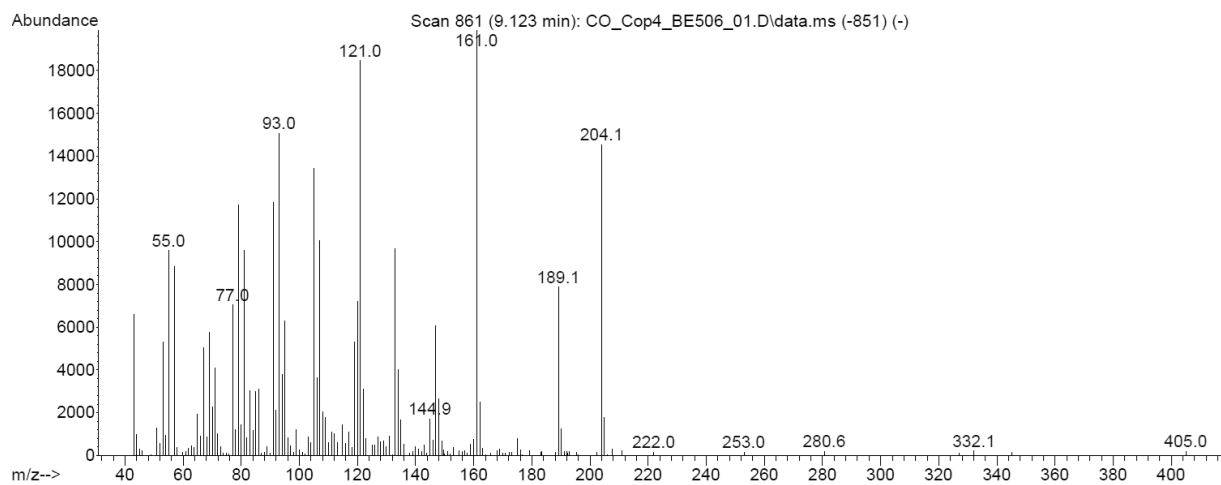
Sesquiterpenoid 255



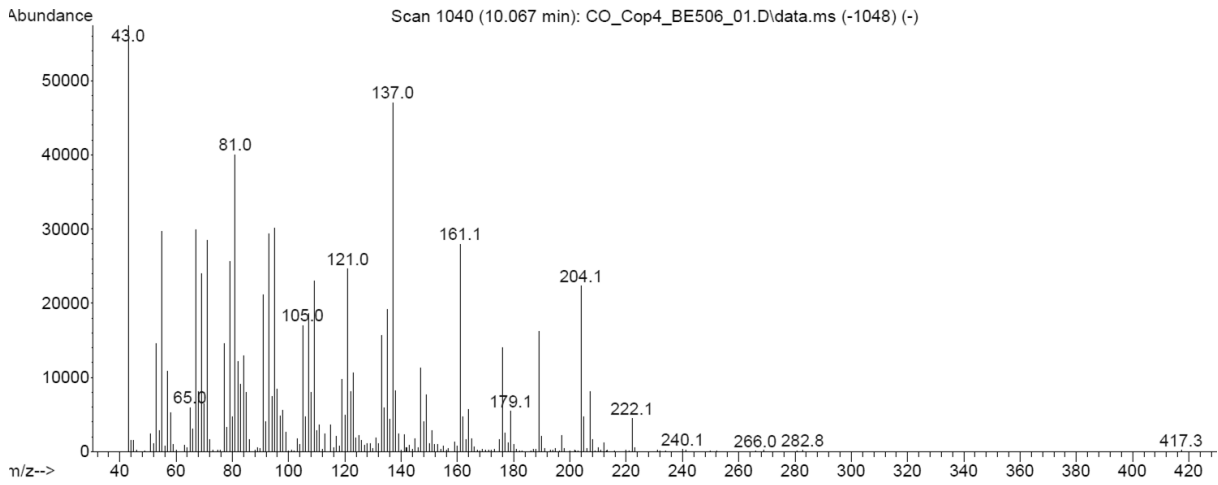
Sesquiterpenoid 256



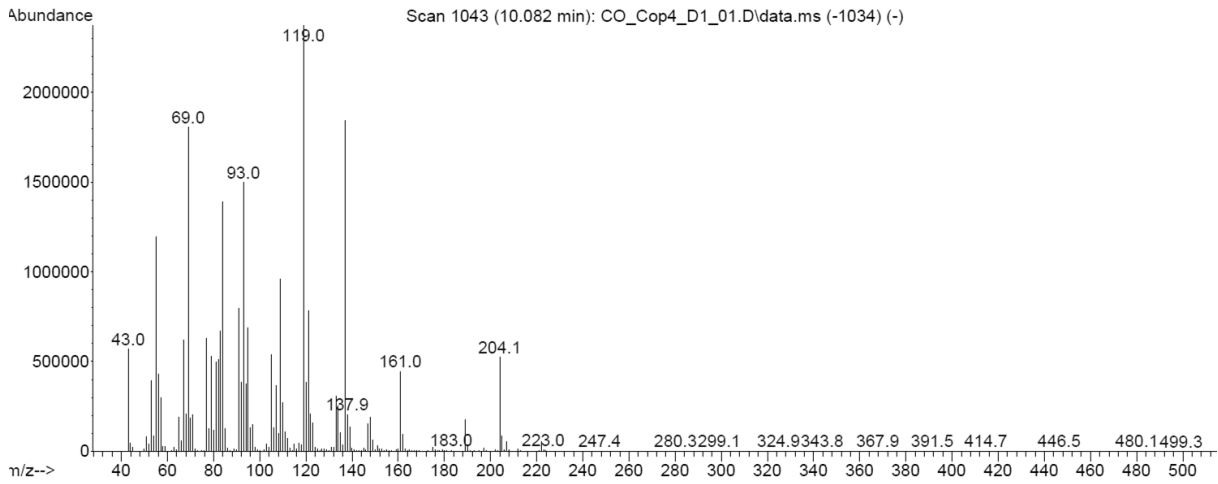
Sesquiterpenoid 258



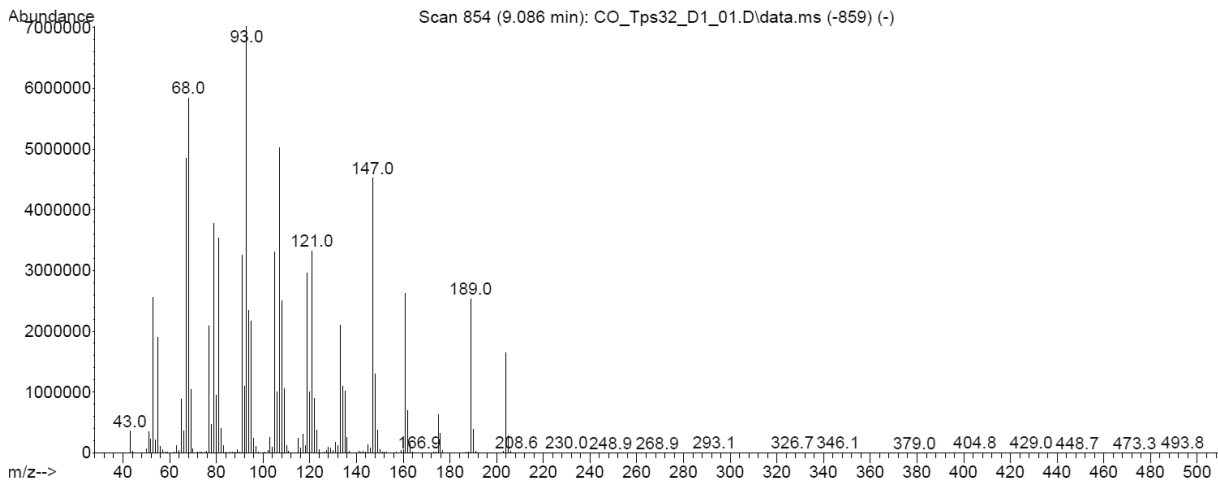
Sesquiterpenoid 259



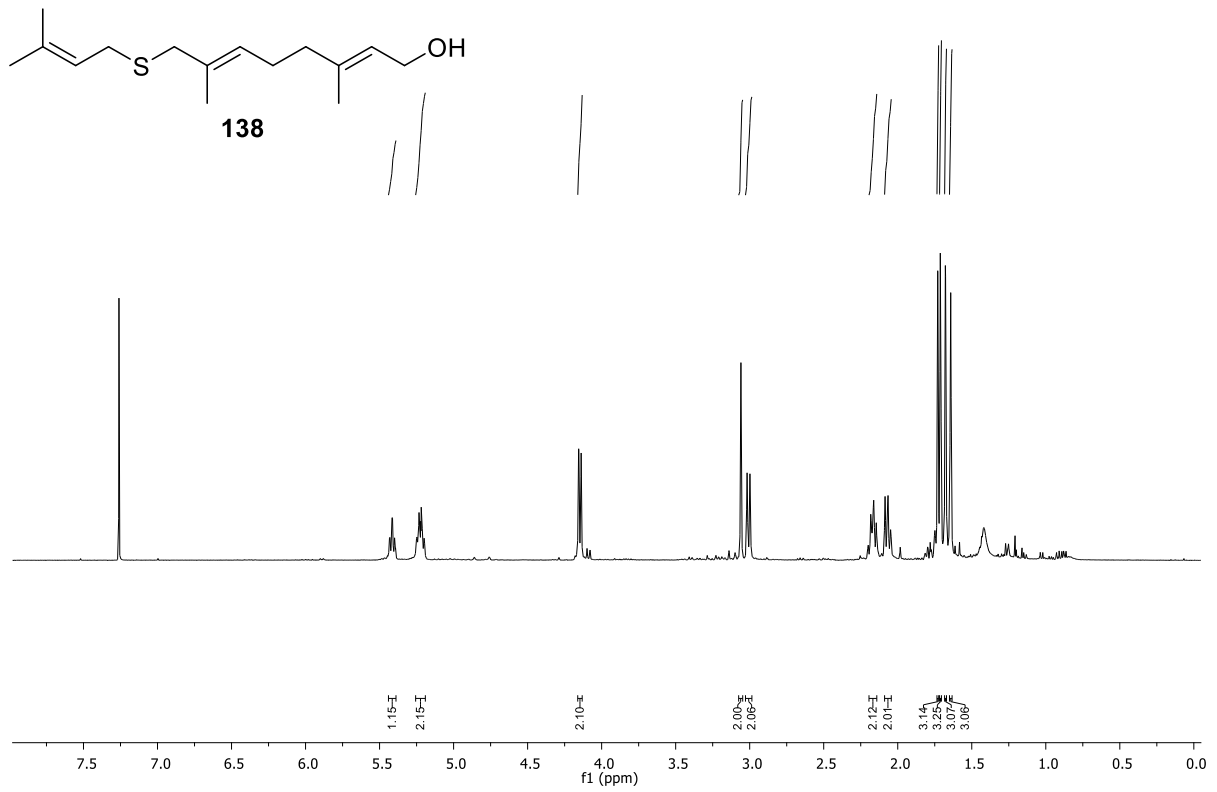
Sesquiterpenoid 261



Sesquiterpenoid 262



7.4 Ausgewählte NMR-Spektren

 $^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$

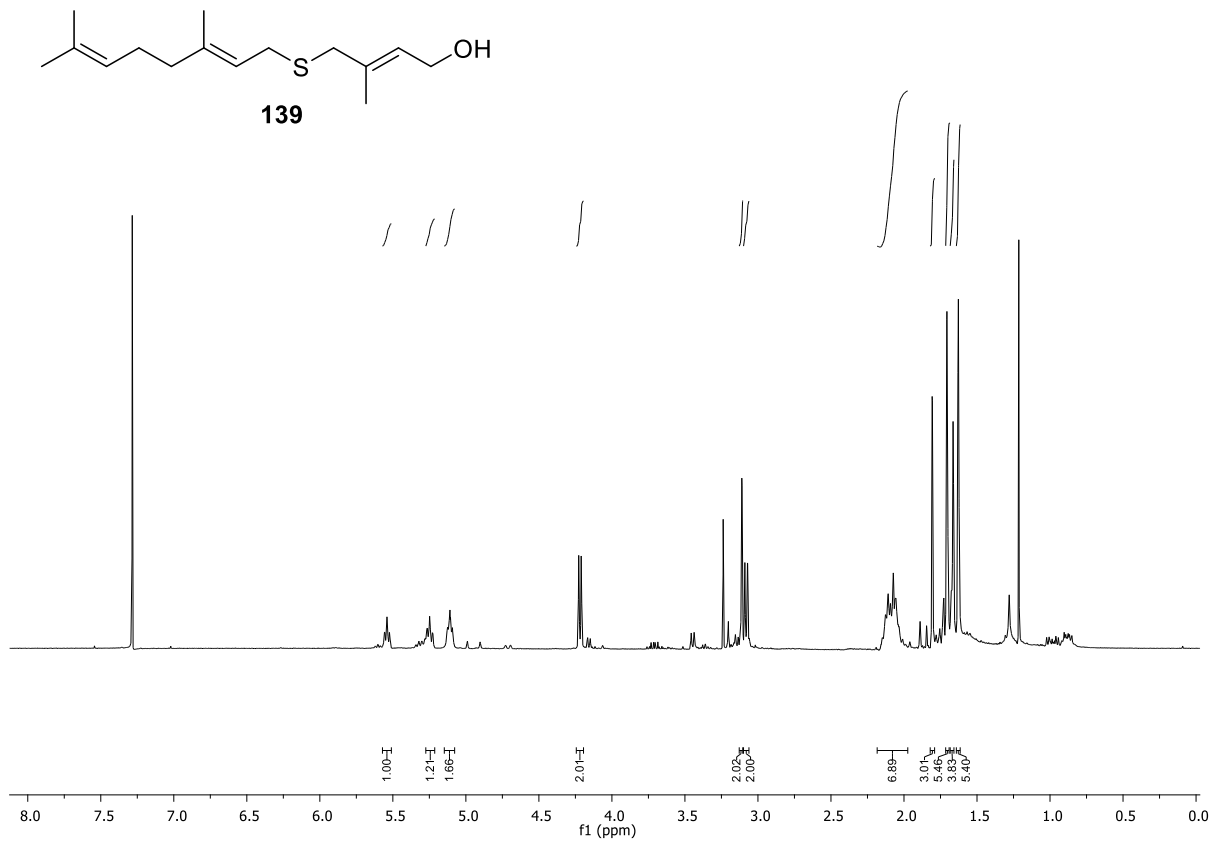
- 139.24
- 135.10
- 131.56
- 127.27
- 123.71
- 120.58

- 59.38
- 40.86
- 39.30
- 28.56
- 26.31
- 25.71
- 17.83
- 16.19
- 15.09

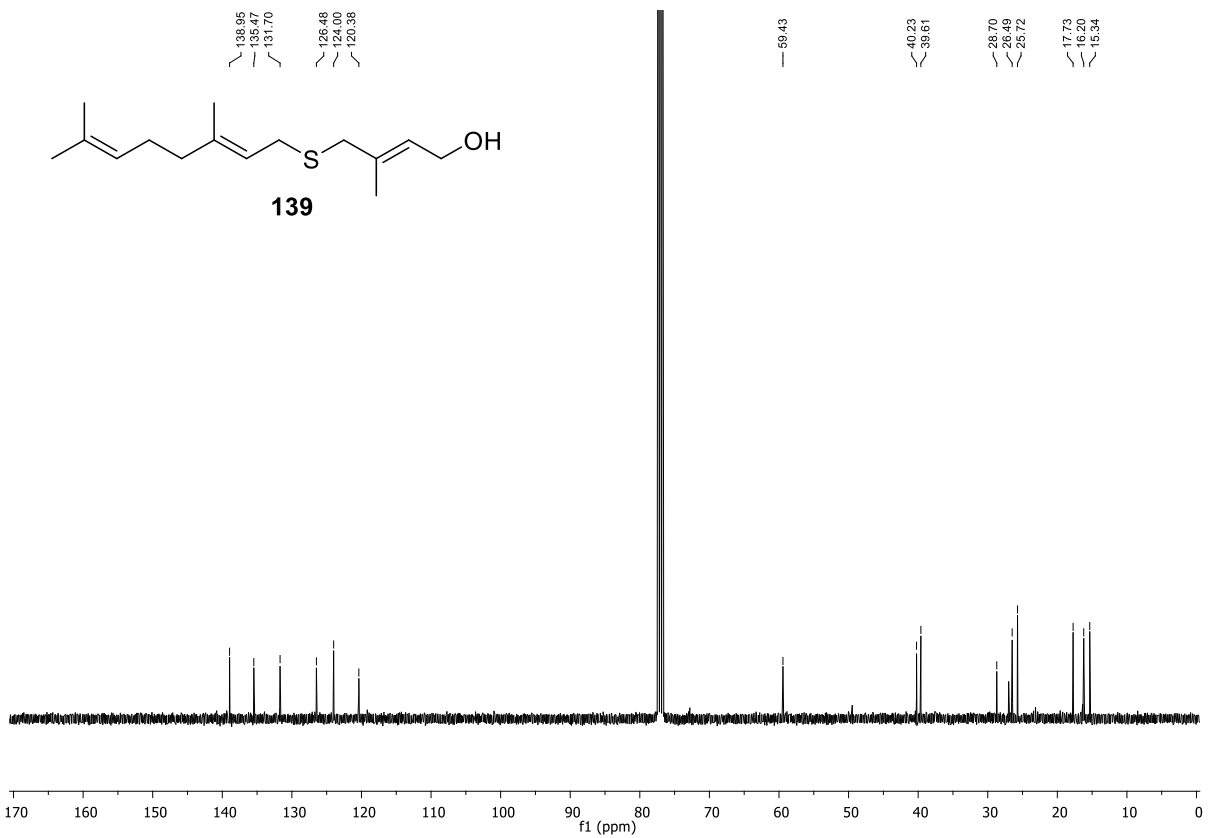
CC(=C)CSCC(=C)CC/C=C\CCO
138

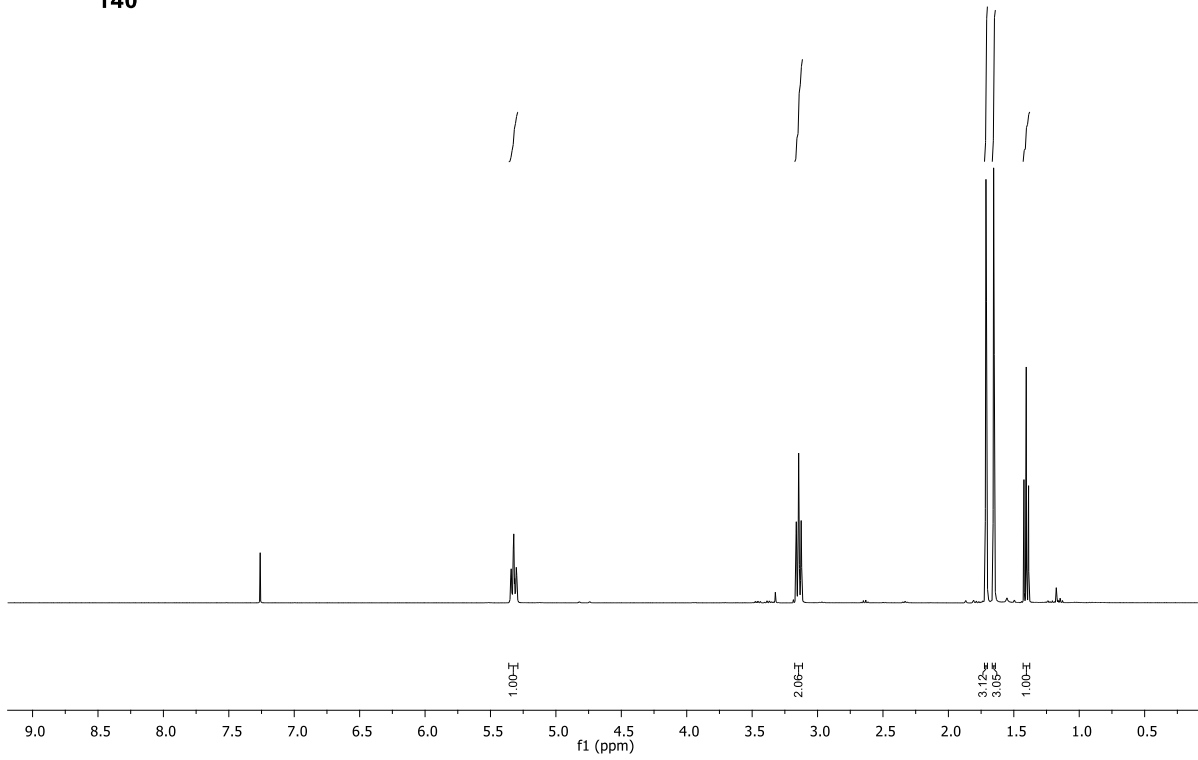
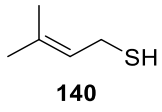
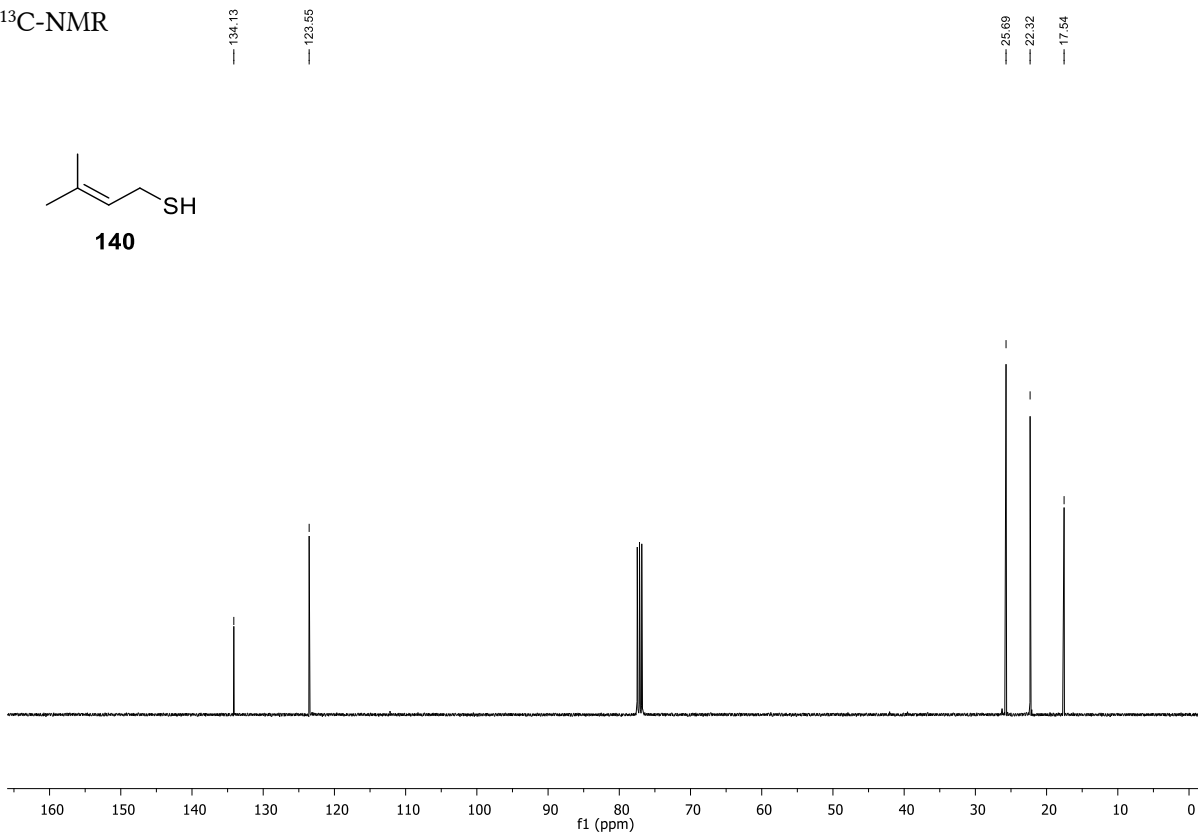
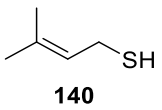
Chemical shifts (ppm): 139.24, 135.10, 131.56, 127.27, 123.71, 120.58, 59.38, 40.86, 39.30, 28.56, 26.31, 25.71, 17.83, 16.19, 15.09.

¹H-NMR

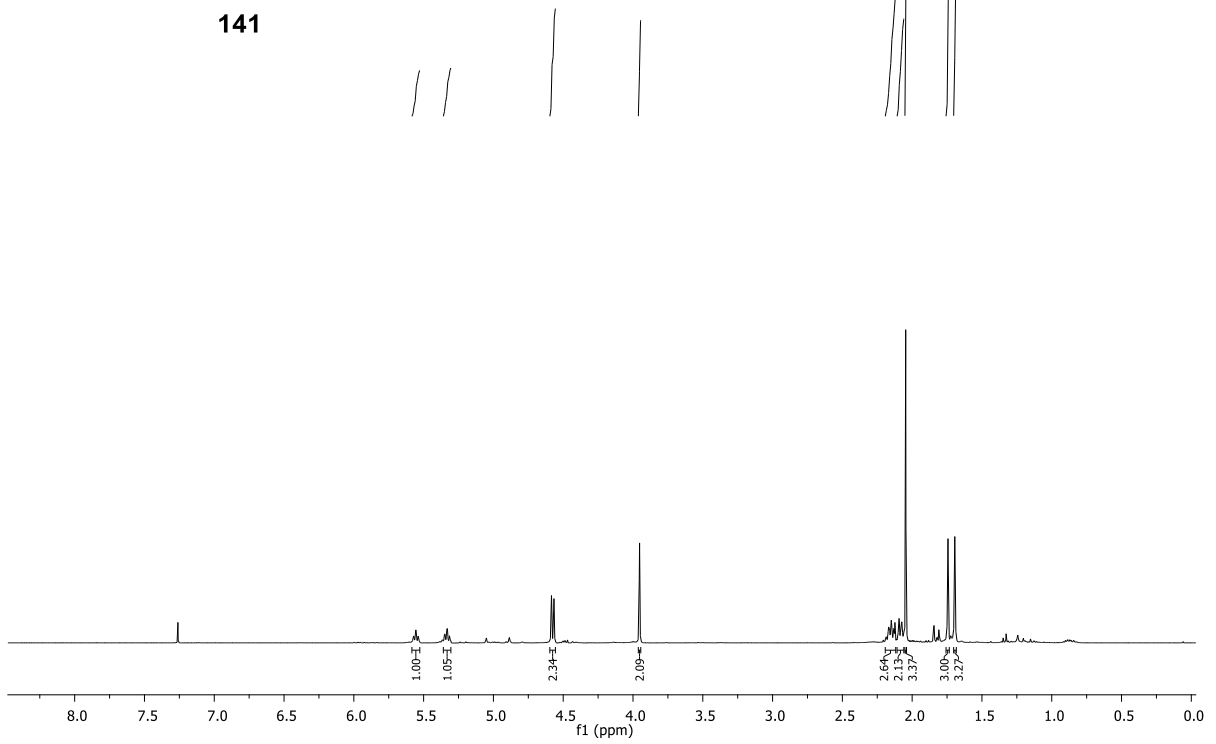
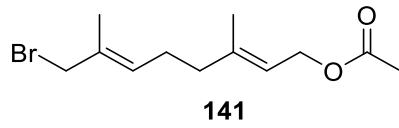


¹³C-NMR

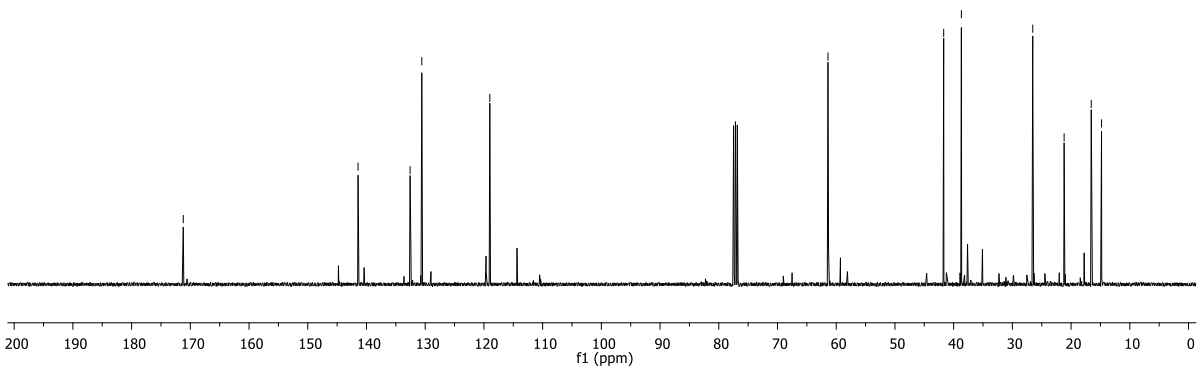


$^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

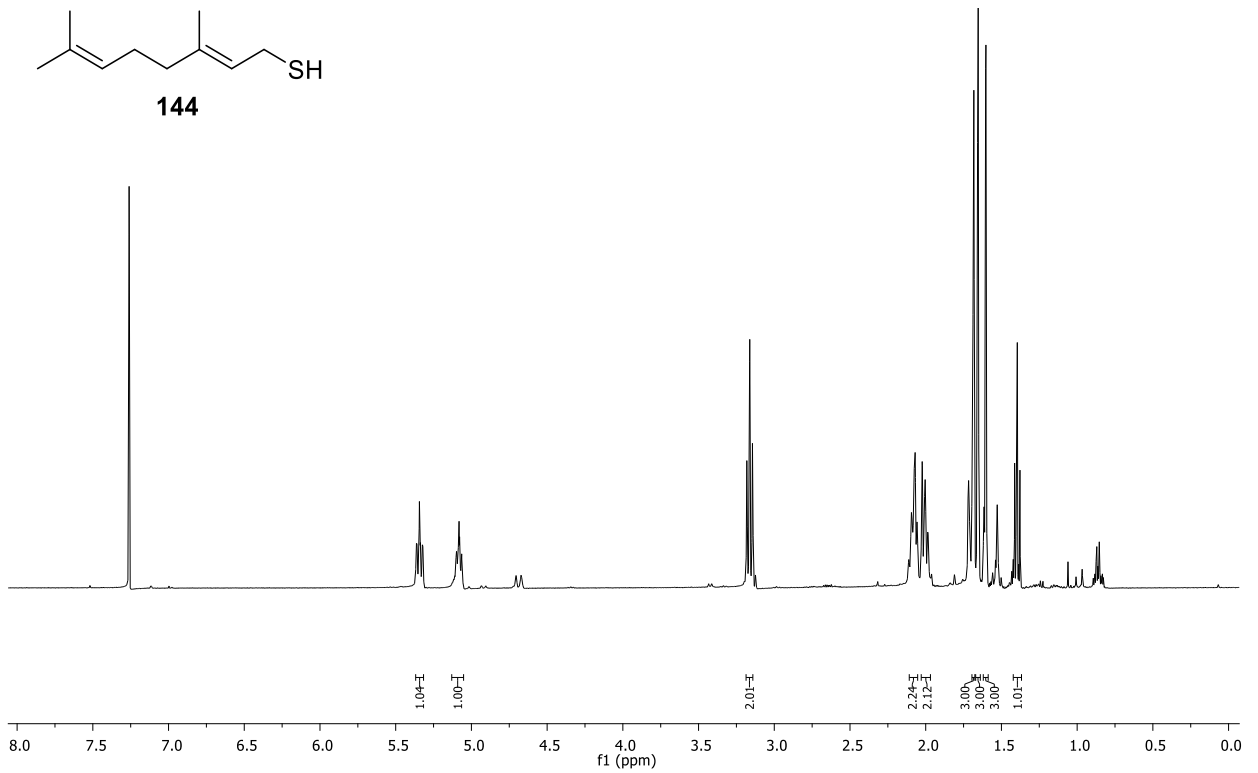
¹H-NMR



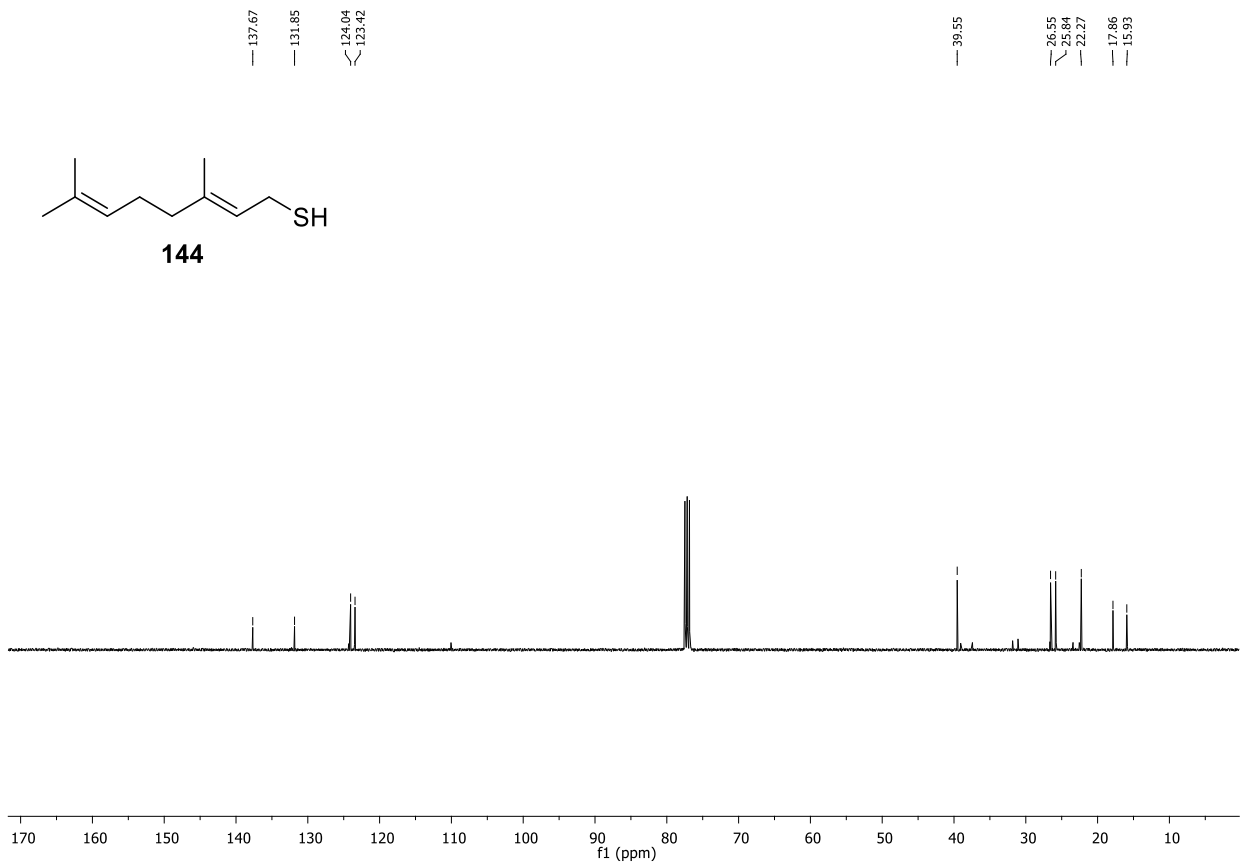
¹³C-NMR

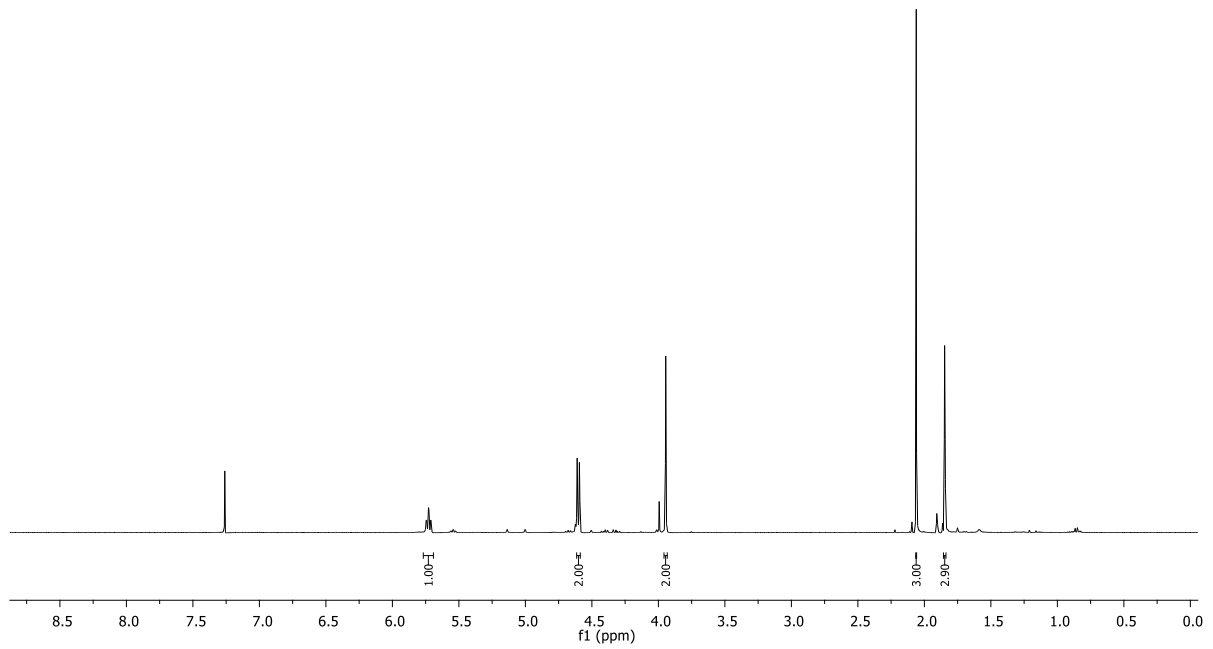
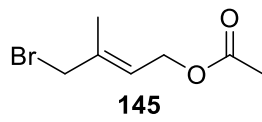
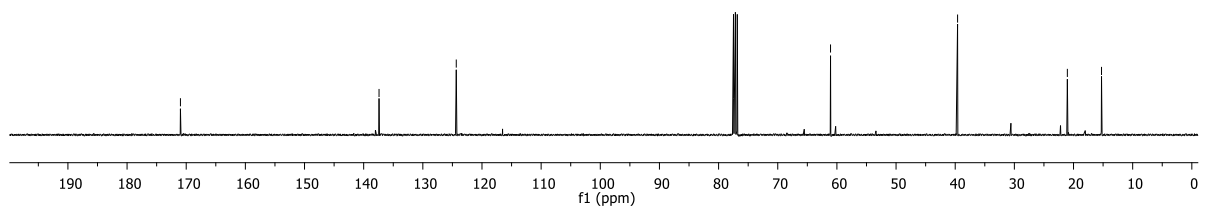


¹H-NMR

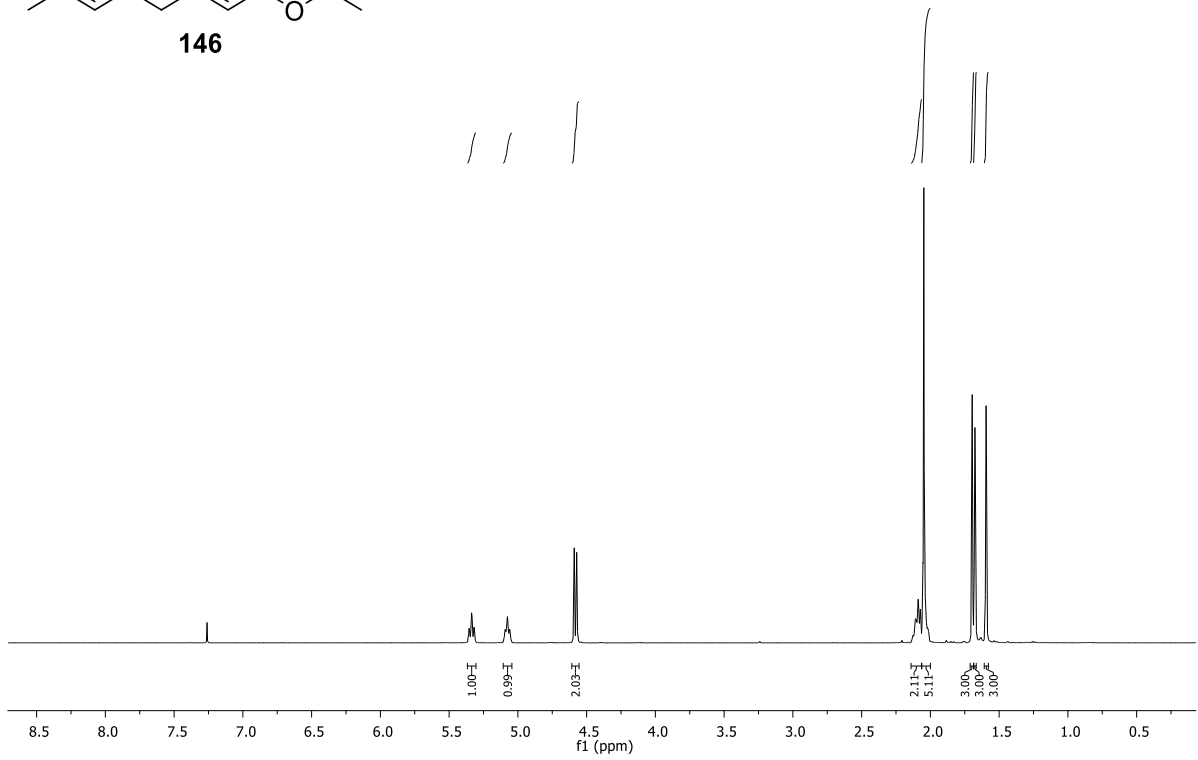
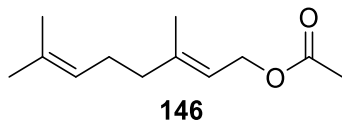


¹³C-NMR

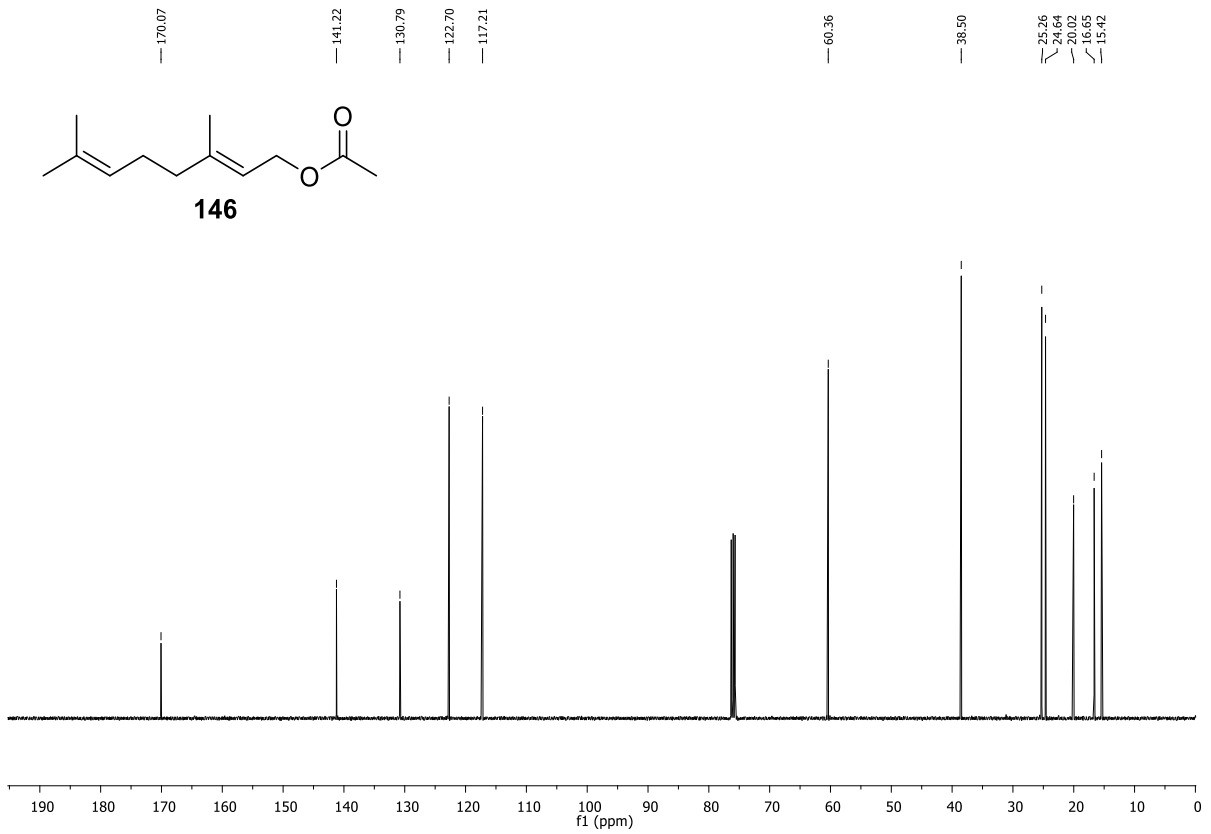
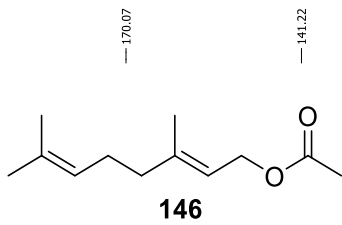


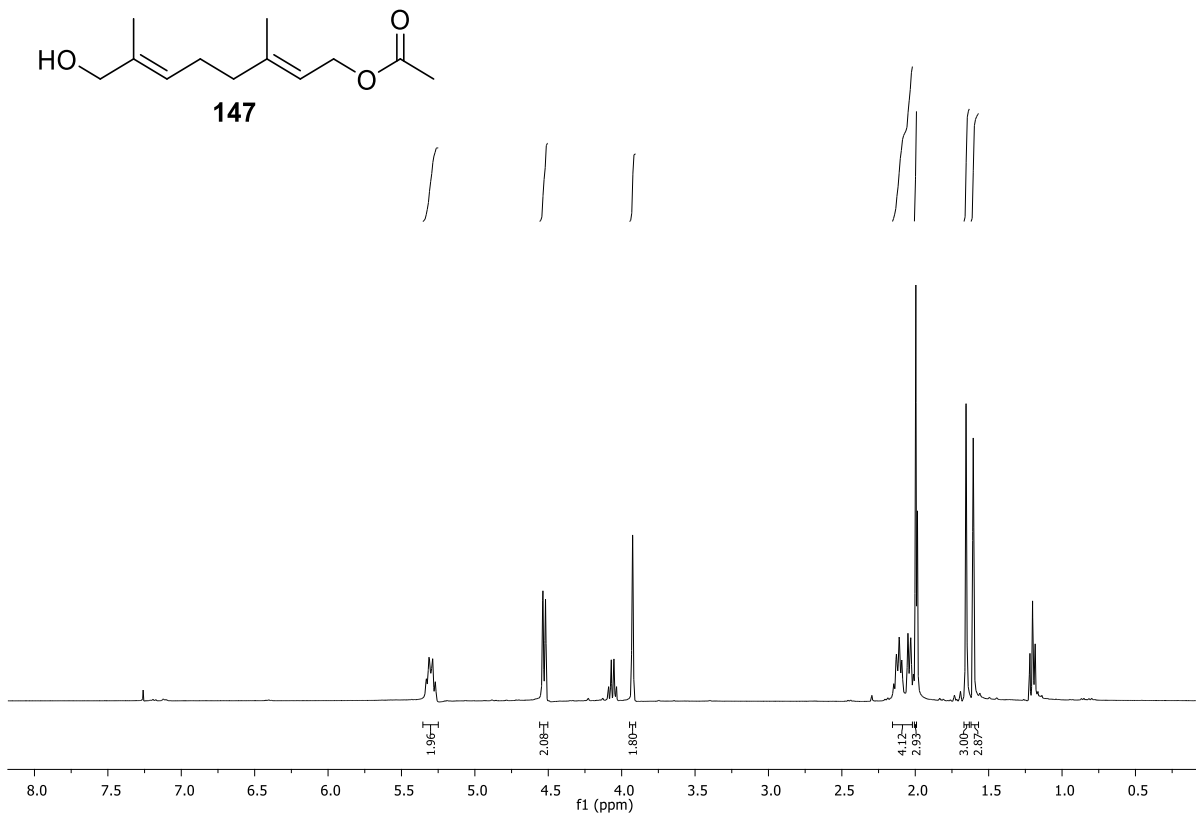
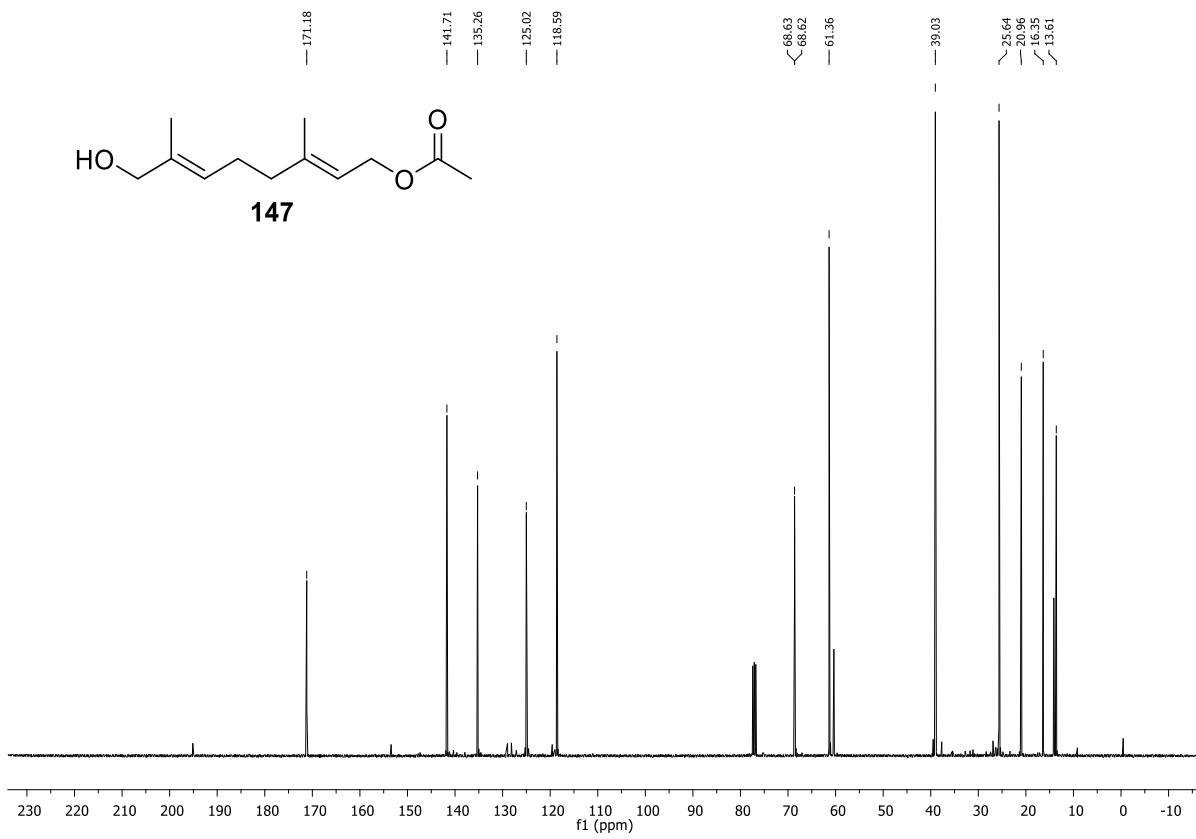
¹H-NMR¹³C-NMR

¹H-NMR

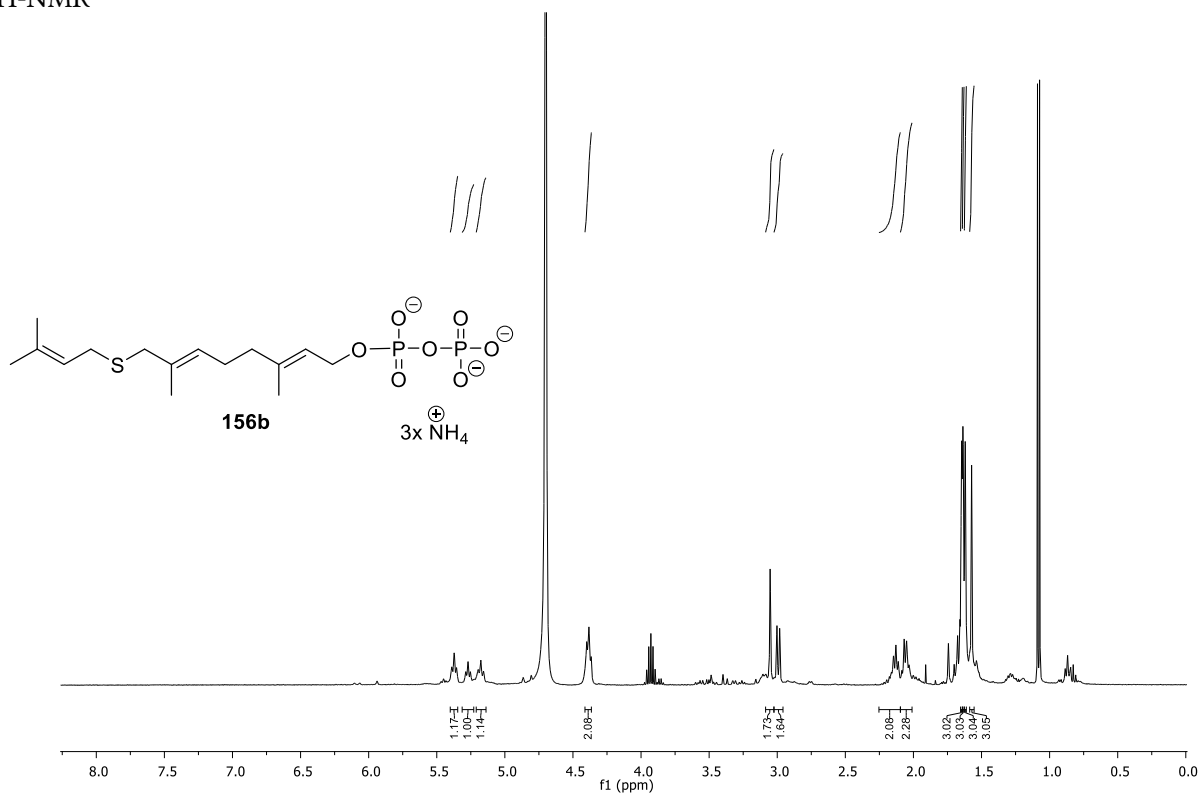


¹³C-NMR

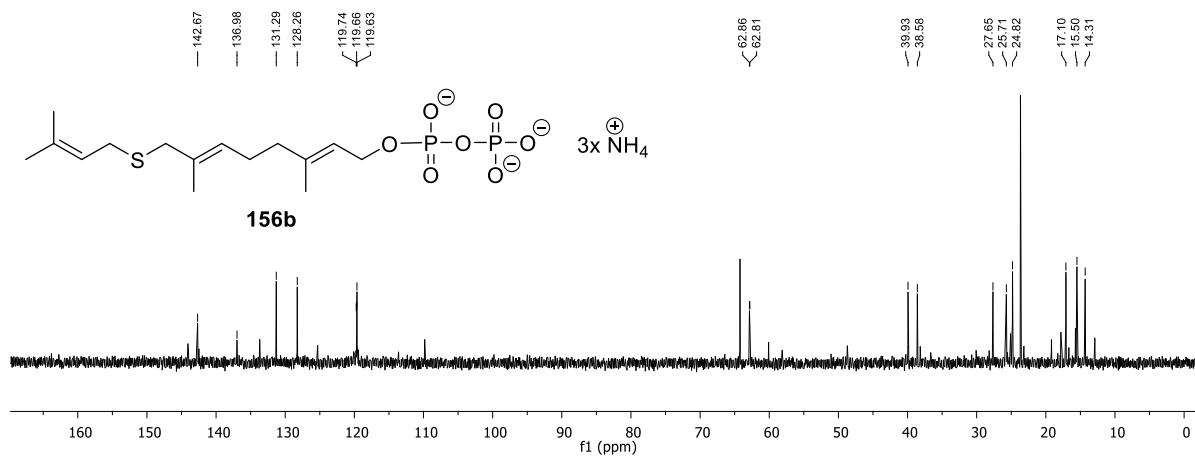


$^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

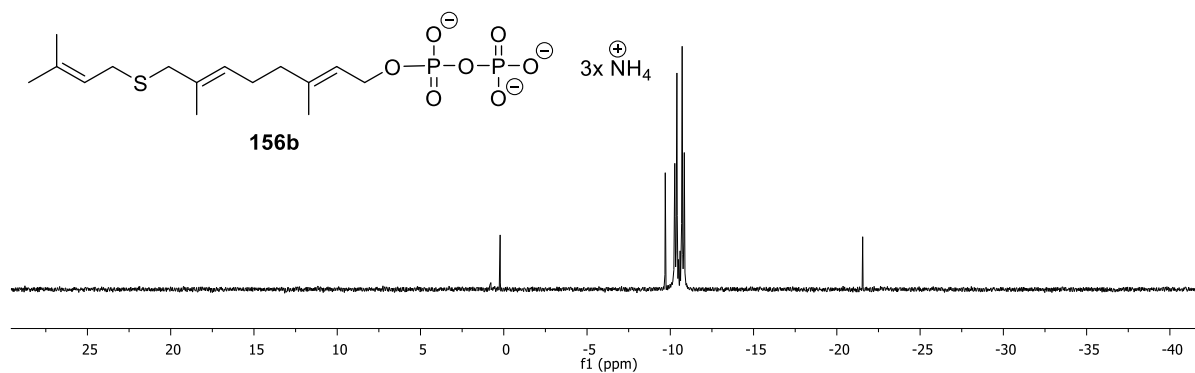
¹H-NMR

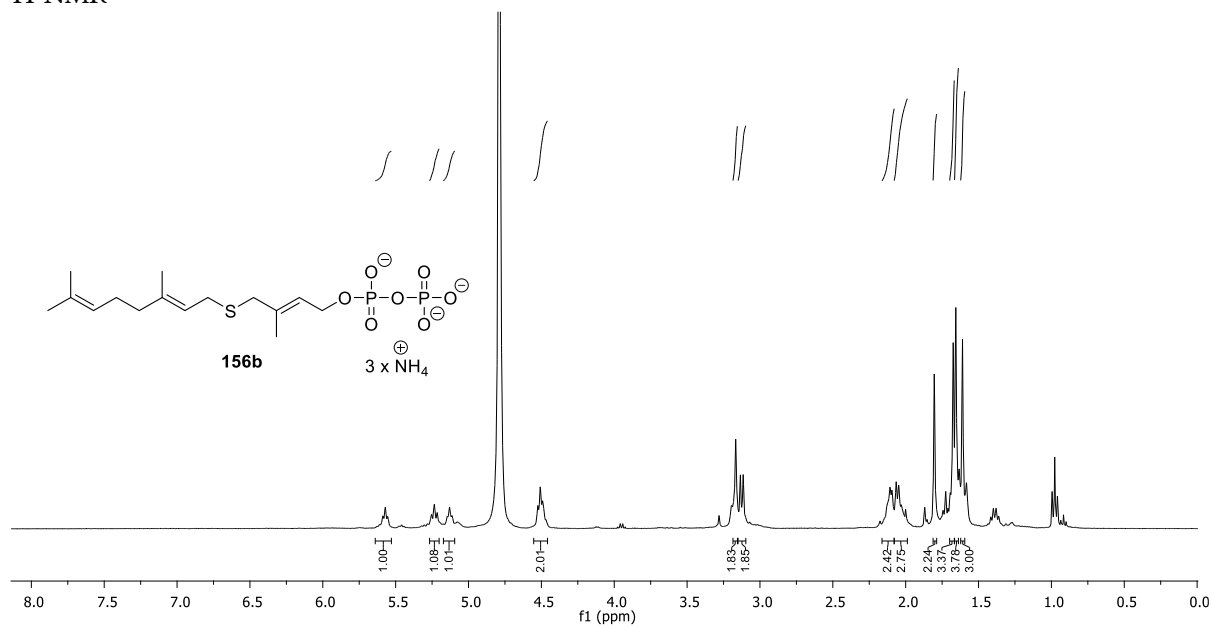
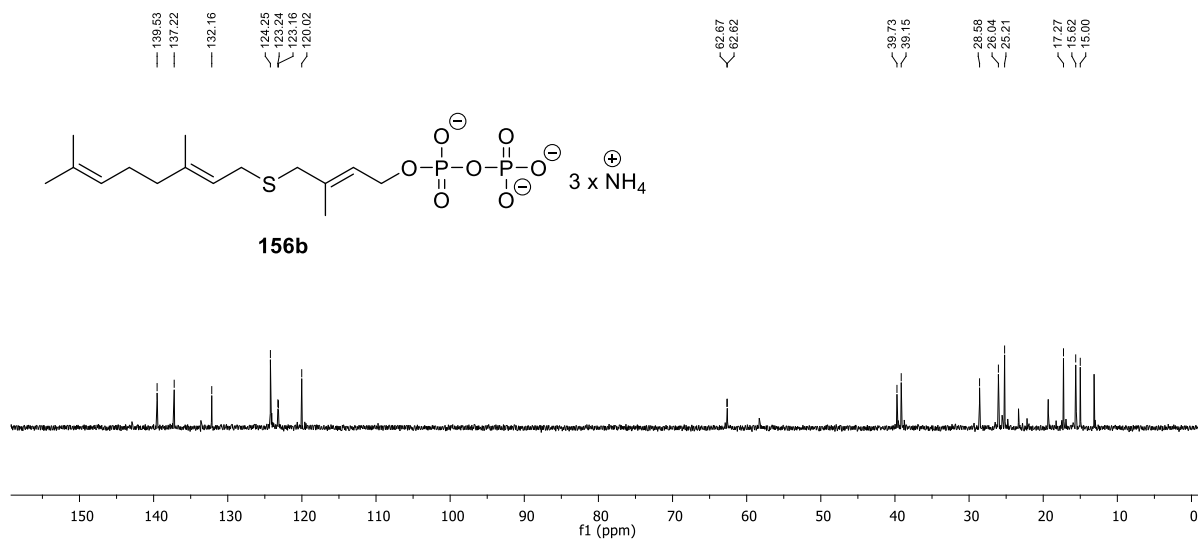
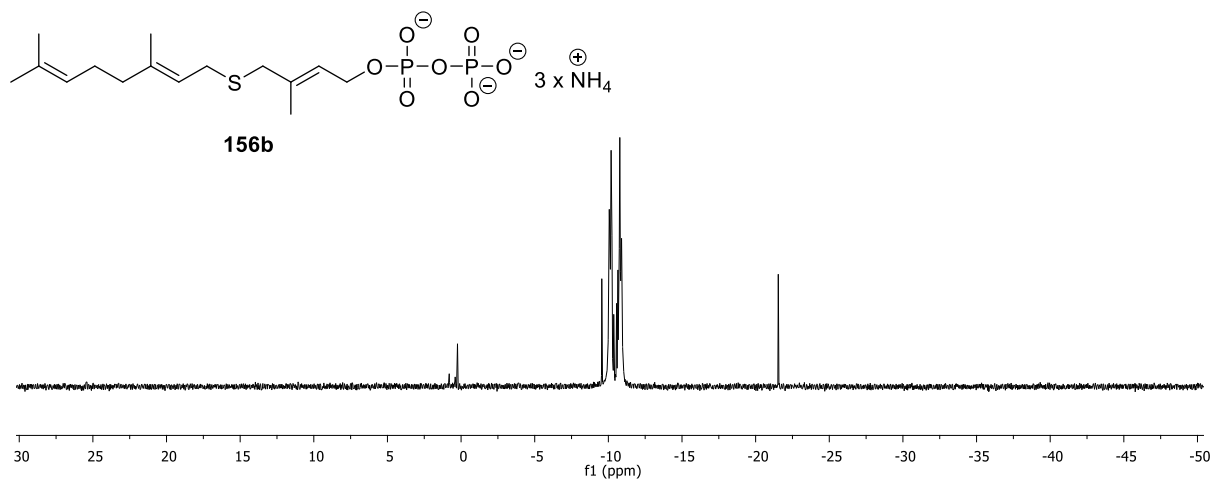


¹³C-NMR

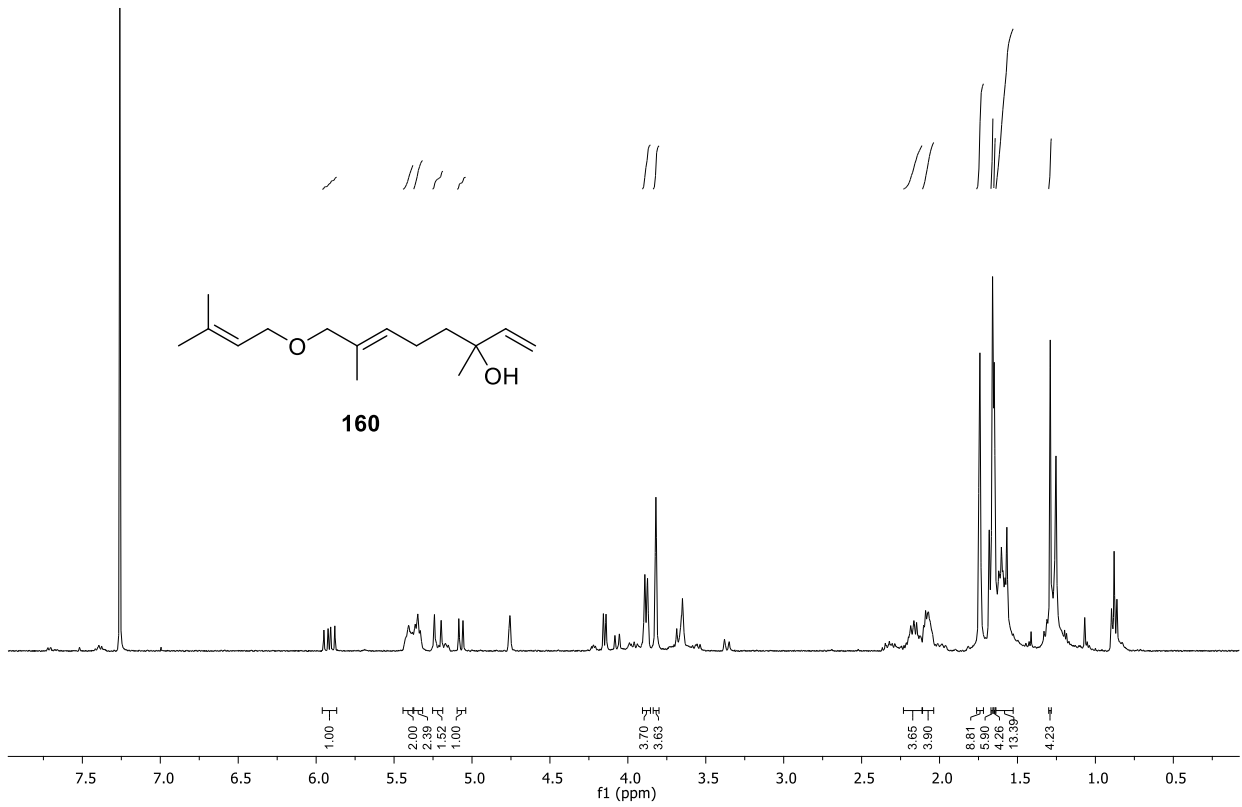


³¹P-NMR

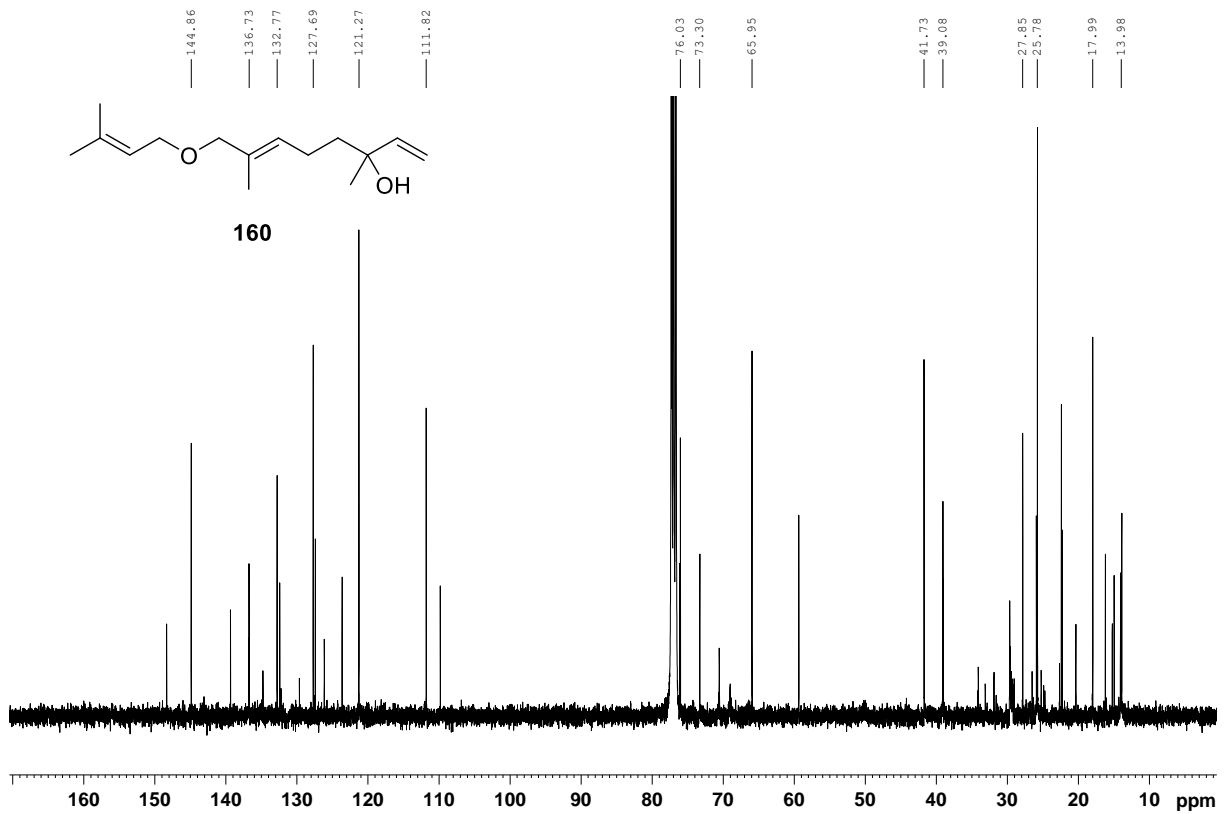


$^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$  $^{31}\text{P-NMR}$ 

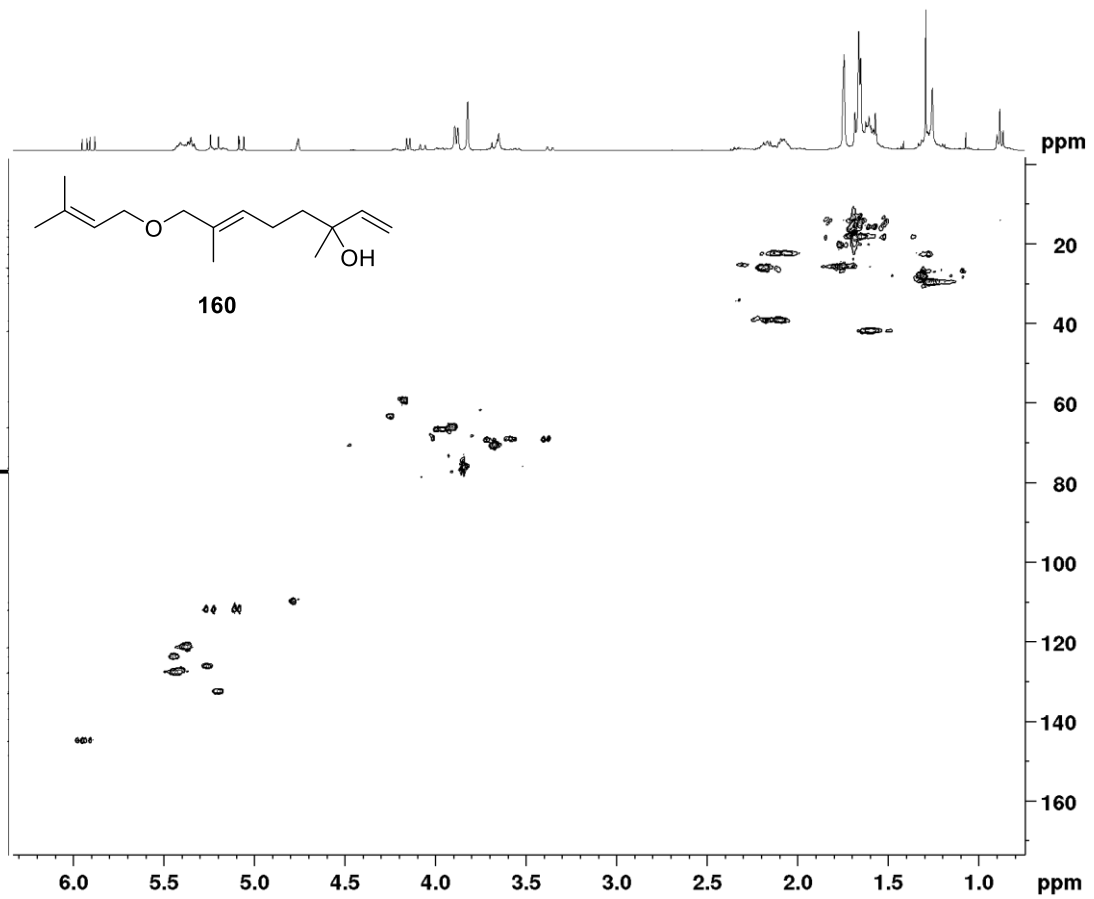
¹H-NMR



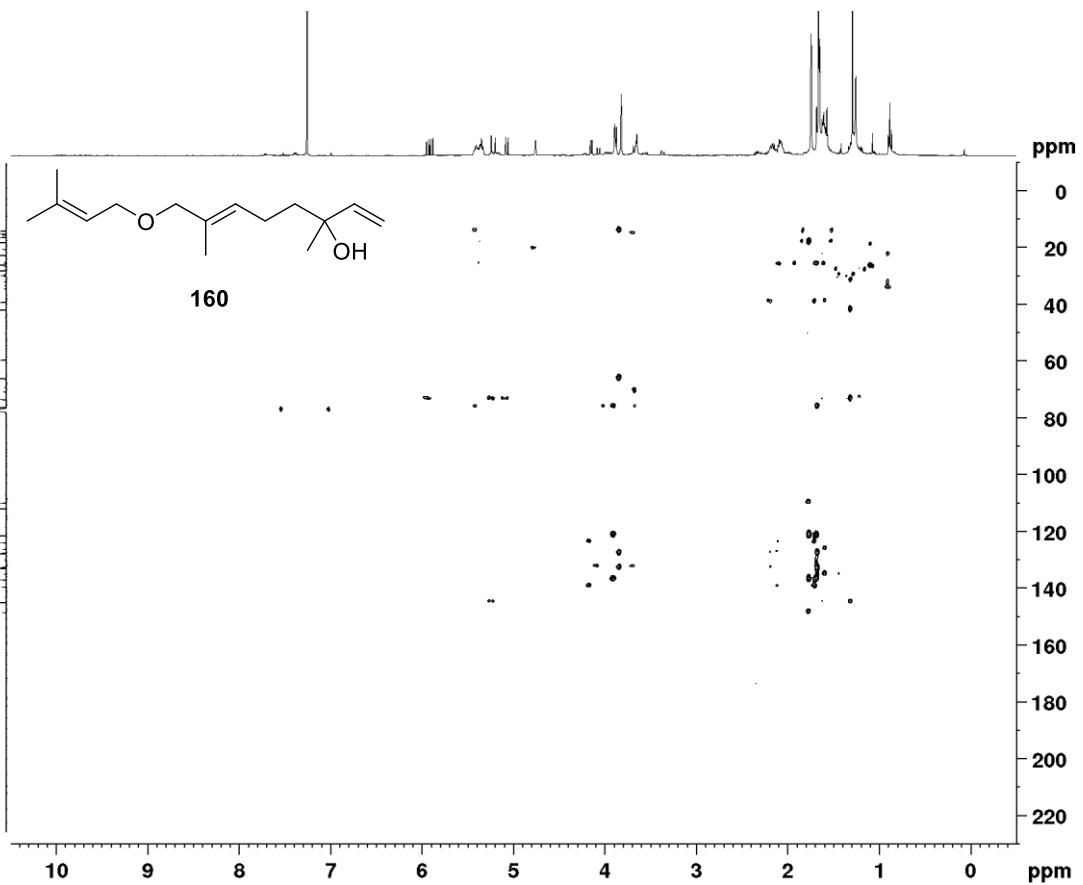
¹³C-NMR

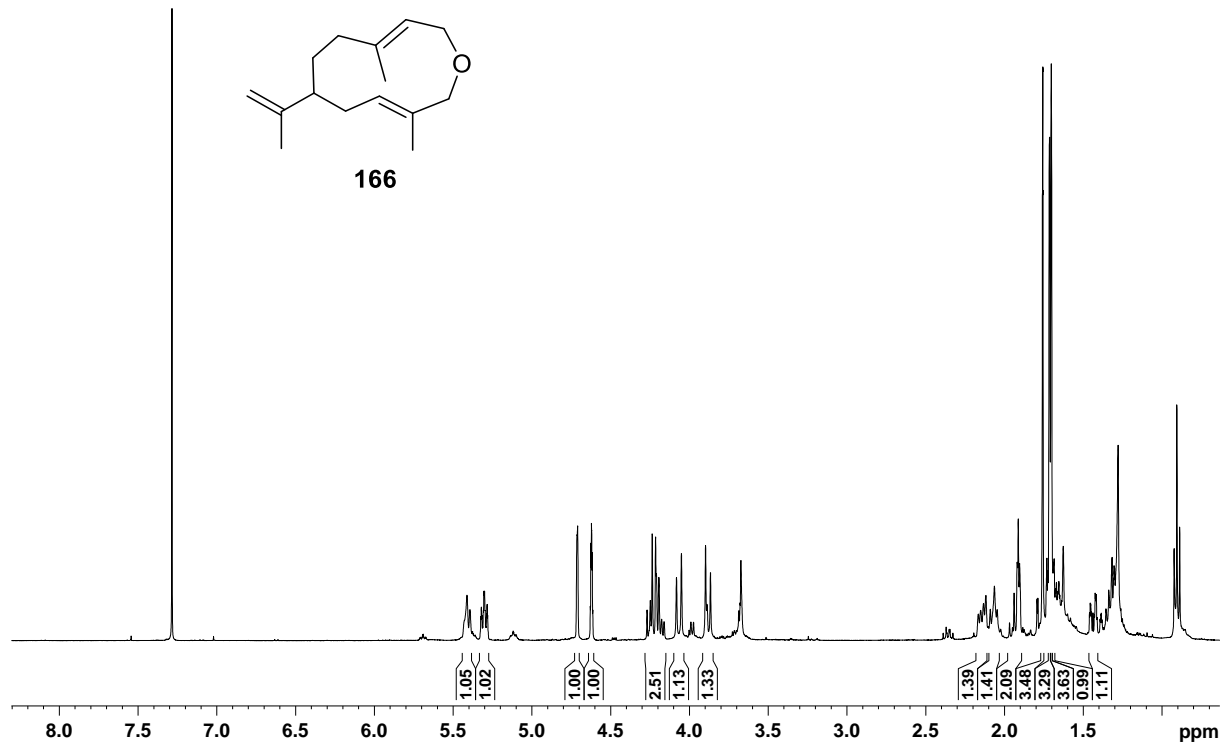
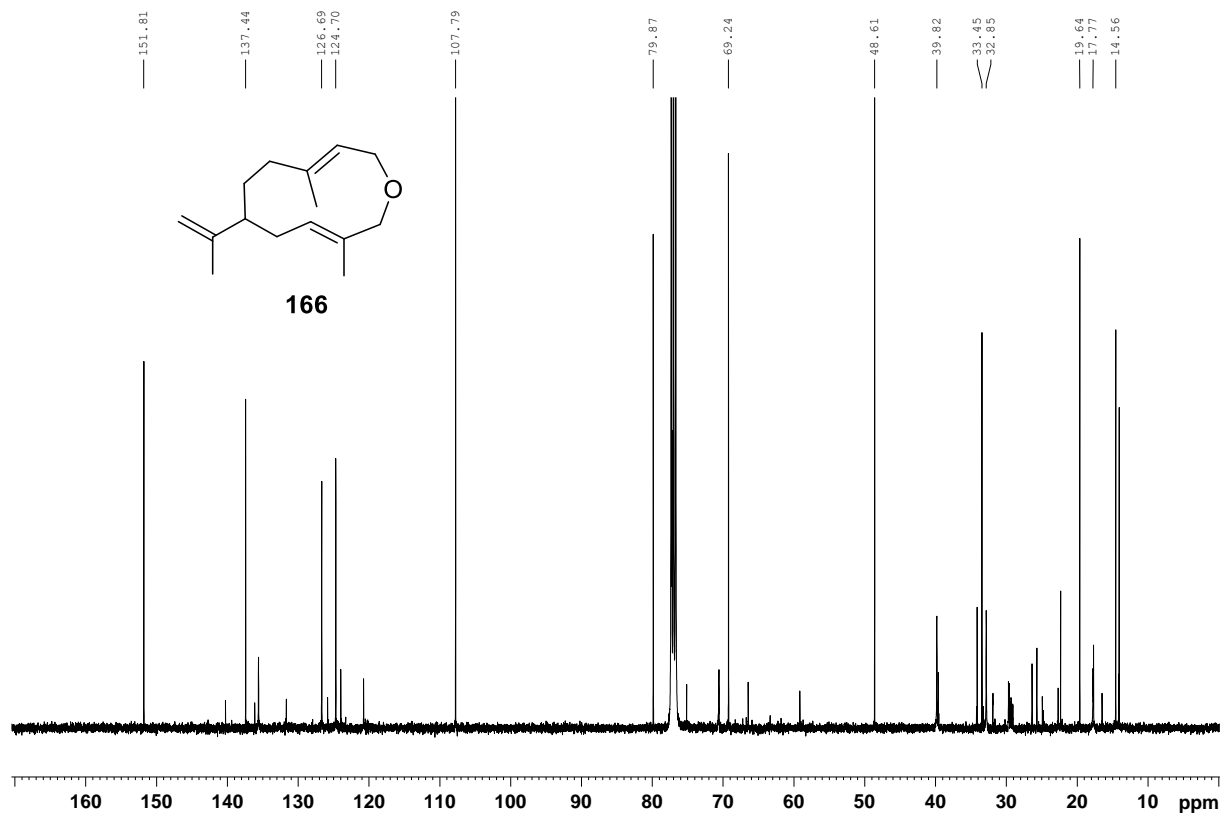


HSQC

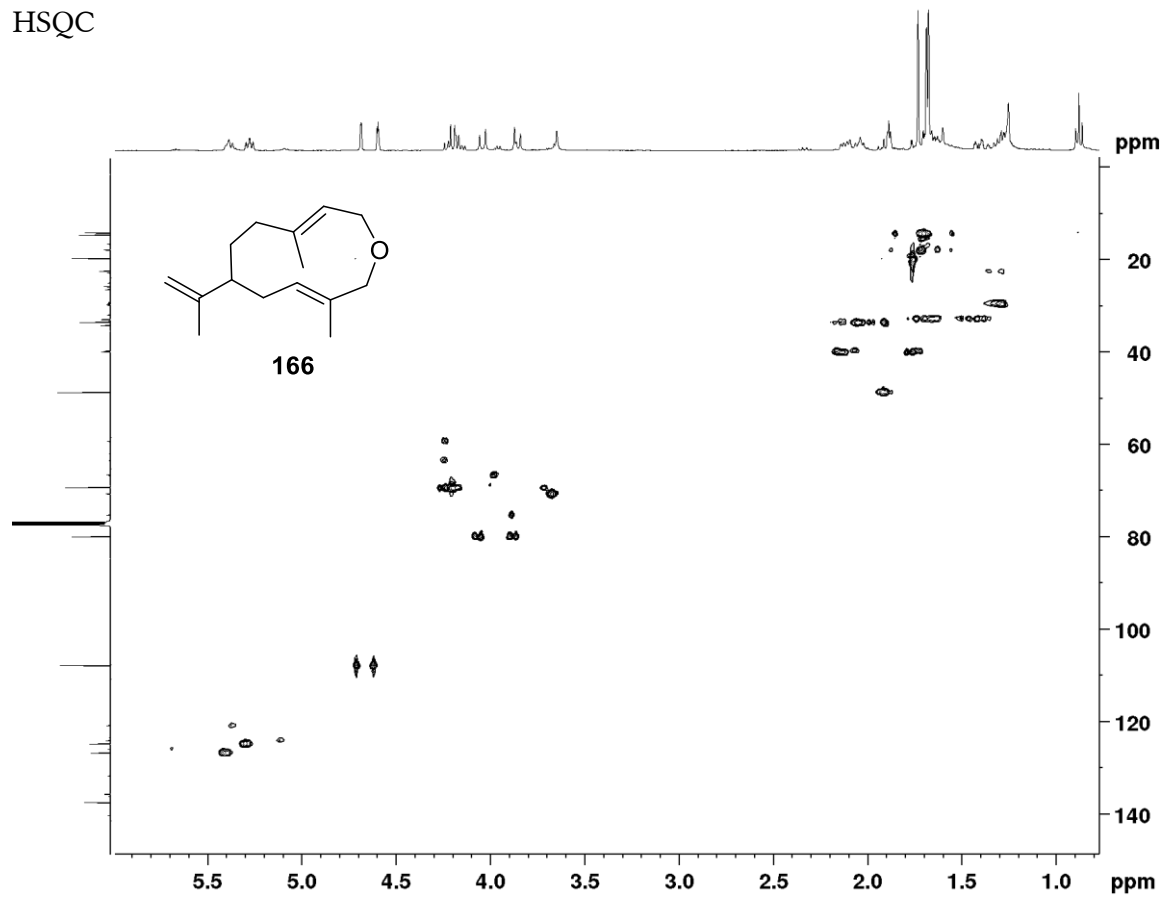


HMBC

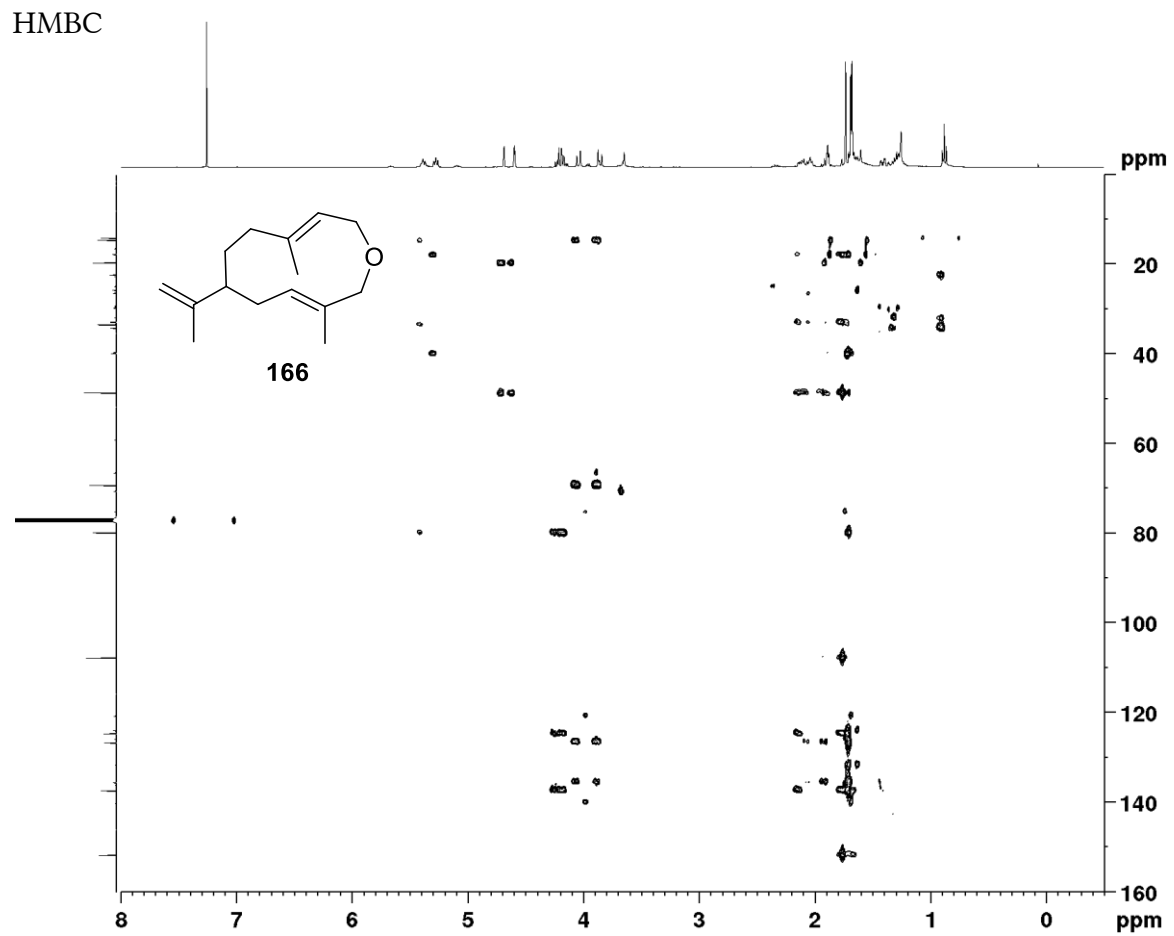


$^1\text{H-NMR}$  $^{13}\text{C-NMR}$ 

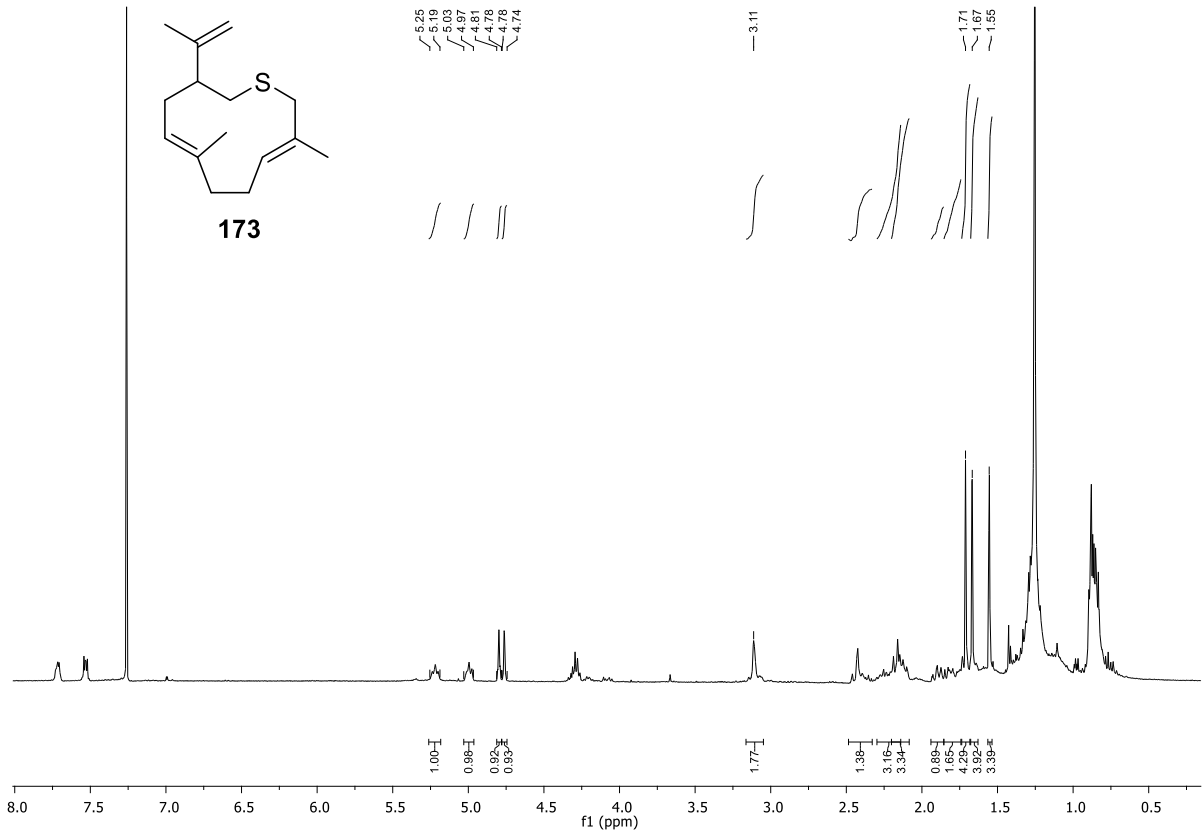
HSQC



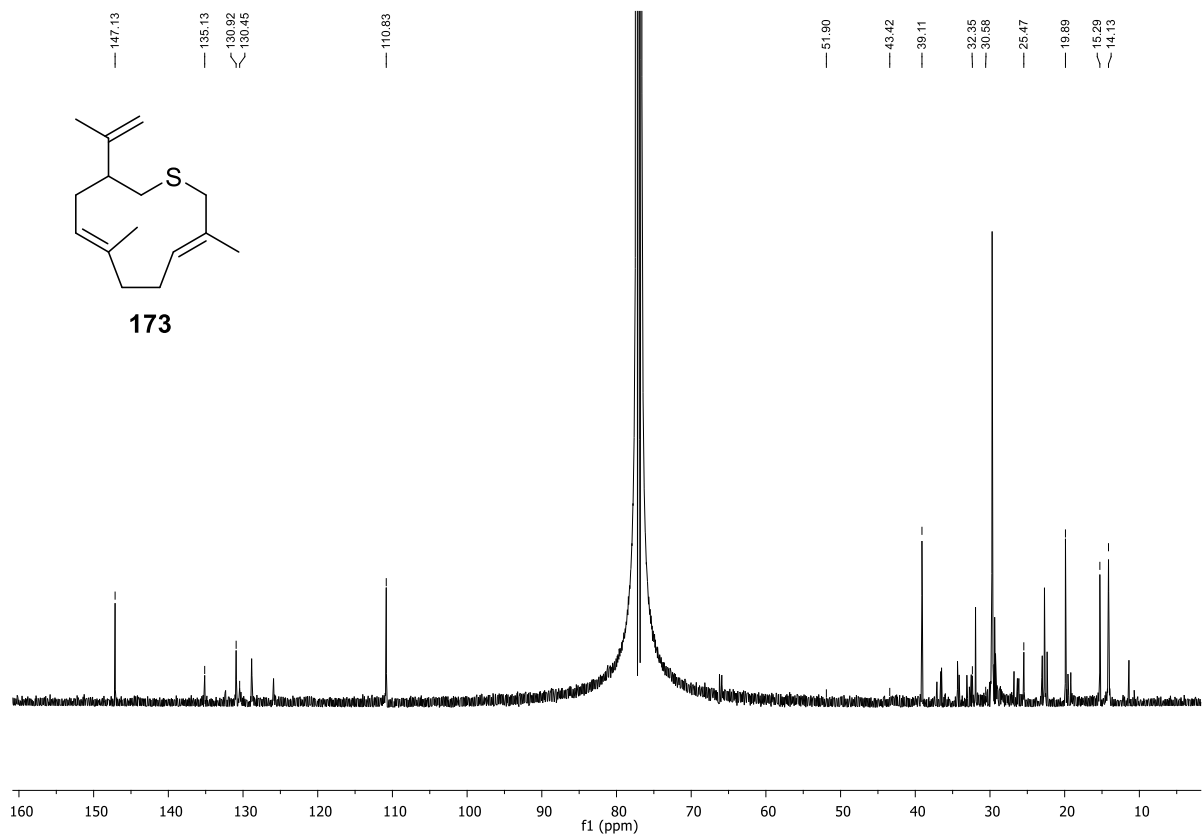
HMBC



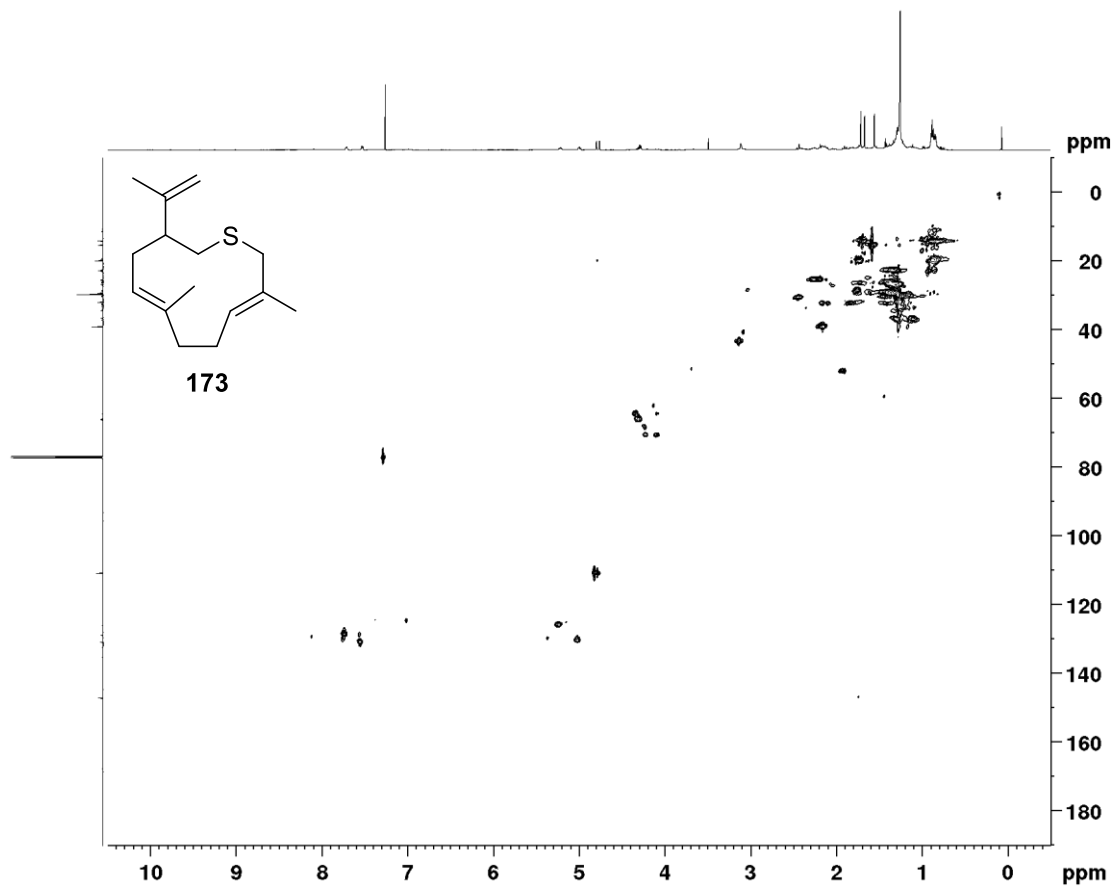
¹H-NMR-Spektrum



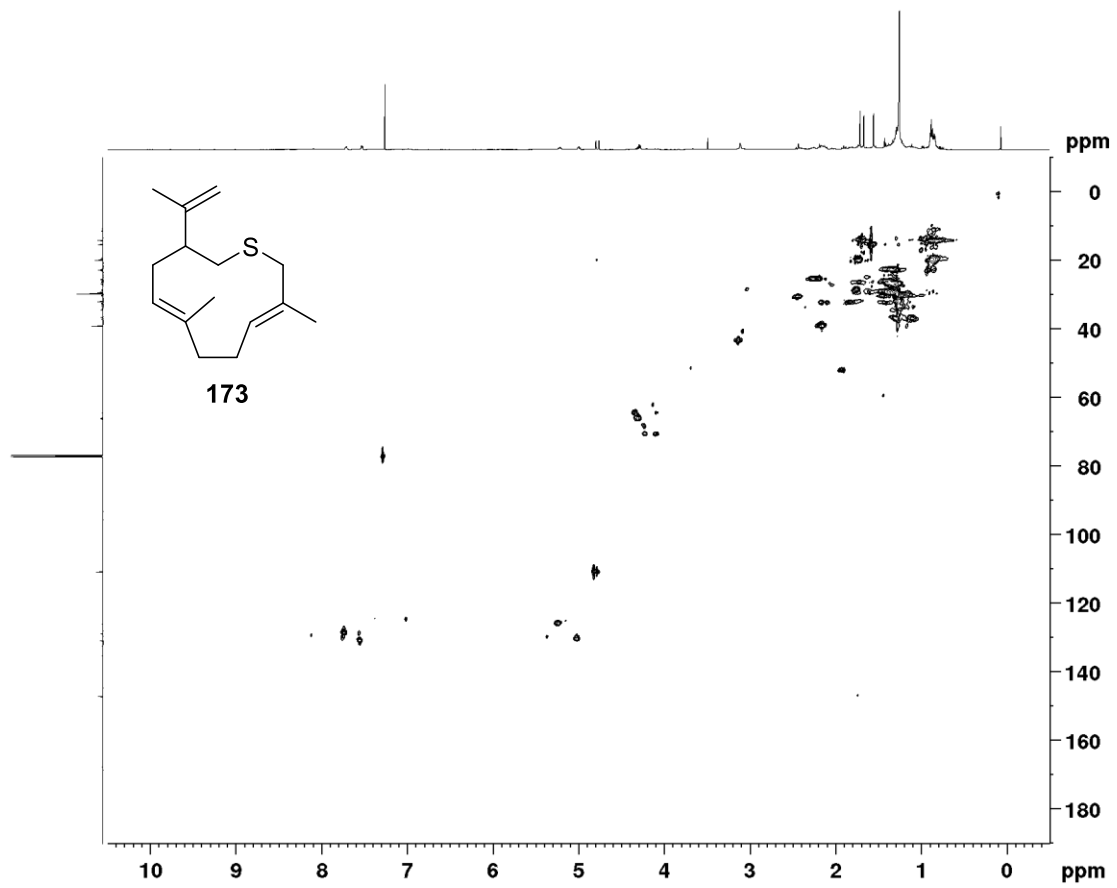
¹³C-NMR-Spektrum



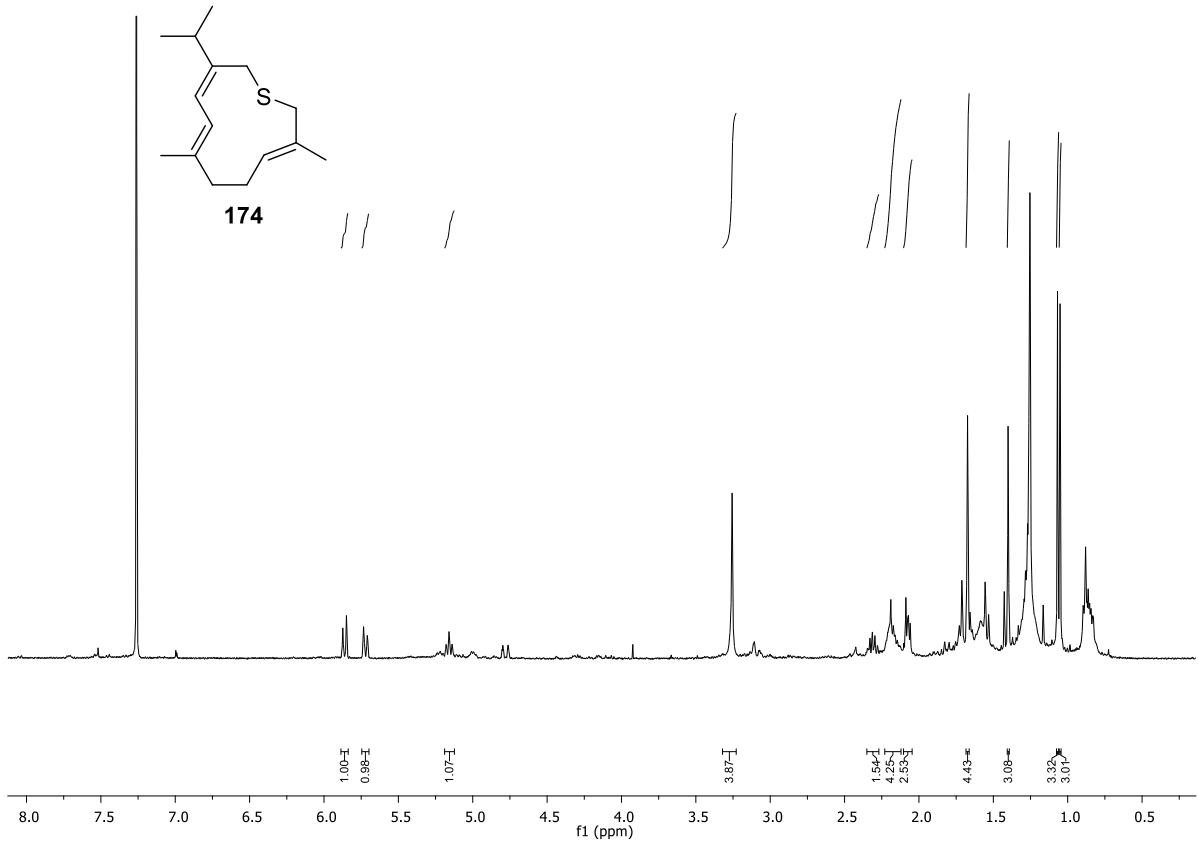
HSQC



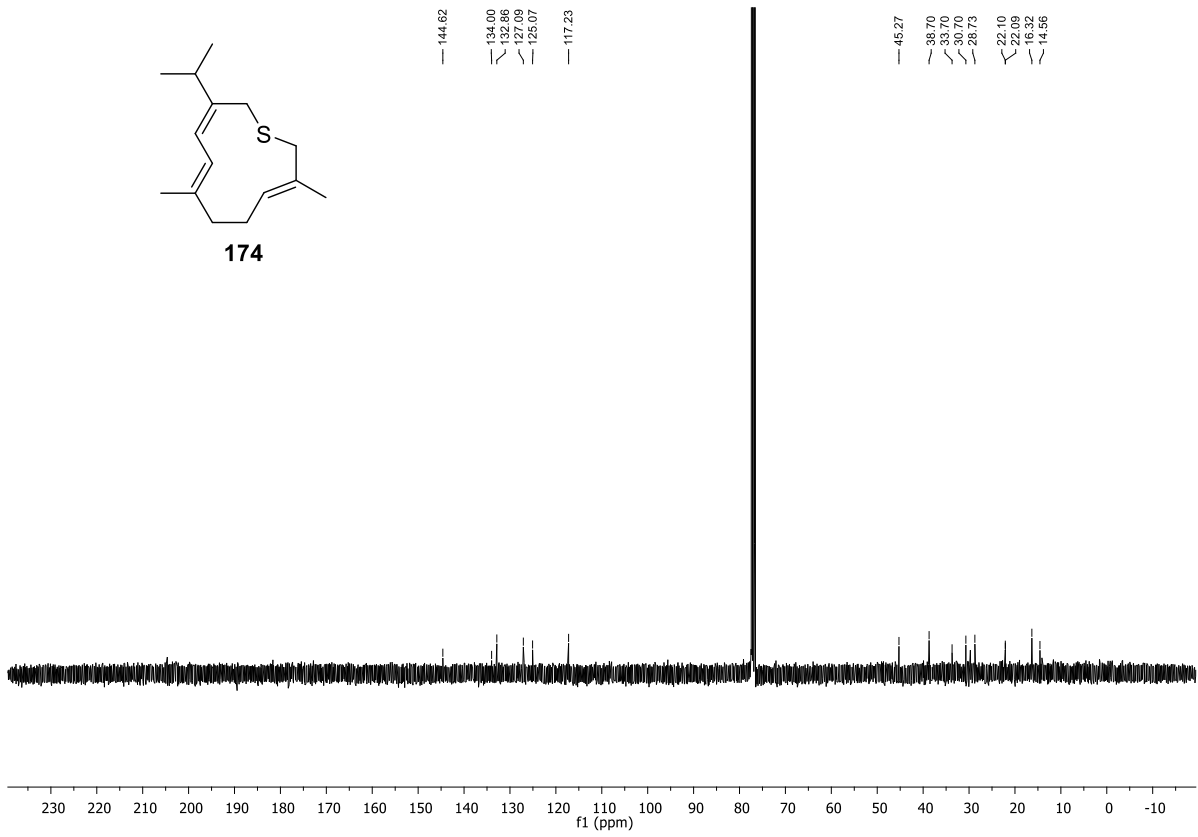
HMBC



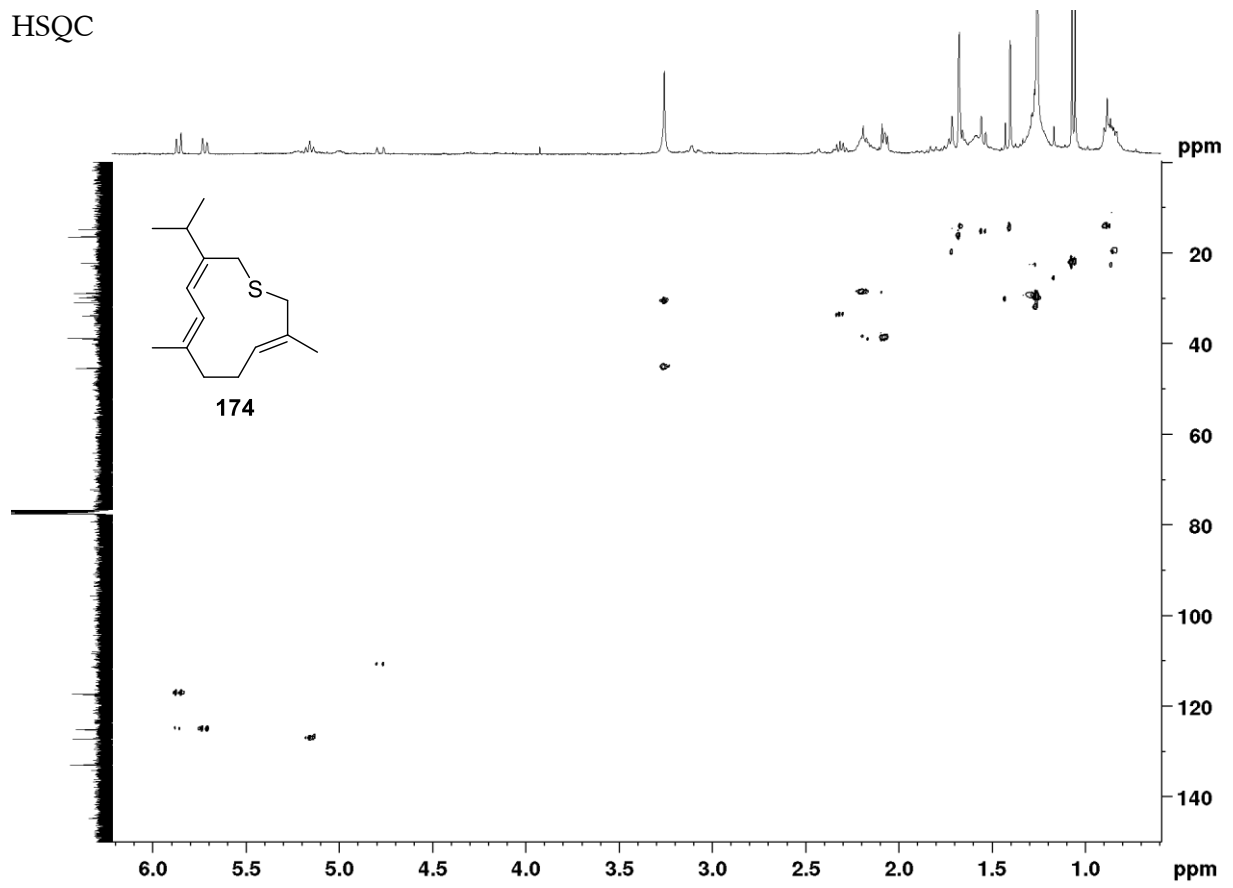
¹H-NMR



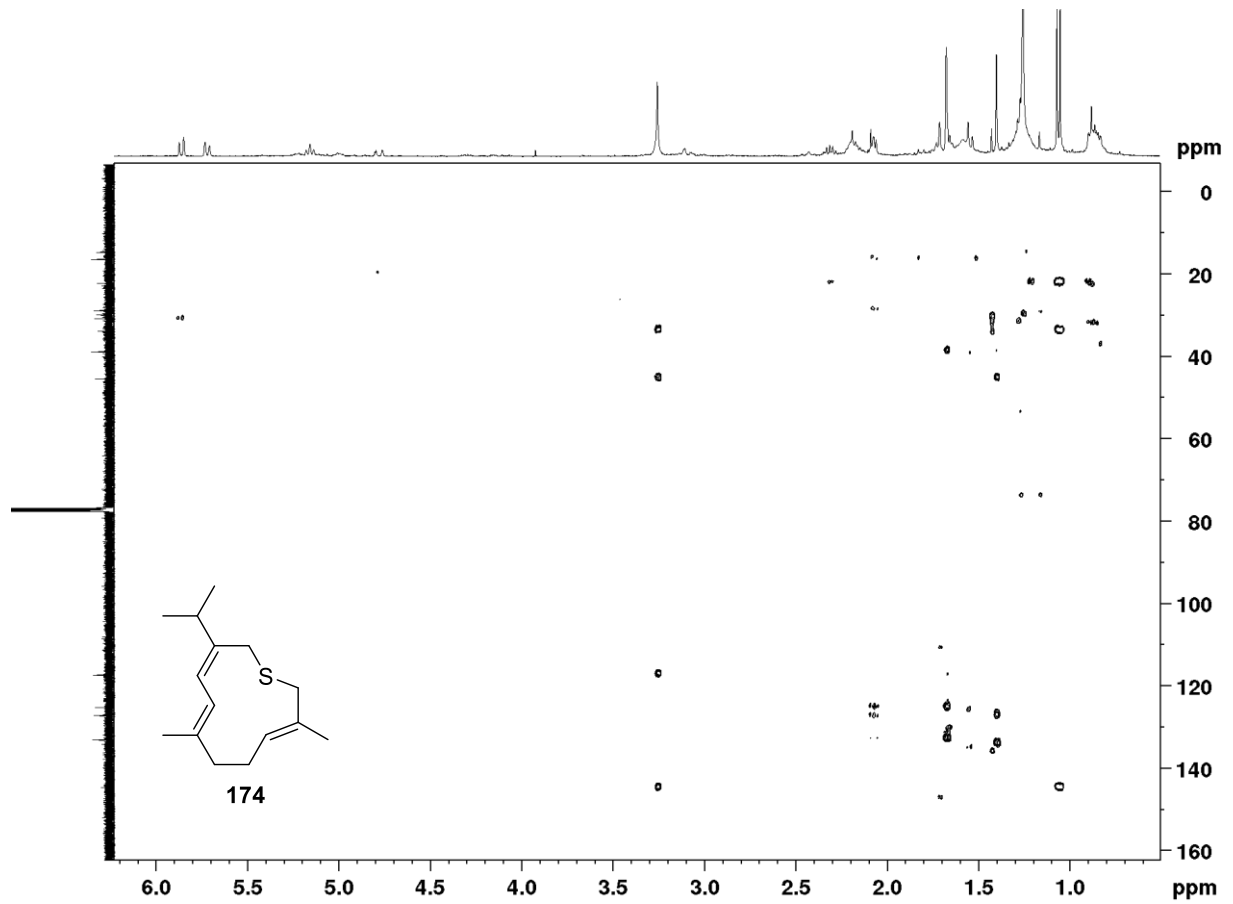
¹³C-NMR



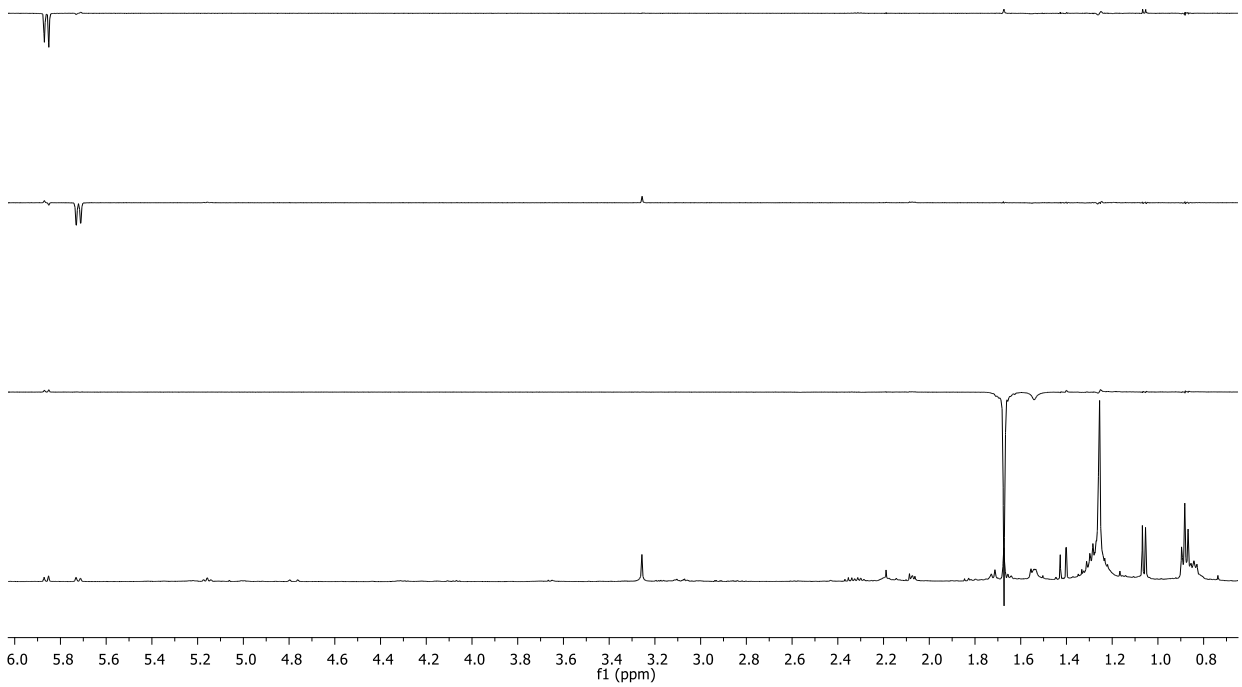
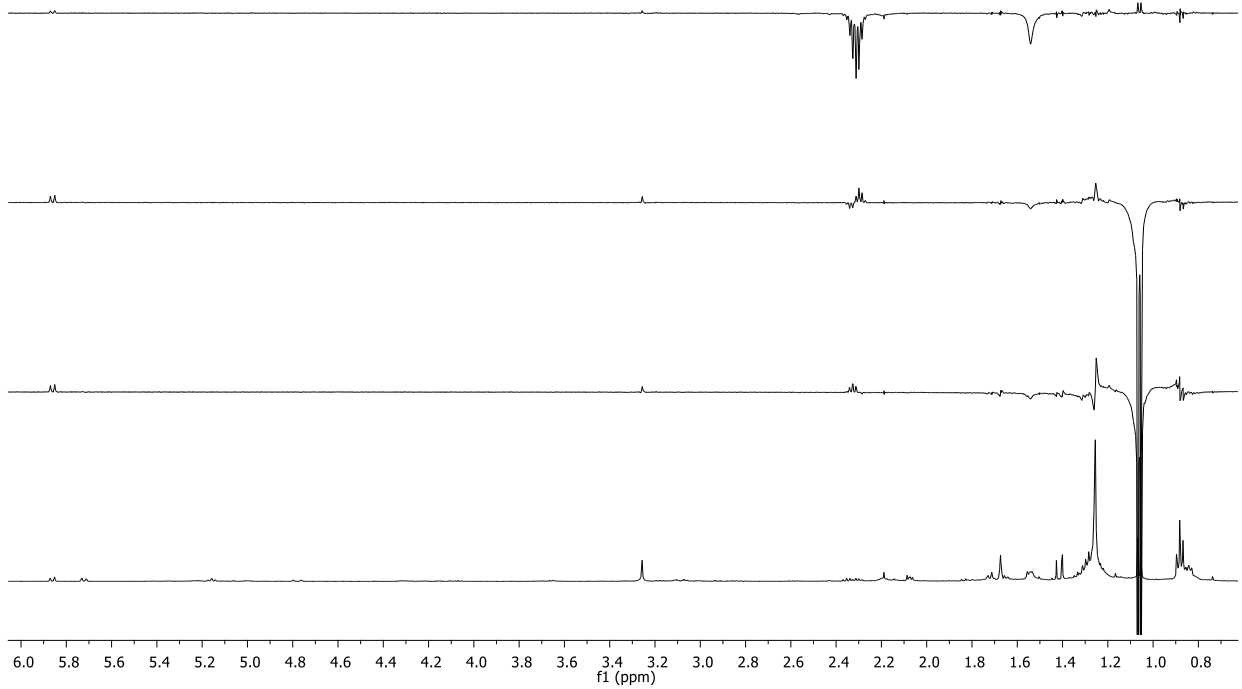
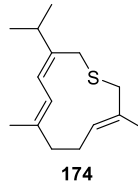
HSQC

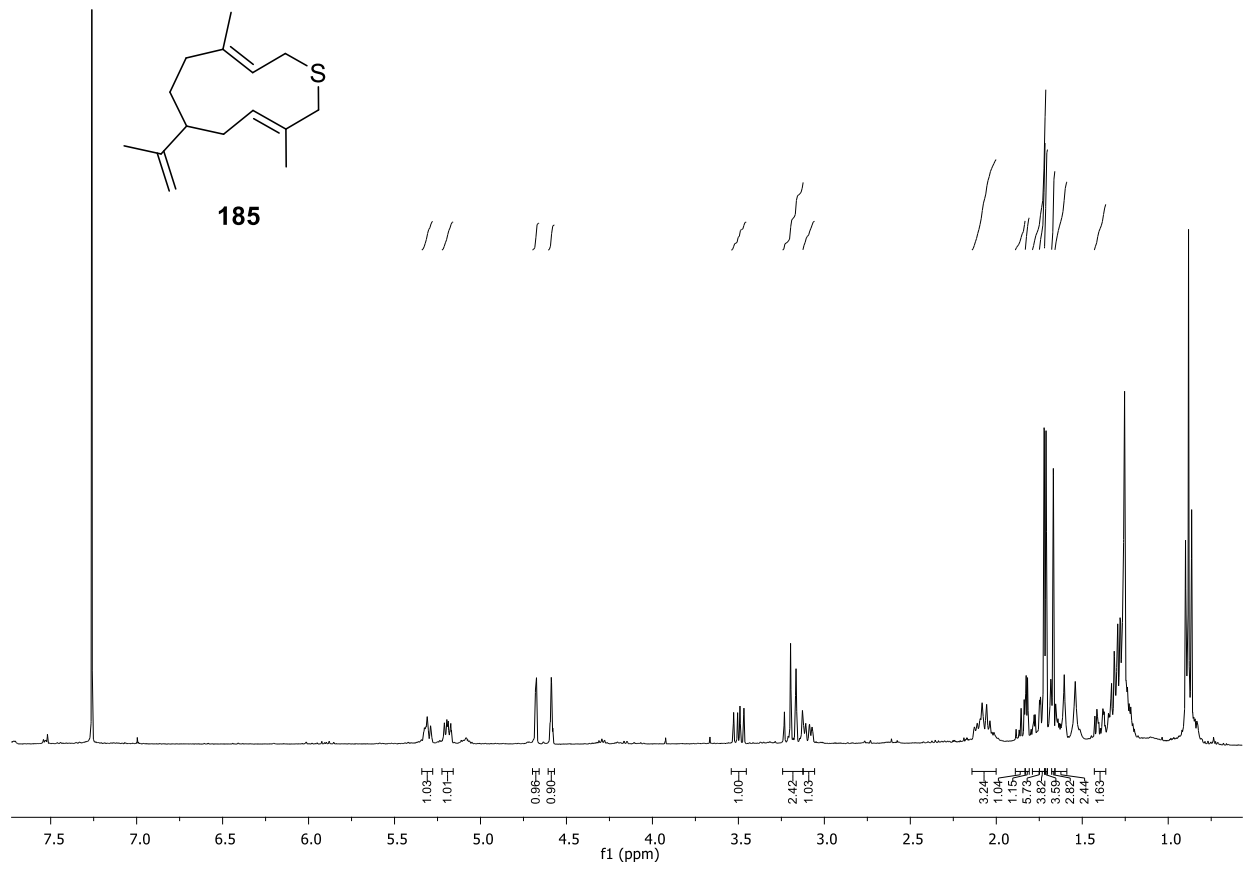
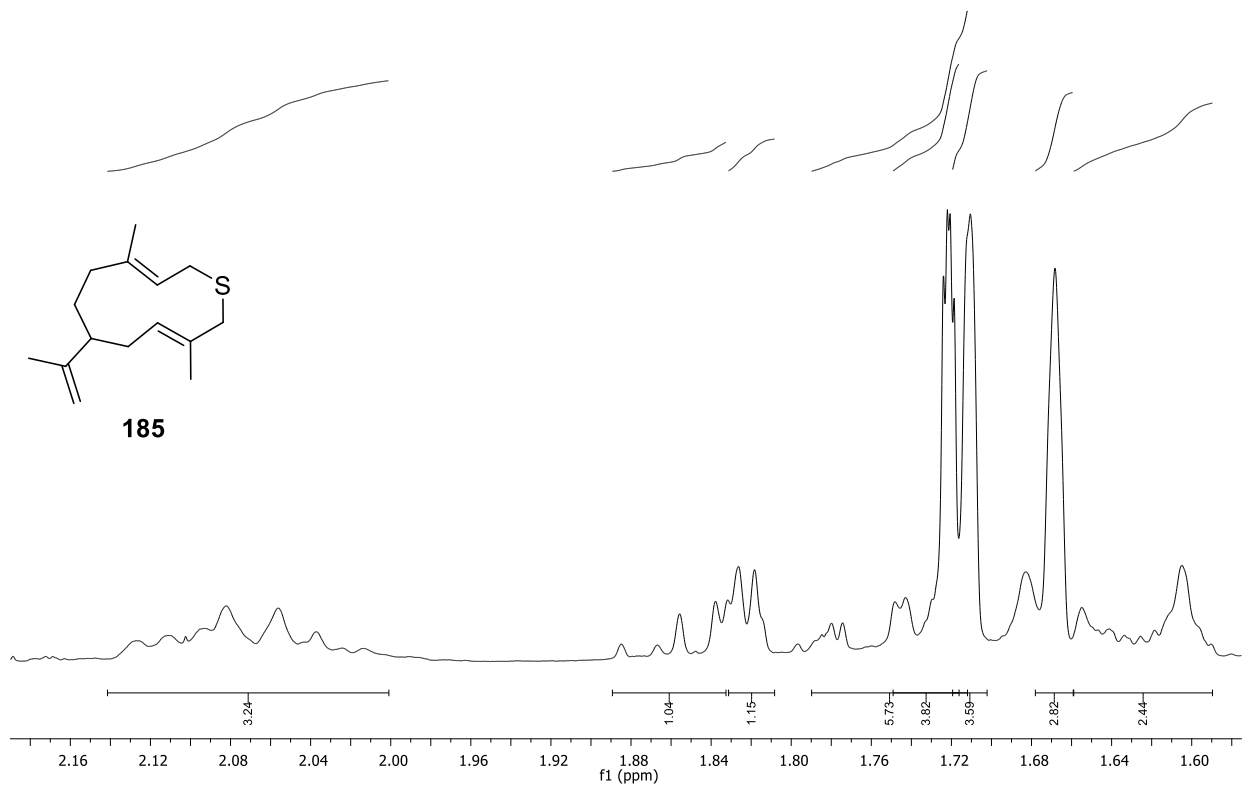


HMBC

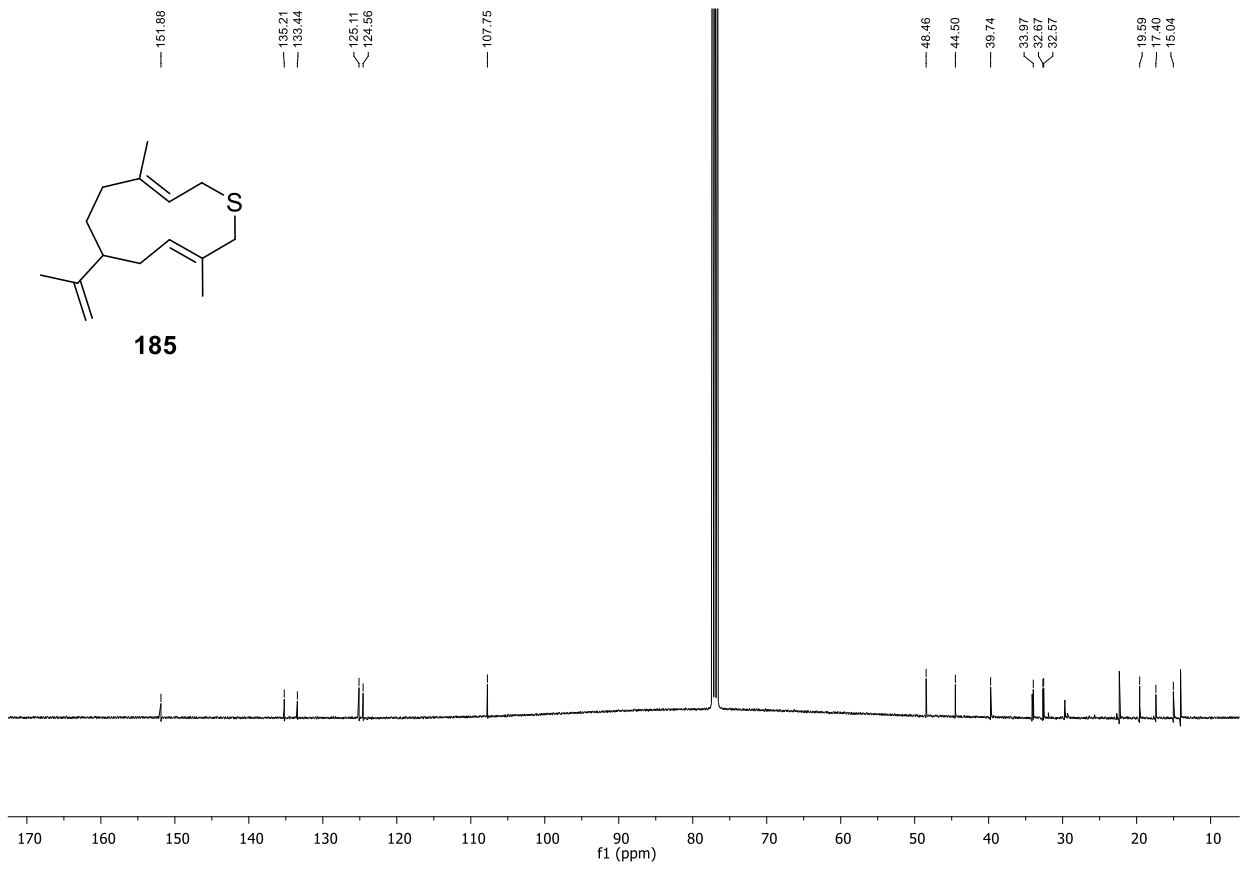


NOE experiments of 174.

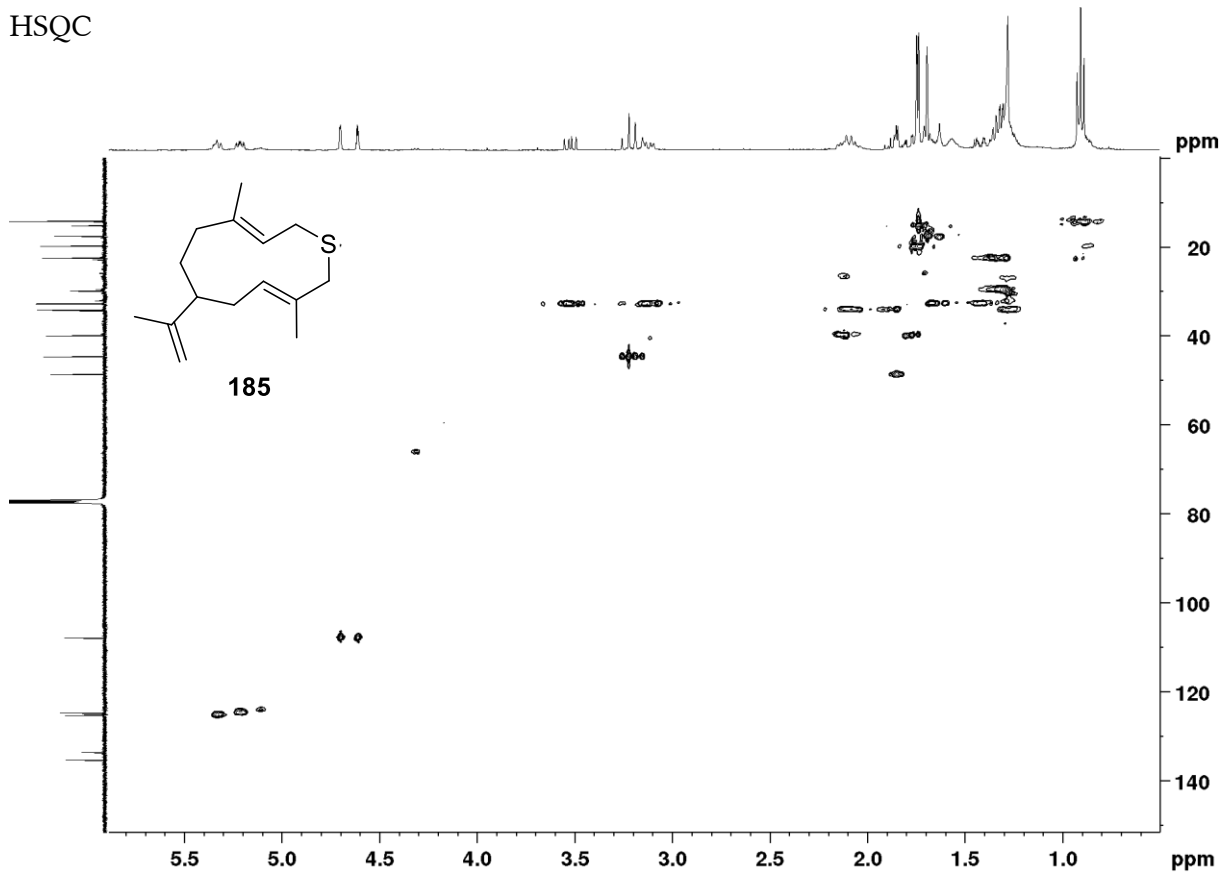


¹H-NMR-SpektrumAusschnitt des ¹H-NMR-Spektrums

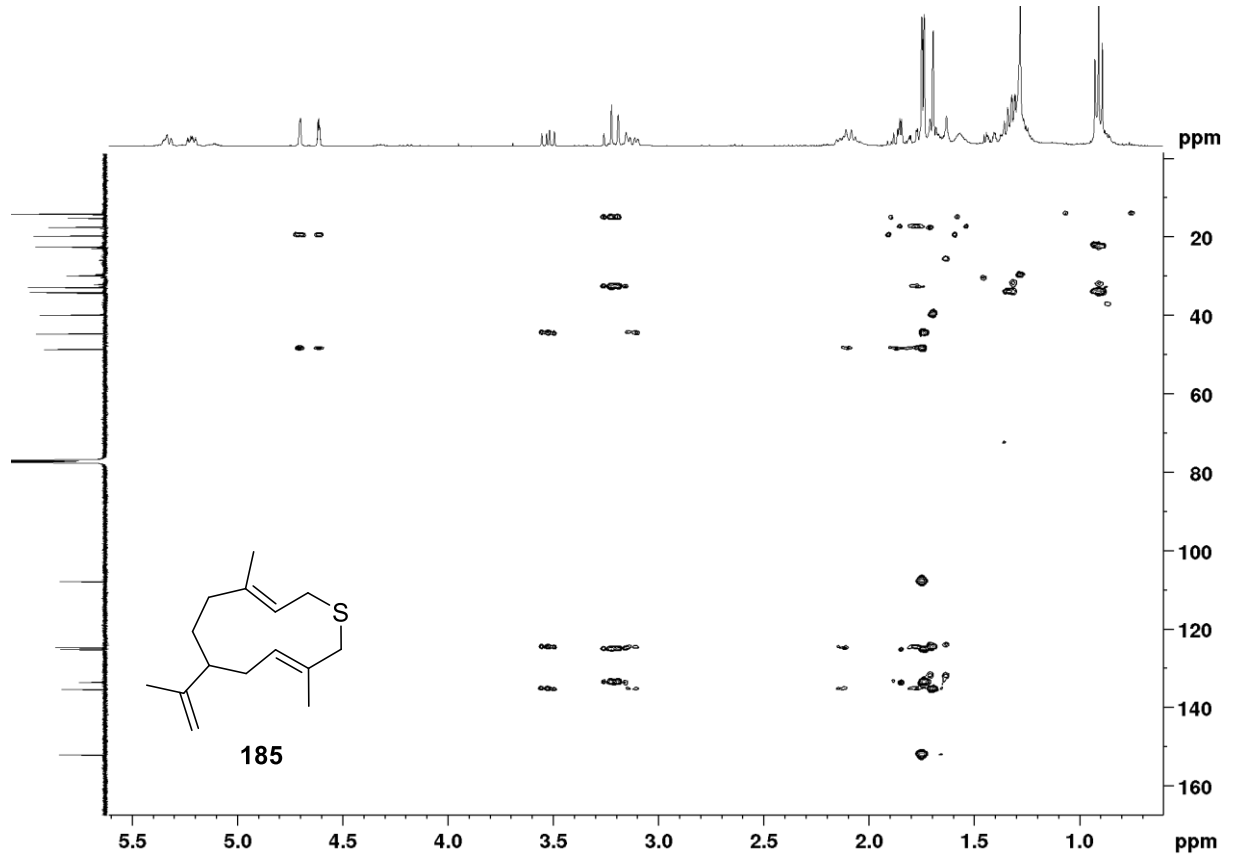
¹³C-NMR-Spektrum

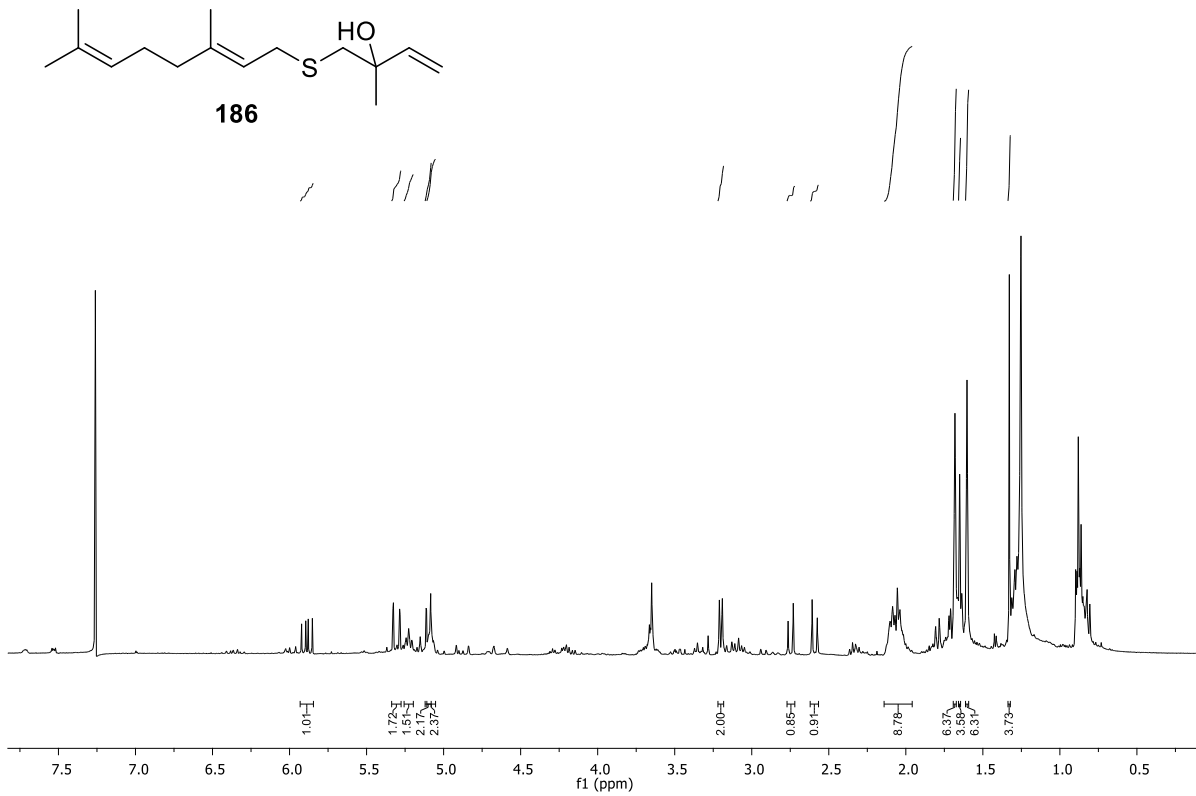
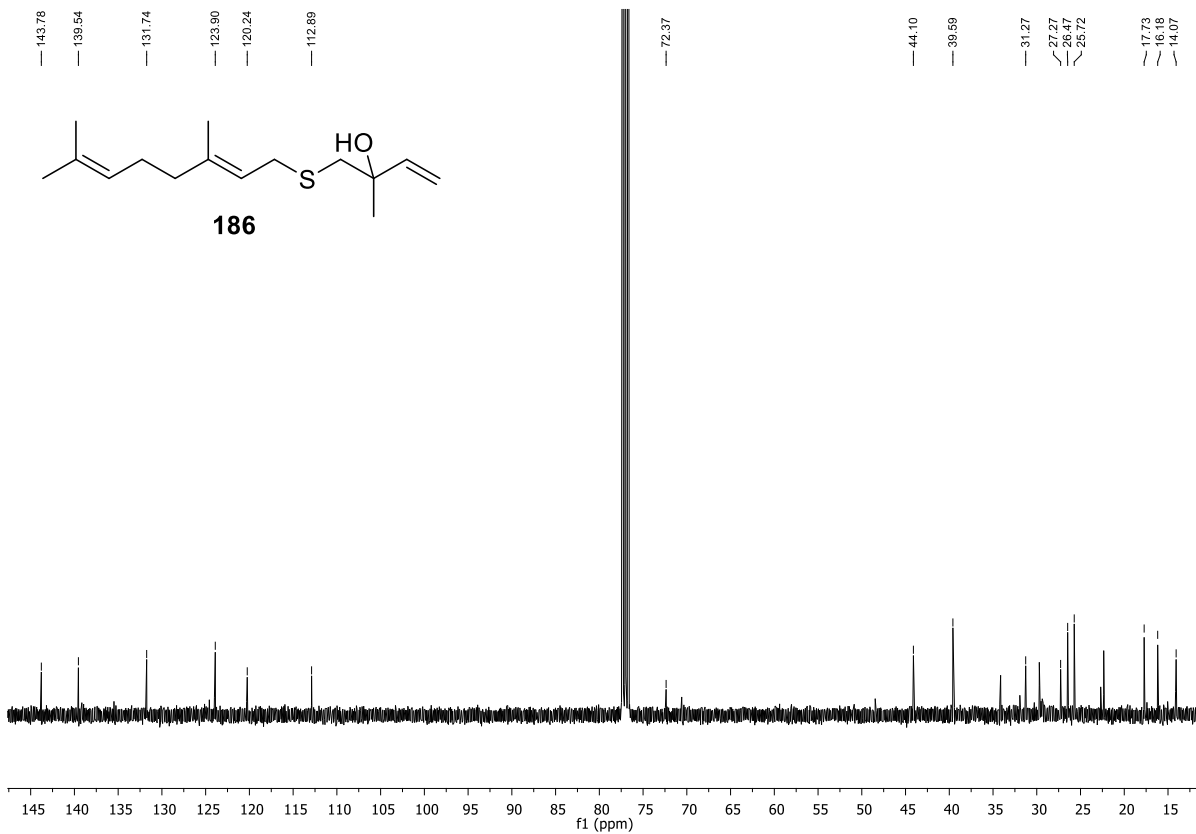


HSQC

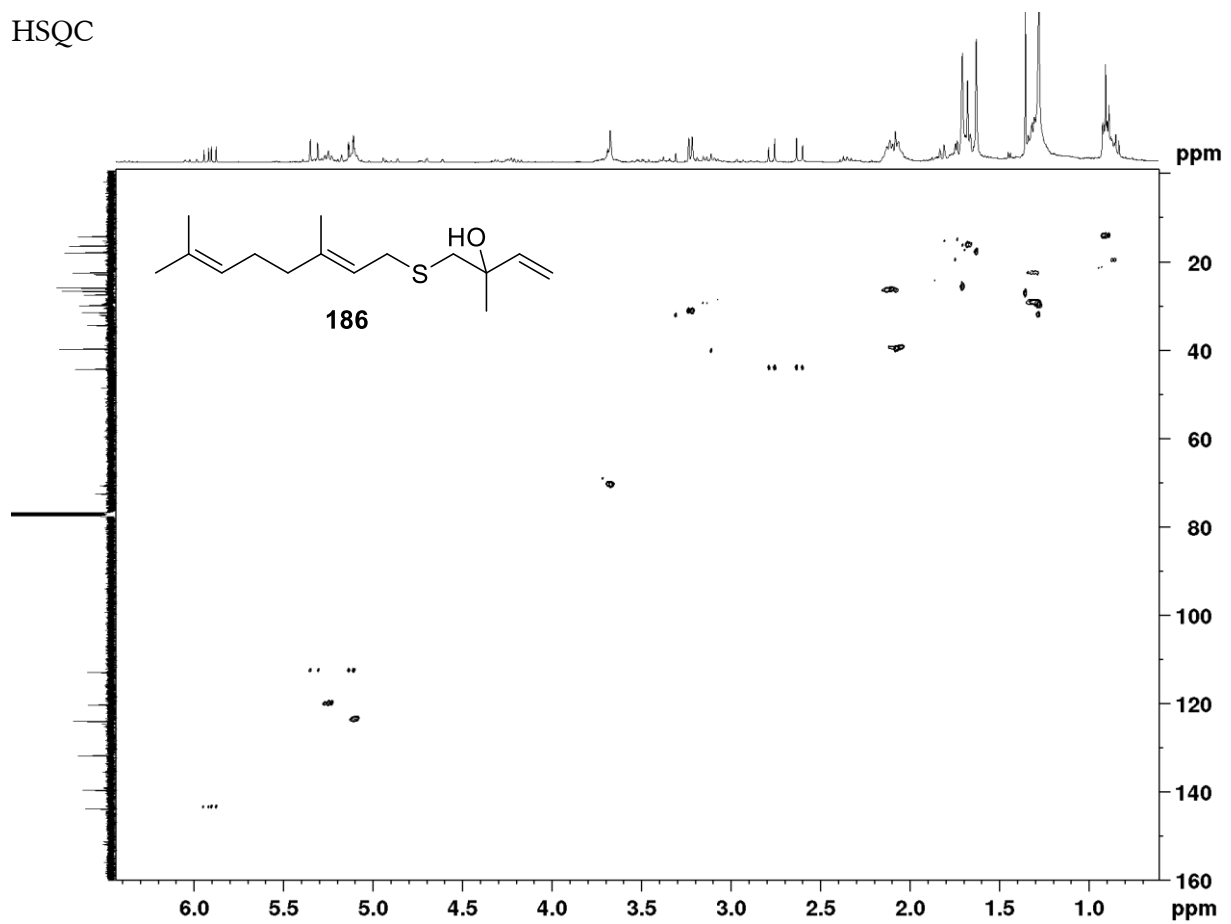


HMBC

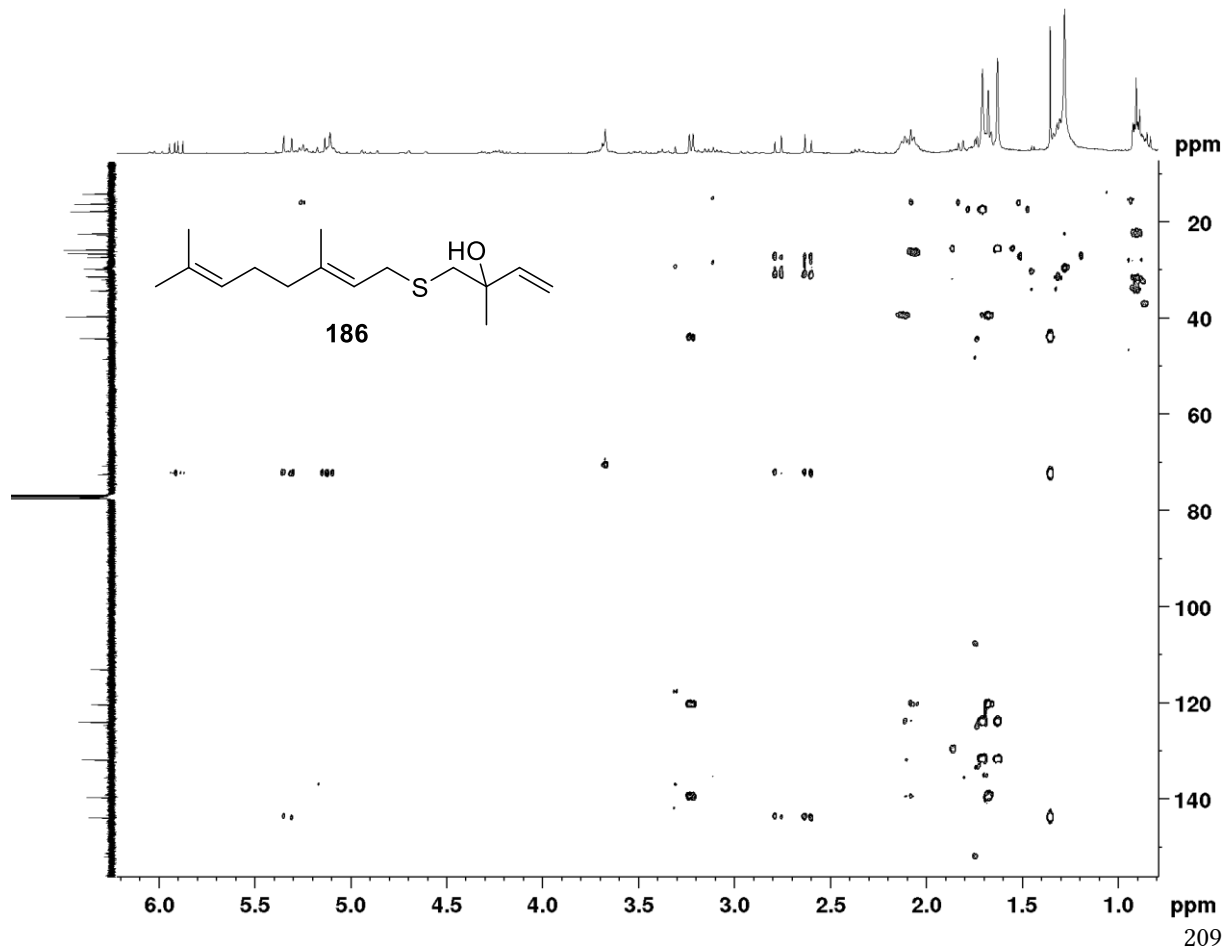


¹H-NMR-Spektrum¹³C-NMR-Spektrum

HSQC



HMBC



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Kirschning für die interessante Themenstellung dieser außergewöhnlich biologisch und chemoenzymatisch geprägten Arbeit, für die gute Unterstützung sowie für die Freiheit dieses Projekt mit eigenen Ideen zu formen und zu gestalten.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Sascha Beutel für die freundliche Übernahme des Korreferats sowie die vielen fachlichen Anregungen und Diskussionen während der letzten Jahre.

Prof. Dr. Thomas Brüser möchte ich danken, dass er sich bereit erklärt hat als Drittprüfer und Vorsitzender der Prüfungskommission für diese Arbeit zu fungieren.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Labor- und Bürokollegen Dr. Katja Seidel, Dr. Benjamin Schröder, Friederike Schäkel, Peijun Li, Anja Heutling und Emil Eppendorf für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei auch Dr. Katja Seidel und Dr. Benjamin Schröder für die Synthese verschiedener Testsubstrate, die Bereitschaft zur Diskussion über Enzyme und Biotransformationen sowie die Unterstützung mit vielen Tipps und Tricks zur chemischen Synthese.

Insbesondere danke ich auch Dr. Katja Seidel, Dr. Caroline Schneider-Barthold, Vanessa Harms, Friederike Schäkel, Janina Meyer, Dr. Matthew Norris und Carsten Schott für die schnelle und hilfreiche Korrektur dieser Arbeit.

Allgemeiner Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Kirschning für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre sowie für die fröhliche Zeit in den Pausen oder bei anderen gemeinsamen Aktivitäten. In diesem Zuge danke ich ebenso alle Arbeitskreisen des OCI und BMWZ für die gemeinsame Zeit. Insbesondere danke ich dabei den Mitgliedern des AK Hahn und AK Cox sowie den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie für die Unterstützung bei biologischen Fragestellungen, den fachlichen Austausch und die gemeinsame Zeit auf Konferenzen und Kongressen.

Dr. Gerald Dräger, Roswitha Reichel, Anne Schulz und auch Vanessa Harms danke ich für die Messung synthetischer Verbindungen bzw. die fachliche Unterstützung bei der Terpenanalytik. Außerdem danke ich Sven Winkler von symrise für die Bereitstellung der Messinstrumente und die Hilfe bei den GC-Olfaktometrie-Messungen. Des Weiteren möchte ich mich bei Jörg Fohrer, Dagmar Körtje und Monika Rettstadt für die freundliche und kompetente Unterstützung bei NMR-Messungen und NMR-Auswertungen bedanken. Allen weiteren technischen Mitarbeitern, insbesondere Katja Körner, danke ich für die umfassende Hilfe und Unterstützung bei Bestellungen und Reparaturen sowie dem Ansetzen und Autoklavieren von Medien, ohne die diese Arbeit nicht so reibungslos verlaufen wäre.

Mein aufrichtiger Dank gilt den Sekretariaten des OCI und des BMWZ. Insbesondere Ines-Britta Roloff danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie für die gute Atmosphäre der letzten Jahre.

Meiner Bachelorstudentin Elisa Ospanow danke ich für die tatkräftige Hilfe bei der Optimierung von Biotransformationen und die vielen leckeren Kuchen und Muffins. Außerdem bedanke ich mich bei allen Studenten, die im Rahmen ihrer Praktika an den Synthesen der FPP-Derivate mitgewirkt haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jeroen Dickschat der Universität Bonn für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Testsubstraten bedanken.

Zu aller letzt möchte ich mich bei meiner Familie für die ausnahmslose Unterstützung während meines Studiums und während der Promotion bedanken. Mein größter Dank gilt meinem Mann Yannik, der mir immer verständnisvoll zur Seite stand, mich in schwierigen Lebenslagen gestützt und motiviert hat und mich zum Glück auch mal von der Arbeit abgelenkt hat.

Für die Zukunft wünsche ich meinen Projektnachfolgern Vanessa Harms und Duc Tran weiterhin viel Erfolg bei diesem spannenden Projekt!

Lebenslauf

Name: Clara M. Oberhauser

Geburtsdatum, -ort: 23.05.1990, Seesen

Akademischer Werdegang:

- 12/2014 – 10/2018 **Promotion**, Leibniz Universität Hannover, Deutschland, Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. A. Kirschning
Titel: „Biotransformationen von Farnesylpyrophosphat-Analoga durch Sesquiterpencyclasen“
- 10/2012 – 11/2014 **Masterstudium Life Science**, Leibniz Universität Hannover, Deutschland,
Masterarbeit: Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. A. Kirschning, **Titel:** „Studien zur vermuteten Azidreduktaseaktivität in *A. pretiosum*“
- 09/2013 – 12/2013 **Forschungsaufenthalt**, Göteborgs Universitet, Schweden, Arbeitskreis Prof. Dr. T. Nyström (PROMOS Stipendium)
- 09/2009 – 10/2012 **Bachelorstudium Life Science**, Leibniz Universität Hannover (Niedersachsenstipendium)

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. Dickschat, und A. Kirschning. Exploiting the synthetic potential of sesquiterpene cyclases for generating unnatural terpenoids, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 11802, 57, 11802.

C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. Dickschat, und A. Kirschning. Erweiterung des synthetischen Potenzials von Sesquiterpencyclasen zur Erzeugung von nichtnatürlichen Terpenoiden, *Angew. Chem.* **2018**, 130, 11976.

Präsentationen

“Novel macrocycles through biotransformation with terpene cyclases”, 4th Multistep Enzyme Catalyzed Processes Congress, Trondheim, Norwegen, **2018**

Poster

“*In vitro* studies on sesquiterpene cyclases with modified substrates”, 8th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Deutschland, **2016**

“Biotransformation of unnatural substrates by sesquiterpene cyclases”, 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Budapest, Ungarn, **2017**