

**Charakterisierung von Sesquiterpenen  
und der  
an deren Biosynthesen beteiligten Gene  
des Myxobakteriums  
*Sorangium Cellulosum* So ce56**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen-Fakultät  
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Alexander Schiffrin**

Saarbrücken  
im Januar 2017

Tag des Kolloquiums: 06. Juli 2017

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt  
Prof. Dr. Andreas Speicher  
Prof. Dr. Stefan Schulz

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Sonja Kessler

## Danksagungen

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Rita Bernhardt für die Bereitstellung der Arbeitsthematik, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die tollen Arbeitsmöglichkeiten und die großen Freiheiten im Umgang mit dem Forschungsgebiet.

Ebenfalls sehr dankbar bin ich Dr. Frank Hannemann für die stets offene Bürotür und Diskussionsbereitschaft.

Meinen Gutachtern danke ich für die Zeit und die hilfreichen Kommentare und Fragen.

Herzlich danken möchte ich auch unseren Kooperationspartnern: Prof. Dr. Rolf Müller für die Volatilenextrakte von So ce56, Prof. Dr. Stefan Schulz für die GC/MS-Messungen der Volatilenextrakte und die wertvollen Diskussionen, Prof. Dr. Dietrich Volmer und Rainer Wintringer für den Zugang zur GC/MS und das Teilen des unbezahlbaren Know-How im Umgang mit den Analyseinstrumenten, Dr. Josef Zapp für die NMR-Messungen und die Geduld bei den gemeinsamen Datenauswertungen, Dr. Volker Huch für die Röntgenstrukturanalysen, Prof. Dr. Andreas Speicher und Dr. Maël Charpentier für die Bereitstellung des Polarimeters und die Hilfe bei den Drehwertbestimmungen, Prof. Dr. Norihiko Misawa für den pAC-Mv-Vektor, Prof. Dr. Danièle Werck, Mane & Fils SA und Bell Flavours & Fragrances GmbH für die Riechstoffe.

Meinen Mitstreitern im Myxoprojekt Dr. Yogan Khatri, Dr. Michael Ringle und Dr. Kerstin Ewen danke ich insbesondere für die Einführung ins Voodoo und die Magie der Biochemie, die stets spannenden Diskussionen und ihre immerwährende Begeisterung. Es war mir eine große Ehre, von Euch zu lernen.

Dr. Gerardine Pereira danke ich für die Bereitschaft, das „broken English“ der Publikationen aufzupolieren. Meiner Schwester Dr. Hanna Berger und Dr. Simon Janocha danke ich für die wertvollen Kommentare und Vorschläge bei der Formulierung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern und Kollegen am Institut für Biochemie und der Universität des Saarlandes möchte ich für die unvergessliche gemeinsame Zeit danken. Herzlichen Dank für die vielen Fachgespräche und Diskussionen, die Tage, Nächte und Wochenenden samt Musiksessions im Labor, das Stellen und Beantworten von „dummen Fragen“ (I have two questions), das Teilen von Zigaretten, Kaffee und Tee auf dem Balkon, das Kochen und Grillen, die verlängerten Mittagspausen im Mensacafé und Eure stetige Hilfsbereitschaft. Besonders dankbar bin jedoch für all das, was man mit Worten nicht ausdrücken kann, so dass es mir jeden Tag Spaß gemacht hat, zur Uni zu kommen, um mit Euch gemeinsam im Labor und Büro zu arbeiten. Die meisten von Euch sind auch Freunde geworden. Leider seid Ihr zu viele, um Euch alle namentlich zu nennen und den Rahmen nicht zu sprengen. Ich hoffe, Ihr nehmt es mir nicht übel.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die Liebe, Geduld, Motivation, Neugier, Unterstützung und das ständige Nachfragen über die gesamte Zeit dieser Arbeit und darüber hinaus. Ganz besonders meinen Eltern Ida und Boris.

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2011 bis Oktober 2015 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Dieser Arbeit liegen die drei folgenden wissenschaftlichen Publikationen zugrunde:

1. „Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation”

A. Schifrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt, *ChemBioChem*, 2015, 16, 337-344.

erscheint vollständig reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Wiley VCH Verlages.

Alexander Schifrin trug zum experimentellen Design bei, konstruierte die Plasmide, exprimierte die Proteine und führte die *in vitro*- und *in vivo*-Umsätze durch. Er interpretierte die experimentellen Daten und schrieb das Manuskript.

2. „Novel Sesquiterpene Oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56”

A. Schifrin, M. Litzenburger, M. Ringle, R. Bernhardt, *ChemBioChem*, 2015, 16, 337-344.

erscheint vollständig reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Wiley VCH Verlages.

Alexander Schifrin plante das experimentelle Design, führte die Umsätze mit CYP264B1 durch, interpretierte alle experimentellen Daten und schrieb das Manuskript.

3. „A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in *Sorangium cellulosum* So ce56”

A. Schifrin, Y. Khatri, P. Kirsch, V. Thiel, S. Schulz, R. Bernhardt, *Org Biomol Chem.*, 2016, 14, 3385-3393

erscheint vollständig reproduziert mit freundlicher Genehmigung des RSC Publishing Verlages.

Alexander Schifrin plante das experimentelle Design, führte die enzymatischen Umsätze durch, interpretierte die Daten und schrieb das Manuskript.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                          | <u>Seite</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Abkürzungsverzeichnis                                                                                                    | VIII         |
| Summary                                                                                                                  | XI           |
| Zusammenfassung                                                                                                          | XII          |
| <br>                                                                                                                     |              |
| <b>1. Einleitung</b>                                                                                                     | <b>1</b>     |
| 1.1 Myxobakterien                                                                                                        | 1            |
| 1.1.1 Myxobakterien sind Produzenten bioaktiver Naturstoffe                                                              | 2            |
| 1.1.2 Der Stamm <i>Sorangium cellulosum</i> dient als Modellorganismus<br>für Myxobakterien                              | 3            |
| 1.2 Terpene und Terpenoide                                                                                               | 4            |
| 1.2.1 Die Biosynthese von Terpenen verläuft über universelle Stoffwechselwege                                            | 5            |
| 1.2.2 Volatile Terpene dienen als Riechstoffe in der Parfümerie                                                          | 7            |
| 1.2.3 Auch Bakterien sind eine Quelle von terpenoiden Riechstoffen                                                       | 12           |
| 1.2.4 Die Analytik von Terpenen ist eine Herausforderung                                                                 | 13           |
| 1.3 Terpensynthesen                                                                                                      | 15           |
| 1.4 Cytochrome P450                                                                                                      | 18           |
| 1.4.1 Cytochrome P450 katalysieren den Einbau von molekularem Sauerstoff<br>in C-H-Bindungen                             | 19           |
| 1.4.2 Cytochrome P450 spielen eine wichtige Rolle in der Terpenbiosynthese                                               | 20           |
| 1.4.3 Die Cytochrome P450 aus <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56 oxidieren<br>eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate | 21           |
| <br>                                                                                                                     |              |
| <b>2. Vorarbeiten und Zielsetzung</b>                                                                                    | <b>26</b>    |

### **3. Wissenschaftliche Publikationen** **28**

- 3.1 „Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation”  
A. Schiffrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt, *ChemBioChem*, 2015, 16, 337-344. 28
- 3.2 „New Sesquiterpene Oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56”  
A. Schiffrin, M. Litzenburger, M. Ringle, R. Bernhardt, *ChemBioChem*, 2015, 16, 337-344. 37
- 3.3 „A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in *Sorangium cellulosum* So ce56”  
A. Schiffrin, Y. Khatri, P. Kirsch, V. Thiel, S. Schulz, R. Bernhardt, *Org Biomol Chem.*, 2016, 14, 3385-3393 47

### **4. Weitere Ergebnisse** **57**

- 4.1 Umsätze von Sesquiterpenen mit CYP264B1 57
- 4.2 Olfaktorische Analyse neuer Sesquiterpene 58
- 4.3 Umsätze von (+)-Eremophilen mit Cytochromen P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 60
- 4.4 Docking: Computergestützte Modellierung von CYP264B1-Sesquiterpen-Komplexen 61

### **5. Diskussion** **64**

- 5.1 *Sorangium cellulosum* So ce56 synthetisiert selektiv und unselektiv neue einzigartige Sesquiterpene 64
- 5.2 Docking-Studien und Produktstrukturen liefern Einblick in den Mechanismus der Sesquiterpenoxidationen durch CYP264B1 67
- 5.3 Neue Sesquiterpene aus *Sorangium cellulosum* und durch CYP264B1 oxidierte Terpenderivate sind zumeist geruchlos 68

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| <b>6. Schlussfolgerungen und Ausblick</b> | <b>75</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>            | <b>79</b> |
| <b>8. Anhang</b>                          | <b>88</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                      |                                                                                 |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| A <sub>max</sub>     | Maximaler Absorptionsunterschied [maximum absorbance difference]                |
| AdR                  | Adrenodoxinreduktase                                                            |
| Adx                  | Adrenodoxin                                                                     |
| Adx <sub>4-108</sub> | verkürzte Form von Adrenodoxin                                                  |
| bp                   | Basenpaare [base pairs]                                                         |
| °C                   | Grad Celsius                                                                    |
| cm                   | Centimeter                                                                      |
| Da                   | Dalton                                                                          |
| DC                   | Dünnschichtchromatographie                                                      |
| DMAPP                | Dimethylallylpyrophosphat oder Dimethylallyldiphosphat                          |
| DMSO                 | Dimethylsulfoxid                                                                |
| DNA                  | Desoxyribonukleinsäure [deoxyribonucleic acid]                                  |
| FdR                  | Ferredoxinreduktase                                                             |
| FID                  | Flammenionisationsdetektor                                                      |
| FPP                  | Farnesylpyrophosphat oder Farnesyldiphosphat                                    |
| Fpr                  | Ferredoxin-/Flavodoxinreduktase aus <i>Escherichia coli</i>                     |
| g                    | Gramm                                                                           |
| h                    | Stunde                                                                          |
| GC                   | Gaschromatographie                                                              |
| GC/MS                | Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometriedetektor                    |
| GC/O                 | Gaschromatographie gekoppelt mit Olfaktometriedetektor                          |
| GGPP                 | Geranylgeranylpyrophosphat oder Geranylgeranyldiphosphat                        |
| GPP                  | Geranylpyrophosphat oder Geranyldiphosphat                                      |
| HPLC                 | Hochleistungsflüssigchromatographie<br>[high performance liquid chromatography] |
| Hz                   | Hertz                                                                           |
| IPP                  | Isopentenylpyrophosphat oder Isopentenyldiphosphat                              |
| IPTG                 | Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid                                              |
| <i>J</i>             | Kopplungskonstante                                                              |
| K <sub>d</sub>       | Dissoziationskonstante [dissociation constant]                                  |
| l                    | Liter                                                                           |
| LC                   | Flüssigchromatographie [liquid chromatography]                                  |
| LC/MS                | Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometriedetektor                |
| M                    | Molar; mol pro Liter                                                            |

|        |                                                      |
|--------|------------------------------------------------------|
| Mbp    | Megabasenpaare; 1000 Basenpaare [1000 base pairs]    |
| 2-MIB  | 2-Methylisoborneol                                   |
| min    | Minute                                               |
| MS     | Massenspektrometrie                                  |
| MTBE   | Methyl-tert-butylether                               |
| NADH   | Nikotinamidadenindinukleotid                         |
| NADPH  | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat                 |
| NMR    | Kernspinresonanz [nuclear magnetic resonance]        |
| P450   | Cytochrom P450                                       |
| PAGE   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                      |
| PCR    | Polymerasekettenreaktion [polymerase chain reaction] |
| ppm    | parts per million                                    |
| rpm    | Umdrehungen pro Minute [rotations per minute]        |
| s      | Sekunde                                              |
| SDS    | Natriumdodecylsulfat [sodium dodecyl sulfate]        |
| SdS    | Selinadiensynthase                                   |
| ST     | Sesquiterpen                                         |
| T      | Temperatur                                           |
| Tris   | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                      |
| TS     | Terpensynthase                                       |
| ÜHP    | Überhydroxylierungsprodukt                           |
| UV/Vis | Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich     |

### **Abkürzungen für Aminosäuren**

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

### **Abkürzungen für die DNA-Basen**

|   |         |
|---|---------|
| A | Adenin  |
| C | Cytosin |
| G | Guanin  |
| T | Thymin  |

## Summary

This work treats the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 as a producer of volatile terpenes. The structures of new terpenes were revealed using NMR, x-ray diffractometry, polarimetry, and GC/MS. Additionally, the corresponding terpene synthases (TSs) were characterized. Three out of four TSs play their roles in the biosynthesis of volatile terpenes. Among them there is a classic Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol-/Geosminsynthase (sce1440) and a promiscuous 10-*epi*-Cubebolsynthase (sce6369), which also synthesizes (–)- $\delta$ -cadinene and the majority of the 17 terpenes in *S. cellulosum* So ce56. The third TS (sce8552) is clustered with the Cytochrome P450 CYP264B1 (sce8551) in the strain's genome. The TS converts the sesquiterpene precursor farnesyl pyrophosphate to the enantiomer (+)-eremophilene, which is oxidized by CYP264B1.

Besides its natural function, CYP264B1 hydroxylates selectively odorant eremophilane-, caryophyllane-, humulane-, and cedrane-type sesquiterpenes in allylic positions. Therefore, CYP264B1 is a valuable tool for hydrocarbon derivatization.

(–)- $\delta$ -Cadinene and (+)-eremophilene are odorless. The hydroxylations introduced by CYP264B1 mostly erase the sesquiterpene's odor. Pairs of structurally close substances with different odor qualities could gain high importance for the characterization of human olfactory receptors. In addition, further oxidations of the hydroxyl groups could lead to interesting odorant molecules.

## Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* So ce56 als Produzent volatiler Terpene. Die Strukturen der neuen Terpene wurden per NMR, Röntgenbeugung, Polarimetrie und GC/MS aufgeklärt und die zugehörigen Terpensynthasen (TSn) wurden charakterisiert. Drei der vier im Genom identifizierten TSn sind an der Biosynthese volatiler Terpene beteiligt: Darunter befinden sich eine klassische Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol-/Geosminsynthase (sce1440) und eine unselektive 10-*epi*-Cubebolsynthase (sce6369), die auch (–)- $\delta$ -Cadinen und die meisten der 17 Terpene in *S. cellulosum* So ce56 synthetisiert. Die dritte TS (sce8552) liegt im bakteriellen Genom mit dem Cytochrom P450 CYP264B1 (sce8551) geclustert vor. Die TS setzt Farnesylpyrophosphat selektiv zu (+)-Eremophilen um, das von CYP264B1 oxidiert wird.

Neben seiner natürlichen Funktion kann CYP264B1 riechende Eremophilan-, Caryophyllan-, Humulan- und Cedran-Sesquiterpene selektiv allylisch hydroxylieren. Damit ist CYP264B1 ein wertvolles Werkzeug zur Derivatisierung von Kohlenwasserstoffen.

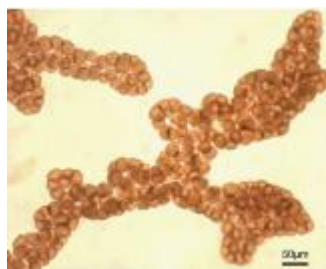
(–)- $\delta$ -Cadinen und (+)-Eremophilen sind geruchlos. Durch CYP264B1 eingebrachte Hydroxylierungen löschen den Geruch der Sesquiterpene zumeist aus. Paare von strukturell ähnlichen, aber unterschiedlich riechenden Substanzen könnten bei der Charakterisierung von humanen Geruchsrezeptoren von hoher Bedeutung werden. Zudem könnte weitere Oxidation der Hydroxylgruppen zu interessanten Riechstoffen führen.

# 1. Einleitung

Terpene, die größte Gruppe von Naturstoffen, finden vielfältige Anwendungen als Pharmazeutika. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die Epothilone als Anti-Krebs-Wirkstoffe und Artemisinin, ein wirksames Mittel gegen Malaria (Wani et al. 1971; Tu 2011). Volatile pflanzliche Terpene wie die Enantiomere des Limonens werden als Hauptbestandteile von ätherischen Ölen traditionell als Duft- und Aromastoffe verwendet (Breitmaier 2008). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifizierung, Strukturaufklärung und Biosynthese von Terpenen des myxobakteriellen Stamms *Sorangium cellulosum* So ce56. Dazu werden zunächst Myxobakterien (Kap. 1.1) als Produzenten bioaktiver Naturstoffe (Kap. 1.1.1) vorgestellt, bevor der Fokus auf Terpene (Kap. 1.2) und die an ihrer Biosynthese beteiligten Enzyme der Klassen der Terpensynthasen (Kap. 1.3) und Cytochrome P450 (Kap. 1.4) fällt.

## 1.1 Myxobakterien

Myxobakterien sind gramnegative Bakterien, die weltweit in allen Klimazonen einschließlich der Arktis und Antarktis vorkommen. Sie ernähren sich zumeist von toter organischer Materie sowie Mikroorganismen und wachsen ausschließlich aerob, zumeist auf Böden, Dung, abgestorbenen Pflanzen und Baumrinden. Ihre Bezeichnung geht auf die Fähigkeit zurück, Schleim zu bilden, der ihnen erleichtert, sich auf festem Untergrund fortzubewegen. Nach ihrer Hauptnährstoffquelle lassen sich Myxobakterien in zwei Hauptklassen einteilen: Die Bakteriolyten sekretieren Proteine, die Makromoleküle, Zellorganellen und ganze Zellen abbauen können, und lassen sich in Pepton-basierten Medien kultivieren. Die Zellulose-abbauenden Stämme hingegen wachsen in Medien mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Bei eintretendem Nährstoffmangel können sich einzelne Zellen zusammenfinden und Fruchtkörper bilden (Abb. 1), so dass das Überleben des Stammes unter Stress gesichert ist. Damit weisen Myxobakterien, obwohl selbst Einzeller, Merkmale von mehrzelligen Organismen auf (Peterson 1969; Reichenbach and Höfle 1993; Reichenbach 1999). Vorkommen in Nordamerika wurden bereits in den 90er Jahren des 18. Jahrhunderts von Thaxter beschrieben und in der Folge aus verschiedenen weiteren Regionen der Welt berichtet (Thaxter 1892; Peterson 1969).



**Abbildung 1:** Fruchtkörper von *Sorangium cellulosum* So ce56 aus (Gerth et al. 2003).

### **1.1.1 Myxobakterien sind Produzenten bioaktiver Naturstoffe**

Myxobakterien können Biopolymere wie Zellulose und Proteine zersetzen, besitzen einen komplexen Stoffwechsel und stellen zahlreiche strukturell einzigartige Sekundärmetabolite her, die aufgrund ihrer starken antibiotischen, zytostatischen und antiviralen Eigenschaften als hochwirksame Pharmazeutika von großem wissenschaftlichen Interesse sind (Reichenbach and Höfle 1993; Gerth et al. 2003; Wenzel and Müller 2007; Schaberle et al. 2014). Studien beginnend in den 1940er Jahren zeigten, dass myxobakterielle Extrakte antibiotisch gegen gram-positive Bakterien wirken, jedoch noch ohne die Strukturen der Wirkstoffe zu kennen (Oxford 1947; Kato 1955; Norén and Raper 1962). Die Etablierung der Kultivierung von Myxobakterien in Flüssigmedium in den 1970er Jahren ermöglichte Arbeiten zur Extraktion und Charakterisierung von myxobakteriellen Naturstoffen, so dass 1977 das erste myxobakterielle Antibiotikum strukturell aufgeklärt werden konnte (Connor et al. 1977; Ringel et al. 1977; Reichenbach and Höfle 1993). Seit 1975 wurde unter der Leitung von Hans Reichenbach in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF, 2006 umbenannt in Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, HZI, Braunschweig) das Programm zur Isolierung und zum gezielten Screening von Myxobakterien nach biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aufgenommen. Seit 2003 wird diese Forschung unter der Leitung von Rolf Müller auch an der Universität des Saarlandes und seit 2009 am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) fortgeführt (Reichenbach and Höfle 1993; Reichenbach 1999; Krug and Müller 2014; Täubner 2014). Insbesondere Molekülklassen der Polyketide, nichtribosomalen Peptide, gemischte Polyketide-Nichtribosomale Peptide und Terpene sind dabei in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt (Dickschat et al. 2004; Dickschat et al. 2005; Wenzel and Müller 2007; Wenzel and Müller 2009; Wenzel and Müller 2009; Wenzel and Müller 2009). Zahlreiche bioaktive Naturstoffe wurden bereits aus Myxobakterien isoliert. Darunter befinden sich die vielseitig antitumoral wirkenden Epothilone (Goodin et al. 2004), die die Proliferation von Leukämiezellen und Metastase-hemmenden Myxocheline (Miyanaga et al. 2009; Schieferdecker et al. 2015), die Chivosazol-Zytostatika (Diestel et al. 2009), die Actinstabilisatoren Chondramide (Waldmann et al. 2008), Antibiotika wie Cystobactamide, Myxopyronine, Thuggacine und Griselimycine (Steinmetz et al. 2007; Baumann et al. 2014; Franke et al. 2015; Kling et al. 2015; Sucipto et al. 2015), die antiviral (Hepatitis C) wirkenden Soraphen A und Miuraenamide (Ligon et al. 2002; Gerth et al. 2003; Karmann et al. 2015), und die antiparasitären Macyranone (Keller et al. 2015).

Die Gene der an der Biosynthese von Polyketiden, Nichtribosomalen Peptiden und Terpenoiden beteiligten Enzyme liegen im bakteriellen Genom oft in Clustern nebeneinander vor und lassen sich durch Sequenzvergleiche mit bereits charakterisierten Genen identifizieren. Somit können Biosynthesewege von Naturstoffen systematisch erforscht werden. Der Arbeitsablauf schließt die

Identifikation der beteiligten Gene über Sequenzvergleiche, Validierung der Gene durch knock-out Experimente, sowie homologe und heterologe Überexpression der Gene zur Herstellung der Polyketide und Nichtribosomalen Peptide ein. Die letzten Schritte bestehen in Bioaktivitätstests sowie der strukturellen Charakterisierung der gereinigten Naturstoffe (Wenzel and Müller 2007; Zhao et al. 2008).

### **1.1.2 Der Stamm *Sorangium cellulosum* dient als Modellorganismus für Myxobakterien**

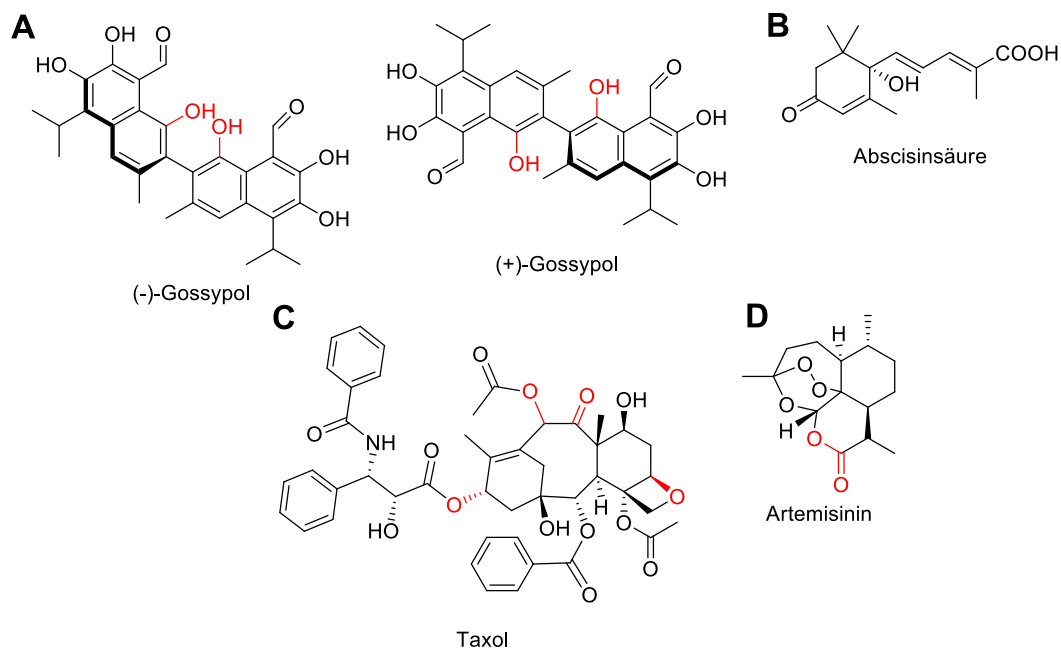
Myxobakterien haben sich – wie bereits erwähnt – seit den 1970er Jahren als potente Produzenten verschiedener bioaktiver Moleküle in der Naturstoffforschung etabliert. In Kapitel 1.1.1 sind nur einige der charakterisierten myxobakteriellen Naturstoffe erwähnt. Nahezu die Hälfte der Produzenten von Sekundärmetaboliten aus der etwa 7000 Stämme der Myxobakterien umfassenden Bank des HZI werden dem Genus der *Soranginae* zugeordnet (Gerth et al. 2003). Unter den bekanntesten Sekundärmetaboliten von *S. cellulosum* befinden sich die Epothilone, welche zu den vielseitigsten und wirkungsvollsten Chemotherapeutika gegen Krebs gehören (Gerth et al. 1996). Verschiedene Epothilon-Derivate wurden als Wirkstoffe unter anderem gegen Prostata-, Lungen-, Brust-, Darm-, Bauchspeicheldrüsen-, Hirn-, und Magentumore klinisch getestet. Neben dem ersten von der Food and Drug Administration zugelassenen Epothilon-Wirkstoff Ixabepilone (BMS-247550, Bristol-Myers-Squibb) befanden sich 2014 die Epothilone KOS1585 (Kosan Biosciences) in Phase I- sowie Patupilone (EpoB, Epo906; Novartis) und Sagopilone (EpoB-Derivat; Bayer) in Phase II-Studien (Forli 2014). Zur Erforschung der Epothilon-Biosynthese wurde im Jahr 2007 das Genom des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56, eines nahen Verwandten des Epothilonproduzenten *S. cellulosum* So ce90 (Ogura et al. 2004; Reichenbach and Höfle 2012), sequenziert (Schneiker et al. 2007). *S. cellulosum* So ce56 dient als Modellorganismus für Myxobakterien und wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Der Stamm besitzt nach gegenwärtigem Stand (Dezember 2016) eines der größten bekannten bakteriellen Genome (13,1 Mbp), das bis heute nur vom nahen Verwandten *S. cellulosum* So0157-2 (14,8 Mbp) übertroffen wird (Han et al. 2013). Durch Kooperation mit der Forschungsgruppe um Rolf Müller stand der AG Bernhardt die Genomsequenz von *S. cellulosum* So ce56 exklusiv vor ihrer Publikation zur Verfügung. Die Existenz eines Epothilonsynthetisierenden Genclusters konnte im Genom zwar nicht festgestellt werden, jedoch wurde mit CYP167A1 (EpoK), ein aus der Familie der Cytochrome P450 (P450s; Kap. 1.5) stammendes Enzym identifiziert, das die Epoxidierung von Epothilon C/D zu Epothilon A/B katalysiert (Ogura et al. 2004; Kern et al. 2015). Das Forschungsinteresse an Terpenen aus *S. cellulosum* So ce56 ergab sich aus der Identifizierung eines Genclusters aus dem P450 CYP264B1 (sce8551)

und einer putativ als Geosminsynthase (geoA) annotierten Terpensynthase (TS; sce8552; Kap. 1.3) (Khatri 2009). Aus diesem Grund werden im Folgenden die Substanzklasse der Terpene (Kap. 1.2) und ihre Biosynthese (Kap. 1.2.1) näher beschrieben.

## 1.2 Terpene und Terpenoide

Terpenoide bilden die größte Gruppe von Naturstoffen mit über 50000 bekannten Vertretern (Pateraki et al. 2015). In der Literatur werden die Begriffe „Terpen“ und „Terpenoid“ meist synonym verwendet, dies wird im weiteren Verlauf des Textes – wenn nicht näher beschrieben – beibehalten. Eine detaillierte Definition beider Begriffe findet sich in Kapitel 1.2.1. Historisch wurden die ersten Terpene aus Baumharzen gewonnen und ihr Name wird von dem auch als Terpentin bezeichneten Gemisch von Baumharzen abgeleitet (Breitmaier 2008). Terpene haben vielfältige Funktionen. Pflanzen nutzen Terpene als Mittel zur chemischen Kommunikation. Insbesondere werden durch Terpene zur Reproduktion dienende bestäubende Insekten angezogen und Schädlinge (Pilze, Insekten) abgestoßen. Weniger flüchtige, toxische Terpene wie (–)- und (+)-Gossypol (Schema 1A) dienen ebenfalls als Schutz vor Schädlingen und Fraßfeinden (Gershenzon and Dudareva 2007; Tholl 2015) sowie vor abiotischen Stressfaktoren wie extremen Temperaturen, Licht, Trockenheit und Oxidation (Vickers et al. 2009). Terpen-Phytohormone wie Abscisinsäure (Schema 1B) funktionieren als Signalvermittler (Melan et al. 1993; Clavijo McCormick et al. 2014). Menschen haben die in Pflanzenextrakten enthaltenen, angenehm riechenden volatilen Terpene als Duft- und Geschmacksstoffe für sich entdeckt (Kap. 1.2.2). Menthol aus dem namensgebenden Minzöl ist durch seinen hautkühlenden Effekt als Zusatz für Tabak, Mundpflegeprodukte und Kosmetika weit verbreitet (Sell 2006). Limonen, ursprünglich aus Schalen von Zitrusfrüchten gewonnen, wird häufig als Parfüm in Seifen, Ölen, Wasch- und Spülmitteln zugesetzt (Breitmaier 2006; Breitmaier 2008; Ohloff et al. 2011). Vielfältig derivatisierte Terpene haben häufig starke biologische Aktivitäten. Zu den bekanntesten Vertretern zählen der Anti-Tumor-Wirkstoff Taxol (Paclitaxel, Schema 1C) (Wani et al. 1971) und der Anti-Malaria-Wirkstoff Artemisinin (Schema 1D) (Tu 2011), dessen Entdeckerin Youyou Tu im Jahr 2015 mit dem Nobelpreis geehrt wurde (Davey 2015). Obwohl die meisten Terpene aus historischen Gründen aus Pflanzen isoliert wurden, kommen sie in vielfältigen Spezies einschließlich Insekten, Pilzen und marinen Organismen vor (Gershenzon and Dudareva 2007). Trotz der großen strukturellen Vielfalt werden alle Terpene über dieselben zentralen Stoffwechselwege synthetisiert (Kap. 1.2.1). Terpensynthasen (TSn) und Cytochrome P450 (P450s), die zentralen Enzyme der Biosynthese, stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit und werden in den Kapiteln 1.3 und 1.4 genauer vorgestellt.



**Schema 1:** Strukturen der bioaktiven Terpenoide (A) (-)- und (+)-Gossypol, (B) Abscisinsäure, (C) Taxol, (D) Artemisinin. Funktionelle Gruppen, die durch Cytochrome P450 eingebracht werden, sind rot hervorgehoben (Luo et al. 2001; Berteau et al. 2005; Kaspera and Croteau 2006).

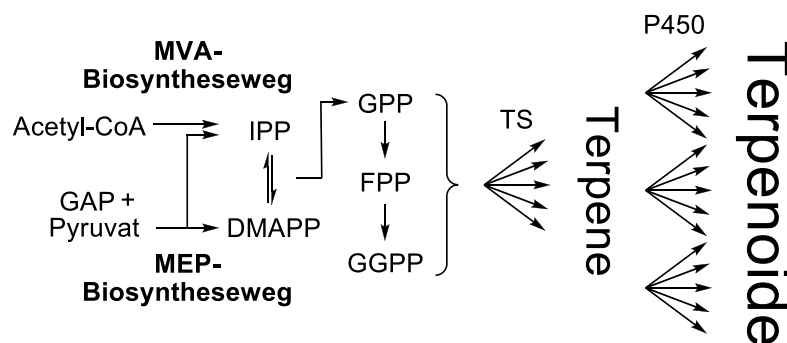
### 1.2.1 Die Biosynthese von Terpenen verläuft über universelle Stoffwechselwege

Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, werden Terpene in der gesamten Vielfalt biologischer Organismen entweder über den Mevalonat (MVA)- (Goldstein and Brown 1990) oder den Methylerythritolphosphat (MEP)-Biosyntheseweg hergestellt (Rohmer 1998). Dabei findet man den MVA-Biosyntheseweg insbesondere in Archäen und den meisten Eukaryoten einschließlich Menschen, den MEP-Biosyntheseweg in Eubakterien und Plastiden von Pflanzen. Letztere bedienen sich beider Biosynthesewege. Im Cytosol werden Sesqui- und Triterpene (Sterole) über den MVA-, in Plastiden hingegen Hemi-, Mono-, und Diterpene sowie Carotenoide (Tetraterpene) über den MEP-Biosyntheseweg hergestellt (Oldfield and Lin 2012).

In Abbildung 2 ist eine vereinfachte Übersicht über die MVA- und MEP-Biosynthesewege dargestellt. Ausgangsverbindung für den MVA-Biosyntheseweg ist Essigsäure, ein C2-Baustein, der durch Bindung an Coenzym A (Acetyl-CoA) aktiviert vorliegt. Über den MEP-Biosyntheseweg werden die beiden C3-Moleküle Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat umgesetzt. Beide Biosynthesewege führen zu den für alle Terpene gemeinsamen Vorläufermolekülen Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (Schema 2). Mehrere Einheiten IPP beziehungsweise DMAPP werden zu den linearen Diphosphaten Geranylpyrophosphat (GPP), Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) verknüpft, welche die direkten Vorläufer von Terpenen darstellen. Die linearen Pyrophosphate werden über Terpensynthase (TS)-katalysierte Reaktionen

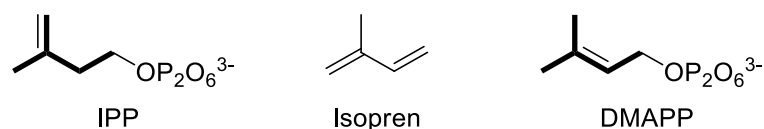
zu linearen, mono- oder multizyklischen Kohlenwasserstoffen, den Terpenen, umgesetzt (Abb. 2) (Gao et al. 2012; Oldfield and Lin 2012). Oft erreichen Terpene erst durch weitere Funktionalisierungen ihre biologisch aktive Form, so dass von den über 50000 beschriebenen Substanzen 93,5% oxidiert sind. Dabei besteht der erste Derivatisierungsschritt meist in einer Cytochrom P450 (P450)-abhängigen regio- und stereospezifischen Oxidation. Derivatisierte Terpene werden genauer als Terpenoide bezeichnet (Abb. 2) (Pateraki et al. 2015).

In heterologen Hefe- oder bakteriellen Expressionssystemen können Enzyme der Terpen-Biosynthesewege modular mit verschiedenen TSn, P450s und anderen terpenderivatisierenden Enzymen kombiniert werden, um Stämme zur Produktion von ausgewählten Terpenoiden zu konstruieren. Die Konstruktion von MVA-Syntheseweg exprimierenden Hefe- und Bakterienstämmen in den 2000er Jahren durch Forscher um Jay Keasling erlaubt heute nicht nur die kostengünstige großtechnische Biosynthese von Artemisinin (Martin et al. 2003; Ro et al. 2006; Paddon et al. 2013) sondern auch die Synthese weiterer Terpene für vielfältige Anwendungen als Treibstoffe, Parfüme, Aromen und kautschukbasierte Werkstoffe (Keasling and Chou 2008; Vickers and Sabri 2015).



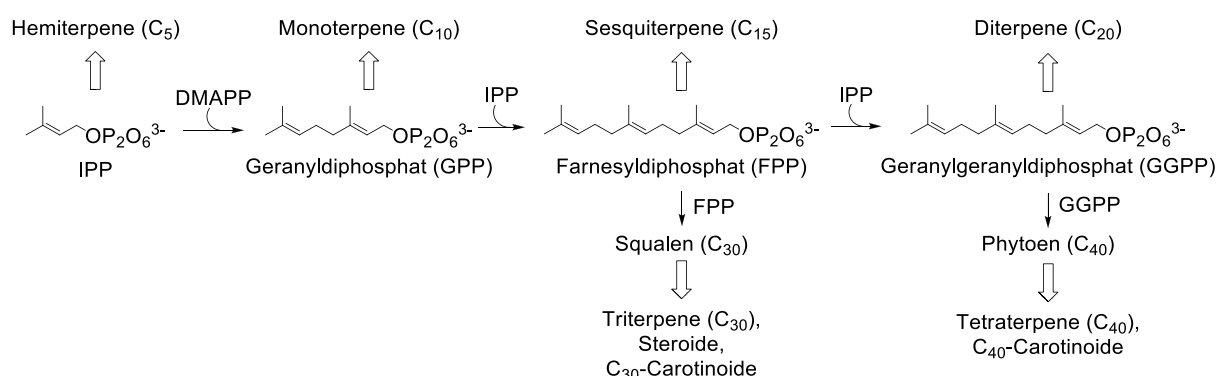
**Abbildung 2:** Übersicht über die Mevalonat (MVA)- und Methylerythritolphosphat (MEP)-Biosynthesewege aus (Schiffrin et al. 2015), angepasst und übersetzt; MVA: Mevalonat; MEP: Methylerythritolphosphat; CoA: Coenzym A; GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat; IPP: Isopentenylidiphosphat; DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat; GPP: Geranylpyrophosphat ; FPP: Farnesylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; TS: Terpensynthase; P450: Cytochrom P450.

Da die mit Isopren eng verwandten IPP und DMAPP (Schema 2) zentrale strukturelle Elemente von Terpenen darstellen, werden Terpene auch als Isoprenoide bezeichnet. Leopold Ruzicka formulierte bereits im Jahr 1922 die Möglichkeit der formalen Zerlegung molekularer Terpenoidstrukturen in Einheiten des Isoprens (C5-Kohlenwasserstoff) (Ruzicka and Stoll 1922), woraus er dann ableitend 1953 die damit verbundene allgemeine Isoprenregel postulierte (Ruzicka 1953).



**Schema 2:** Strukturelle Verwandtschaft von Isopren zu IPP und DMAPP; die Isoprengrundstruktur innerhalb von IPP und DMAPP ist fett hervorgehoben

Die am häufigsten verwendete Klassifikation der Terpene erfolgt nach der Anzahl der enthaltenen Isopreneinheiten in ihrer Struktur. So werden Terpene mit einer Isopren-Einheit (C<sub>5</sub>) als Hemiterpene bezeichnet, mit zwei Einheiten (C<sub>10</sub>) als Monoterpene und mit drei Einheiten (C<sub>15</sub>) als Sesquiterpene. Zu den größten Vertretern gehören die Tetraterpene mit acht Isopren-Einheiten (C<sub>40</sub>). Darüber hinaus werden weitere Stoffklassen wie Steroide und Carotinoide über dieselben Biosynthesewege hergestellt und sind strukturell mit den Terpenen verwandt. Steroide werden von Triterpenen, Carotinoide von Tri-/Tetraterpenen abgeleitet (Schema 3) (Breitmaier 2008).

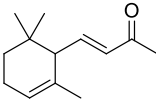
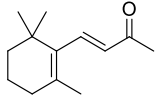
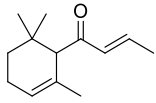
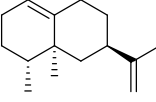
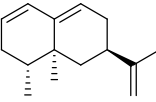
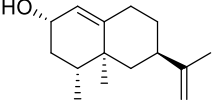
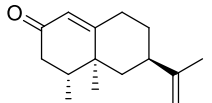


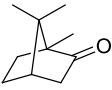
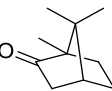
**Schema 3:** Biosynthese verschiedener Terpenklassen und der von ihnen abgeleiteten weiteren Naturstoffklassen

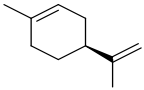
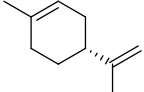
## 1.2.2 Volatile Terpene dienen als Riechstoffe in der Parfümerie

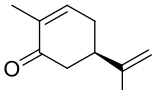
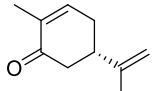
Wenig derivatisierte Hemi-, Mono-, Sesqui- und auch einige Diterpene sind leicht flüchtig. Diese volatilen Terpene sind oft wichtige Bestandteile von ätherischen Ölen und dienen in der Parfümerie als Riechstoffe (Breitmaier 2008). Die vorherrschende Theorie für Geruchssinn bezeichnet die Struktur von Molekülen als den wichtigsten Parameter für die Geruchsqualität. Obwohl kein allgemeingültiges Modell existiert, das die Struktur von Molekülen zu ihrem Geruch in Verbindung setzt (Struktur-Geruch-Beziehungen), sind Strukturklassen von Substanzen bekannt, die sich auch zu Geruchsklassen zusammenfassen lassen (Rossiter 1996). Zu den bekanntesten Beispielen dafür gehören die für ihre floralen Noten bekannten Megastigman-Norisoprenoide (Tab. 1, Einträge 1 – 4) (Ohloff and Demole 1987) und die aus Zitrusgewächsen isolierten Eremophilan-Sesquiterpene (Tab. 1, Einträge 5 – 8) (Kaspera 2004).

**Tabelle 1:** Übersicht über die Strukturen und Geruchsqualität von Iononen und Eremophilan-Sesquiterpenen. Strukturen, deren Stereochemie nicht beschrieben ist, sind als racemische Gemische zu betrachten.

| Strukturklasse             |   | Struktur                                                                                                       | Geruch*                                                          | Vorkommen                                                                                                                                                                           | Referenz                                                                                                           |
|----------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Megastigman-Norisoprenoide | 1 | $\alpha$ -Ionon<br>           | Veilchen,<br>warm,<br>holzig,<br>beerig                          | Süße Duftblüte ( <i>Osmanthus fragrans</i> )                                                                                                                                        | (Yamamoto et al. 2009; Burdock 2010)                                                                               |
|                            | 2 | $\beta$ -Ionon<br>            | Veilchen,<br>fruchtiger und<br>holziger als<br>$\alpha$ -Ionon   | Süße Duftblüte ( <i>Osmanthus fragrans</i> )<br>Damaszener Rose ( <i>Rosa damascena</i> )                                                                                           | (Ohloff and Demole 1987; Burdock 2010)                                                                             |
|                            | 3 | $\alpha$ -Damascon<br>        | Fruchtig,<br>blumig,<br>grüner Apfel                             | Tee ( <i>Camellia sinensis</i> )                                                                                                                                                    | (Renold et al. 1974; Fehr and Galindo 1991; Burdock 2010)                                                          |
| Eremophilane               | 4 | (+)-Valencen<br>              | Orange,<br>zitrusartig,<br>holzig                                | Versch. Zitrusarten,<br>Valencia-Orange ( <i>Citrus sinensis</i> ),<br>Sellerie ( <i>Apium graveolens</i> ),<br>Mango ( <i>Mangifera indica</i> ),<br>Olive ( <i>Olea europea</i> ) | (Hunter and Brogden 1965; Sharon-Asa et al. 2003; Burdock 2010; Beekwilder et al. 2014; Leonhardt and Berger 2015) |
|                            | 5 | Nootkaten<br>               | Nicht<br>dokumentiert                                            | Valencia-Orange ( <i>Citrus sinensis</i> ),<br>Nootka-Scheinzypresse ( <i>Chamaecyparis nootkatensis</i> ),<br>Vietnamesische Goldzypresse ( <i>Xanthocyparis vietnamiensis</i> )   | (Lund et al. 1970; Cankar et al. 2013; Bazzali et al. 2016)                                                        |
|                            | 6 | <i>trans</i> -Nootkatol<br> | Grapefruit,<br>süßlich,<br>weniger intensiv<br>als (+)-Nootkaton | Nootka-Scheinzypresse ( <i>Chamaecyparis nootkatensis</i> )                                                                                                                         | (Kaspera 2004; Leonhardt and Berger 2015)                                                                          |
|                            | 7 | (+)-Nootkaton<br>           | Grapefruit,<br>Fruchtig,<br>süß,<br>zitrusartig                  | Nootka-Scheinzypresse ( <i>Chamaecyparis nootkatensis</i> ),<br>Grapefruit ( <i>Citrus paradise</i> ),<br>Pomelo ( <i>Citrus grandis</i> )                                          | (Kaspera 2004; Fraatz et al. 2009; Burdock 2010)                                                                   |

|                            |   |                                                                                                    |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |
|----------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Enantiomere<br>Monoterpene | 8 | (-)-Campher<br>   | Campher | Blaufichte ( <i>Picea pungensglauca</i> ),<br>Zwergfichte ( <i>Picea mariananana</i> ),<br>Salbei ( <i>Salvia officinalis</i> ),<br>Schwarzer abendländischer Lebensbaum ( <i>Thuja occidentalis</i> ),<br>Gemeine Kiefer ( <i>Pinus sylvestris</i> ),<br>Rainfarn ( <i>Tanacetum vulgare</i> ),<br>Mutterkraut oder Falsche Kamille ( <i>Chrysanthemum parthenium</i> ),<br>Indianischer Salbeistrauch ( <i>Artemisia cana</i> ),<br>Balsamkraut ( <i>Chrysanthemum balsamita</i> ),<br>Wilde Kamille ( <i>Matricaria parthenium</i> ),<br>versch. Chrysanthemenarten ( <i>Chrysanthemum sinense</i> , <i>Chrysanthemum indicum</i> ) | (Finefield et al. 2012) |
|                            | 9 | (+)-Campher<br> | Campher | Versch. Fichtenarten ( <i>Picea mariananana</i> , <i>Picea albertianaconica</i> , <i>Picea Sitchensis</i> ),<br>Kalifornischer Beifuß ( <i>Artemisia californica</i> ),<br>Lawsons Scheinzypresse ( <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> ),<br>Gemeine Kiefer ( <i>Pinus sylvestris</i> ),<br>Salbei ( <i>Salvia officinalis</i> ),<br>San Luis Purple Sage ( <i>Salvia leucophylla</i> ),<br>versch. Chrysanthemenarten ( <i>Chrysanthemum sinense</i> , <i>Chrysanthemum indicum</i> )<br>Campherbaum ( <i>Cinnamomum camphora</i> )                                                                                                      | (Finefield et al. 2012) |

|                            |    |                                                                                                         |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |
|----------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Enantiomere<br>Monoterpene | 10 | (-)-(4S)-Limonen<br>   | Terpentin,<br>Zitrone | Pfefferminze ( <i>Mentha piperita</i> ),<br>Grüne Minze ( <i>Mentha spicata</i> )<br>Poleiminze oder Flohkraut ( <i>Mentha pulegium</i> ),<br>Schwarznessel ( <i>Perilla frutescens</i> ),<br>Riesen- oder Küstentanne ( <i>Abies grandis</i> ),<br>Dill ( <i>Anethum graveolens</i> ),<br>Laufkäfer ( <i>Semiardistomis puncticollis</i> ),<br>Braune Minze ( <i>Mentha cardiaca</i> ),<br>Salbei ( <i>Salvia officinalis</i> ),<br>Gemeine Kiefer ( <i>Pinus sylvestris</i> ),<br>Pistazie ( <i>Pistacia vera</i> ),<br>Echte Engelwurz ( <i>Angelica archangelica</i> )                                                  | (Finefield et al. 2012) |
|                            | 11 | (+)-(4R)-Limonen<br> | Orange                | Valencia-Orange ( <i>Citrus sinensis</i> ),<br>Pfefferminze ( <i>Mentha piperita</i> ),<br>Grüne Minze ( <i>Mentha spicata</i> )<br>Japanische Katzenminze ( <i>Schizonepeta tenuifolia</i> ),<br>Satsuma ( <i>Citrus Unshiu</i> ),<br>Dill ( <i>Anethum graveolens</i> ),<br>Kümmel ( <i>Carum carvi</i> ),<br>Laufkäfer ( <i>Ardistomis schaumii</i> ),<br>Braune Minze ( <i>Mentha cardiaca</i> ),<br>Salbei ( <i>Salvia officinalis</i> ),<br>Gemeine Kiefer ( <i>Pinus sylvestris</i> ),<br>Zitrone ( <i>Citrus limon</i> ),<br>Pistazie ( <i>Pistacia vera</i> ),<br>Echte Engelwurz ( <i>Angelica archangelica</i> ) | (Finefield et al. 2012) |

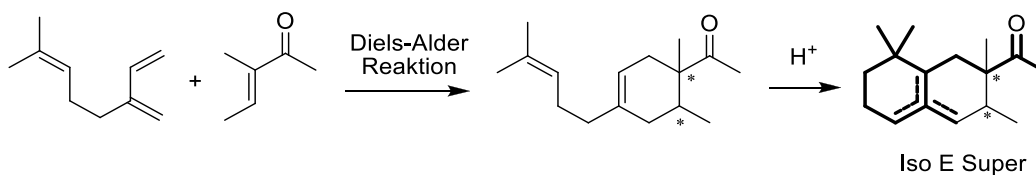
|                            |    |                                                                                                      |        |                                                                                                                                                     |                         |
|----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Enantiomere<br>Monoterpene | 12 | (-)-(4R)-Carvon<br> | Minze  | Grüne Minze ( <i>Mentha spicata</i> )<br>Braune Minze ( <i>Mentha cardiaca</i> ),<br>Frauenminze oder<br>Balsamkraut ( <i>Tanacetum balsamita</i> ) | (Finefield et al. 2012) |
|                            | 13 | (+)-(4S)-Carvon<br> | Kümmel | Dill ( <i>Anethum graveolens</i> ),<br>Kümmel ( <i>Carum carvi</i> )                                                                                | (Finefield et al. 2012) |

\* In der wissenschaftlichen Literatur existiert kein Konsens über die qualitative Beschreibung von olfaktorischen Reizen (Sell 2005). Geruchsbeschreibungen in der vorliegenden Arbeit sind nach bestem Wissen Literaturquellen entnommen worden, die sich als Referenzen auf ihrem Gebiet erwiesen haben.

\*\* Die Literaturquellen liefern keine Angaben über die olfaktorische Reinheit der Substanzen.

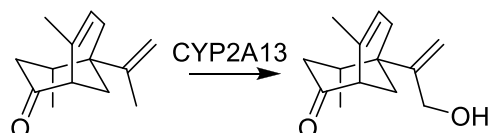
Eine im Zusammenhang mit dem Geruch einer Substanz wichtige Eigenschaft ist die absolute Stereochemie. Natürlich vorkommende Enantiomere können in ihrer reinen Form gleiche, ähnliche oder unterschiedliche Geruchseigenschaften aufweisen. Sowohl (-)-Campher als auch (+)-Campher besitzen beide den charakteristischen Camphergeruch (Tab. 1, Einträge 9, 10), während die Enantiomere von Limonen zwar beide nach Zitrusfrüchten riechen, (-)-(4S)-Limonen jedoch eher eine Zitronennote und (+)-(4R)-Limonen eine Orangennote hat (Tab. 1, Einträge 11, 12). Die reinen Enantiomere von Carvon kommen in der Natur in unterschiedlichen Spezies vor: (-)-(4R)-Carvon wurde in verschiedenen Minzarten (*Mentha spicata*, *Mentha cardiaca*, *Tanacetum balsamita*), (+)-(4S)-Carvon hingegen in Dill (*Anethum graveolens*) und Kümmel (*Carum carvi*) gefunden. Insofern ist es auch nicht verwunderlich, dass sich ihre charakteristischen Duftnoten nach Minze beziehungsweise Kümmel stark unterscheiden (Tab. 1, Einträge 13, 14) (Finefield et al. 2012).

Synthetisch chemische Strategien für die Suche nach neuen synthetischen Geruchskomponenten orientieren sich oft an den Strukturen von bekannten Geruchskomponenten (Panten et al. 2005). So kann das synthetische, unter dem Handelsnamen Iso E Super vertriebene Produktgemisch von der Struktur der Ionone abgeleitet werden (Schema 4). Iso E Super werden vielfältige Geruchseigenschaften zugeordnet und es bildet eine multifunktionale Basis für viele Parfüme (Hall and Sanders 1975).



**Schema 4:** Die Synthese von Iso E Super aus dem Monoterpen Myrcen und 3-Methyl-3-penten-2-on verläuft durch eine Diels-Alder-Reaktion gefolgt von einer säurekatalysierten Zyklisierung. Das Produkt Iso E Super ist ein Isomerengemisch, dessen Stereozentren jeweils mit einem Stern, die verschiedenen Lagen der Doppelbindung im Decalinsystem gestrichelt dargestellt sind. Das Ionon-Strukturgerüst innerhalb der Iso E Super Struktur ist fett hervorgehoben.

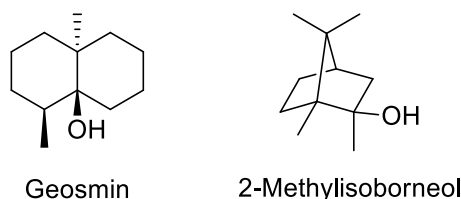
Selektive enzymatische Oxidationsreaktionen können neuartige, durch chemische Synthesen nicht erreichte, Derivate von Terpenriechstoffen zugänglich machen: Der Geruch des synthetischen sesquiterpenähnlichen Keton-Eduktes nach schwarzer Johannisbeere wird durch eine von CYP2A13 eingeführte zusätzliche OH-Funktion deutlich intensiver (Schema 5) (Schilling et al. 2010).



**Schema 5:** CYP2A13-katalysierte Hydroxylierung des synthetischen sesquiterpenähnlichen schwarze Johannisbeere-Riechstoffs, das erhaltene Produkt weist eine intensivere Johannisbeernote auf, modifiziert aus (Schilling et al. 2010).

### 1.2.3 Auch Bakterien sind eine Quelle von terpenoiden Riechstoffen

Die beiden häufigsten bakteriellen volatilen Terpene sind der Grund für den charakteristischen Geruch von Bakterien: Das nach feuchter Erde riechende Geosmin und das unangenehm modrig riechende 2-Methylisoborneol (2-MIB, Schema 6) (Dickschat et al. 2005; Dickschat et al. 2007; Brock et al. 2013). Beide Substanzen werden spieziesübergreifend von einer Vielfalt von bakteriellen Stämmen, einschließlich Myxobakterien (Trowitzsch et al. 1981), *Streptomyceten* und Cyanobakterien (Cane and Ikeda 2012; Yamada et al. 2012) synthetisiert und dienen möglicherweise als Signal zur Abstoßung: Menschen, denen mit Geosmin-produzierenden Cyanobakterien verunreinigtes Wasser angeboten wurde, lehnten es selbst bei Geosminkonzentrationen unterhalb der Wahrnehmungsgrenze ab (Dickschat et al. 2005). In der Analytik von Lebensmitteln korreliert die Detektion von Geosmin und 2-MIB mit ihrer Ungenießbarkeit und dient zur Feststellung von bakteriellen Verunreinigungen (Jeleń et al. 2003; Petersen et al. 2011). Gleichzeitig macht der einzigartige Duft des Geosmin, der auch als „Petrichor“ bezeichnet wird (Bear and Thomas 1964; Gerber and Lechevalier 1965), es als Duftkomponente für Parfüme wie „Herrmann A Mes Cotes Me Paraissait Une Ombre“ attraktiv (<https://etatlibredorange.com/shop/hermann-a-mes-cotes>).



**Schema 6:** Strukturen der häufigsten volatilen bakteriellen Terpene Geosmin und 2-Methylisoborneol (2-MIB).

Neben den beiden häufig in hohen Konzentrationen vorkommenden Substanzen Geosmin und 2-MIB produzieren Bakterien eine Vielfalt weiterer, oft strukturell einzigartiger volatiler Terpene (Dickschat 2016). Systematische Untersuchungen volatiler Extrakte von Bakterien mit Hilfe von Gaschromatographie mit Massenspektrometriedetektor (GC/MS)-Methoden erlauben die Detektion, selten jedoch die strukturelle Identifizierung, von neuen Terpenen (Schulz et al. 2004; Dickschat et al. 2005; Cane and Ikeda 2012; Yamada et al. 2015). Die Substanzen kommen häufig in geringen Konzentrationen vor und lassen sich aus dem Organismus nicht immer in ausreichenden Mengen für die Analytik zur Strukturaufklärung isolieren und reinigen. Auf Methoden und Herausforderungen der Terpensynthese und -analytik wird in Kapitel 1.2.4 genauer eingegangen.

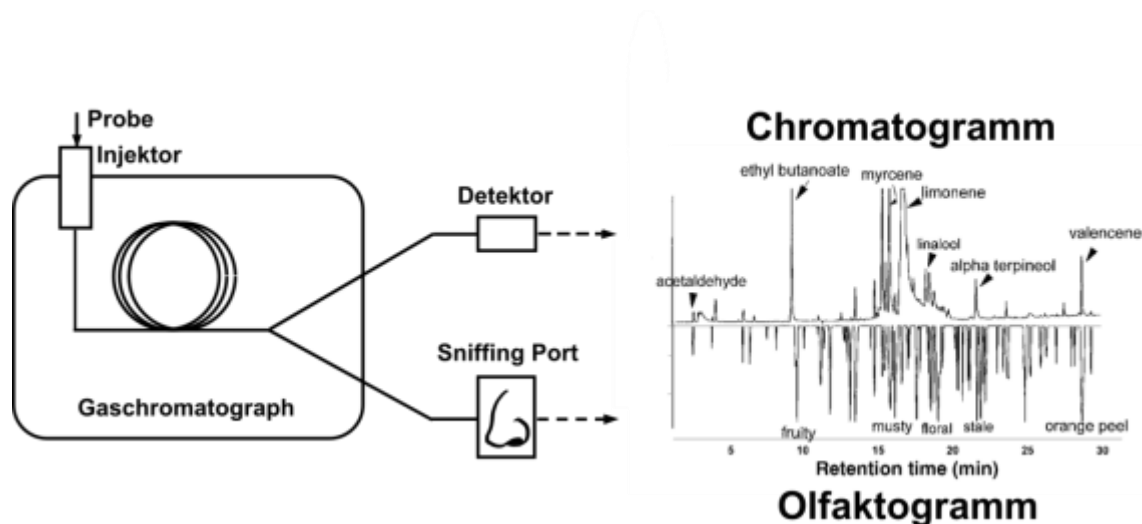
### 1.2.4 Die Analytik von Terpenen ist eine Herausforderung

Flüchtige Riechstoffe aus dem Erdboden wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Berthelot und André beschrieben (Berthelot and André 1891). Intensive Untersuchungen der Biosynthesen bakterieller Terpene begannen in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Gerber und Arigoni, beschränkten sich jedoch besonders auf Substanzen wie Geosmin und 2-Methylisoborneol (Schema 6), die von ihrem Ursprungsorganismus in großen Mengen produziert werden (Gerber and Lechevalier 1965; Gerber 1967; Arigoni 1968; Gerber 1971; Gerber 1973; Arigoni 1975). Insbesondere Cane und Mitarbeiter nutzten in den 1980er Jahren neu etablierte analytisch-chemische Methoden der Massenspektrometrie (MS) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) zur strukturellen Charakterisierung spezieller Terpene und zur Identifizierung der synthetisierenden Enzyme (Cane et al. 1981; Tillman and Cane 1983; Croteau et al. 1985; Cane and Pargellis 1987).

Volatile Extrakte der myxobakteriellen Stämme *Myxococcus xanthus*, *Chondromyces crocatus* und *Stigmatella aurantiaca* enthalten zwar einige wenige Terpenoide, jedoch war ihre Analytik bisher auf Methoden der Gaschromatographie mit Massenspektrometriedetektor (GC/MS) beschränkt (Dickschat et al. 2004; Schulz et al. 2004; Dickschat et al. 2005). GC/MS stellt zwar für die Analytik komplexer Extrakte die Methode der Wahl dar, bietet jedoch insbesondere für unbekannte Naturstoffe keinen eindeutigen strukturellen Nachweis. Trotz dieses Umstandes existiert vielfältige Fachliteratur, die den Anspruch erhebt, neue Terpene strukturell einzig mit GC/MS-Methoden zu charakterisieren (Ghalib et al. 2011). Strukturchemisch stellt für neue Naturstoffe eine komplementäre Analytik mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS; Molekülmasse), der Bestimmung des Drehwertes von polarisiertem Licht (Chiralität) und von Kernspinresonanzspektroskopie (NMR; Molekülstruktur, Konstitution) den Konsens dar. Den limitierenden Faktor für die beiden letztgenannten Analysen bildet die Substanzmenge: Auswertbare Signalintensitäten werden durch die Analyse von 1-5 mg Reinsubstanz erreicht.

In den 1990er Jahren neu aufkommende molekularbiologische Methoden wie die Genomsequenzierung sowie die Klonierung und heterologe Expression von Genen führten zur Aufklärung der Terpenbiosynthesewege und funktionalen Untersuchungen der TSn (Kap. 1.2.3 und 1.3) (Goldstein and Brown 1990; Rohmer 1998). Diese und weitere Methoden der synthetischen Biologie erlauben heute die Herstellung von Terpenen sowie der synthetisierenden Gene in größerem Maßstab und somit auch ausreichender Substanzmengen für Drehwertbestimmung und NMR (Martin et al. 2001; Martin et al. 2003; Ro et al. 2006; Chang et al. 2007; Harada and Misawa 2009; Paddon et al. 2013; Dickschat 2016). So lassen sich TS-Screenings und Strukturaufklärung von neuen terpenoiden Naturstoffen, insbesondere auch Volatilen, effizient durchführen (Yamada et al. 2012; Rabe and Dickschat 2013; Dickschat et al. 2014; Yamada et al. 2015; Dickschat 2016).

Die breite Anwendung volatiler Terpene als Riechstoffe macht die olfaktorische Evaluierung neuer Terpene notwendig. Dazu wird in der Regel GC/Olfaktometrie (GC/O) als Analysemethode verwendet. Sie bietet die Möglichkeit, die Geruchsqualität einzelner Volatilen aus einem Gemisch zu bestimmen. Technisch wird dazu eine GC im Split-Modus genutzt: Nach der chromatographischen Trennung des Gemisches wird ein Teil mit einem klassischen Detektor wie MS analysiert. Der andere Teil wird zu einer Geruchsschnittstelle (Sniffing Port) geleitet, wo er von einer Person olfaktorisch erfasst und charakterisiert wird. Die Auftragung von Geruch gegen Zeit wird analog zum Chromatogramm als Olfaktogramm bezeichnet. So kann durch diese simultane Analyse einem Peak im Chromatogramm ein Geruch zugeordnet werden (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O). Nach der gaschromatographischen Trennung werden die Analyten zwischen Detektor und Sniffing Port gesplittet. Die parallele Aufzeichnung von Chromatogramm und Olfaktogramm wurde (Bazemore et al. 1999) entnommen und modifiziert

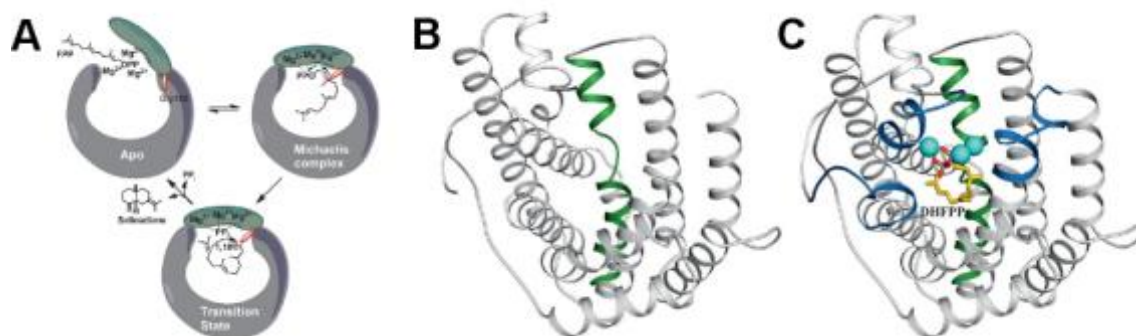
## 1.3 Terpensynthesen

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, gehören Terpensynthesen (TSn) zu den zentralen Enzymen der Terpenbiosynthese. Sie katalysieren den Umsatz der linearen Prenylpyrophosphate (IPP, GPP, GGPP) zu unverzweigten, mono- oder polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, den Terpenen oder Terpenalkoholen (Abb. 2). In einem einzigen Reaktionsschritt kann eine Vielzahl an C-C-Bindungen geknüpft und Chiralitätszentren induziert werden. TS-katalysierte Reaktionen stellen somit den komplexesten Schritt bei der Terpenbiosynthese dar und gehören zu den anspruchsvollsten biochemischen Reaktionen überhaupt (Gao et al. 2012; Oldfield and Lin 2012; Dickschat 2016). Individuelle TSn werden nach dem Namen ihres Produktes, unspezifische TSn nach dem Namen des Hauptproduktes benannt, etwa Limonensynthase oder Humulensynthase. (Steele et al. 1998; Hyatt et al. 2007)

Alle TSn binden im aktiven Zentrum einen Cluster aus drei  $Mg^{2+}$ -Kationen, an die wiederum die Pyrophosphatgruppe des Substrates koordiniert (Michaelis complex, Abb. 4A). Zwei der Ionen binden am universellen aspartatreichen Motiv DDxxD/E, während die Bindemotive des dritten  $Mg^{2+}$ -Kations sich bei Typ I-TS (NSE-/DTE-Triade: (N/D)Dxx(S/T)xxxE)) und Typ II-TS (zweites aspartatreiches Motiv DxDD) unterscheiden (Schema 7) (Gao et al. 2012; Oldfield and Lin 2012; Dickschat 2016). Im Allgemeinen wird das aktive Zentrum von TSn von sauren und aromatischen Aminosäuren ausgekleidet, die carbokationische Prenylintermediate während der Reaktion stabilisieren (Christianson 2006; Christianson 2008; Schrepfer et al. 2016). Röntgenbeugungsaufnahmen von Kristallen verschiedener TSn haben gezeigt, dass Enzyme dieser Klasse trotz geringer Sequenzähnlichkeiten eine von  $\alpha$ -Helices dominierte Tertiärstruktur besitzen (Abb. 4B und C) (Christianson 2006; Baer et al. 2014).

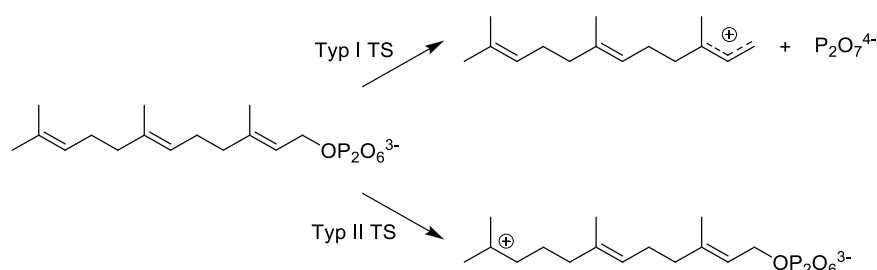
Die Kohlenwasserstoffskelette der Terpene sind, obwohl sie aus denselben Vorläufern synthetisiert werden, höchst unterschiedlich. Alleine für Sesquiterpene sind mindestens 82 Kohlenwasserstoffskelette beschrieben (Joulain and König 1998). Die Vielfalt der Terpenstrukturen ist durch den individuellen Aufbau des aktiven Zentrums der entsprechenden TS bedingt. Am Beispiel der spezifischen (+)-Aristolochensynthase aus *Aspergillus terreus* und ihrer unspezifischen Variante aus *Penicillium roqueforti* (Sequenzidentität von ca. 60%) lassen sich die strukturellen Unterschiede im aktiven Zentrum identifizieren, die zu Unterschieden in der Produktverteilung führen. Evolutionär bedingte Mutationen einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum von TSn führen zu hoher Spezifität solch komplexer Reaktionen (Christianson 2006). Zudem durchlaufen TSn im Verlauf der Reaktion große Konformationsänderungen, welche für die Struktur des hergestellten Terpens verantwortlich sind (Christianson 2008). Insbesondere die Arbeit von Baer et al. hat am Beispiel der Selinadiensynthase (SDS) durch Röntgenbeugungsaufnahmen verschiedener Konformationen des Enzyms gezeigt, dass der Mechanismus über das Induced-Fit-Modell sehr gut beschrieben werden kann. Dabei wird die

Konformationsänderung der SDS aus der „offenen“ Apo-Form (Abb. 4A, Apo) in die „geschlossene“ Holo-Form des Michaelis-Komplexes (Abb. 4A, Michaelis complex) erst nach Bindung des Substrates FPP möglich. Danach erfolgt die SDS-katalysierte Zyklisierung von FPP zu Selinadien (Abb. 4A, Übergangszustand – Transition State) (Baer et al. 2014).



**Abbildung 4:** A) Induced Fit-Modell zur Beschreibung der TS-katalysierten Reaktion am Beispiel der Selinadiensynthese (SdS) und Bändermodelldarstellung der Kristallstrukturen der SdS B) in der offenen Konformation und C) im Komplex mit dem Substratanalogon 2,3-Dihydrofarnesylpyrophosphat (DHFP). DHFP ist gelb dargestellt, Sauerstoffatome rot, Phosphor orange, und Mg<sup>2+</sup> cyan. Strukturelemente, die durch die Bindung von DHFP gebildet werden, sind in blau dargestellt, modifiziert aus (Baer et al. 2014)

Der detaillierte Mechanismus der von TSn katalysierten Umsetzung von linearen Isoprenylpyrophosphaten zu Terpenen (bzw. Terpenalkoholen) wird mit dem Michaelis-Komplex eingeleitet. Die Initiation erfolgt durch die Ionisierung des Substrats zu einer carbokationischen Spezies. Die beiden eingangs erwähnten Typen von TSn haben unterschiedliche Mechanismen der Substratierung. TSn vom Typ I führen durch die Mg<sup>2+</sup>-Kationen-induzierte Abspaltung der Pyrophosphatgruppe zum Carbokation während Typ II-TSn das Prenylpyrophosphat durch Protonierung der terminalen Doppelbindung ionisieren (Schema 7) (Gao et al. 2012). Alle bisher bekannten Sesquiterpensynthasen gehören ausnahmslos zum Typ I (Christianson 2006).

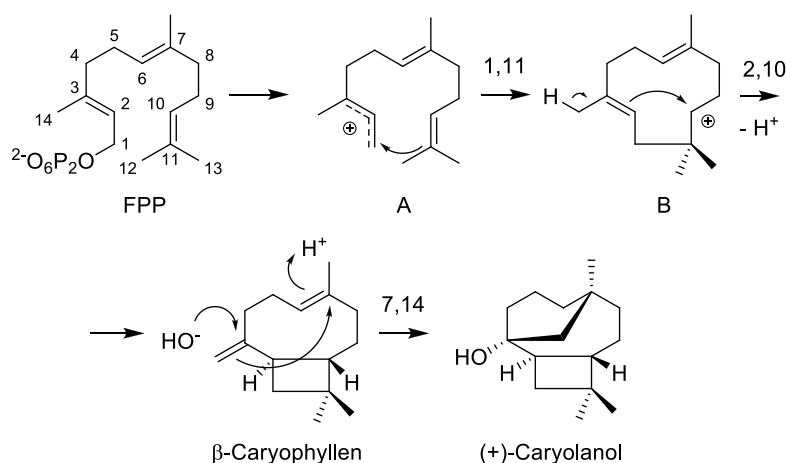


**Schema 7:** Ionisierungsreaktionen von FPP durch Typ I und Typ II-Terpensynthasen

Carbokationen reagieren über eine Sequenz von C-C-Bindungsknüpfungen (Zyklisierungen), Hydrid-Shifts und Wagner-Meerwein-Umlagerungen zum individuellen Terpen-Skelett. Reaktionen, die von unspezifischen TSn katalysiert werden und so zu verschiedenen Produkten

führen, verlaufen über gemeinsame carbokationische Intermediate (Steele et al. 1998; Christianson 2006).

Im Folgenden wird die Terpensynthese am Beispiel der (+)-Caryolanol-Synthase (Typ I; (+)- $\beta$ -Caryophyllen-Nebenprodukte) aus *Streptomyces griseus* beschrieben (Schema 8) (Nakano et al. 2011). Nach Ionisierung von FPP zum allylischen Carbokation A folgt eine 1,11-Zyklisierung zum Anti-Markovnikov-Intermediat B. Das Auftreten von Anti-Markovnikov-Intermediaten im Verlauf von TS-katalysierten Bioreaktionen wird durch ihre Stabilisierung im aktiven Zentrum über saure oder aromatische Aminosäurereste möglich (Christianson 2006). Dessen anschließende 2,10-Zyklisierung mit Protonabspaltung führt zum bizyklischen Zwischenprodukt (+)- $\beta$ -Caryophyllen. Die intramolekulare C6=C7-Doppelbindung kann jedoch protoniert werden. Durch einen nukleophilen Angriff von Wasser an C3 und C7-C14-Folgezyklisierung reagiert (+)- $\beta$ -Caryophyllen zum trizyklischen Endprodukt (+)-Caryolanol. Der terminale Schritt von TS-katalysierten Reaktionskaskaden besteht im Allgemeinen entweder in einer Protonabspaltung, die zu einem Terpen (wie hier (+)- $\beta$ -Caryophyllen) führt, oder in einem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls, der zu einem Terpen-Alkohol führt (wie hier (+)-Caryolanol). Bei unspezifischen TSn wie der (+)-Caryolanol-Synthase können beide Schritte nebeneinander auftreten. Bei der Synthese von (+)-Caryolanol werden drei C-C Bindungen geknüpft und vier Chiralitätszentren (C2, C3, C7, C10) induziert (Nakano et al. 2011). Die De- und Reprotonierung von neutralen Zwischenprodukten (wie hier (+)- $\beta$ -Caryophyllen) im Verlauf der TS-katalysierten Reaktionen ist mechanistisch noch nicht im Detail verstanden. Arbeiten zur Strukturaufklärung verschiedener TSn weisen darauf hin, dass neben Aminosäureresten die abgespaltene Pyrophosphatgruppe und Wassermoleküle im aktiven Zentrum der TSn als Säure und Base dienen können (Christianson 2006). Inkubation von (+)- $\beta$ -Caryophyllen in deuteriertem Wasser zeigte jedoch, dass die Protonierung von Doppelbindungen ausschließlich in Anwesenheit der (+)-Caryolanol-Synthase erfolgt, also enzymkatalysiert ist (Nakano et al. 2011).

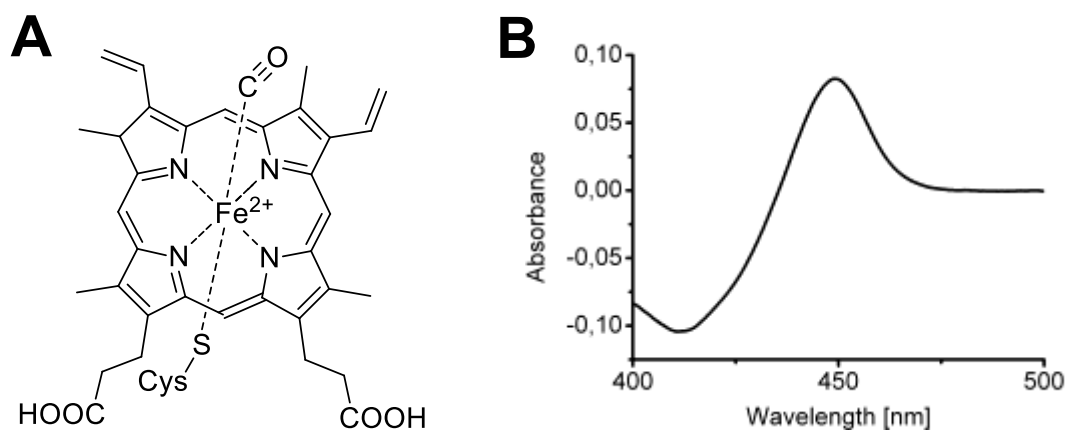


**Schema 8:** Mechanismus TS-katalysierten Reaktion am Beispiel der (+)-Caryolanol-Synthase; sowohl das Sesquiterpen  $\beta$ -Caryophyllen als auch der Terpenalkohol (+)-Caryolanol kommen nebeneinander als Produkte vor, modifiziert aus (Nakano et al. 2011)

## 1.4 Cytochrome P450

Cytochrome P450 (P450s) sind in allen biologischen Reichen vorkommende Häm-Monooxygenasen mit verschiedensten physiologischen Aufgaben. Humane P450s sind beispielsweise in der Leber am oxidativen Abbau von Xenobiotika beteiligt (Anzenbacher and Anzenbacherová 2001) und in der Nebenniere für Synthese und Metabolismus von Steroidhormonen verantwortlich (Schiffer et al. 2015). In Insekten sind P450s am Abbau toxischer Sekundärmetabolite beteiligt, bei deren Synthesen andere P450s in Pilzen und Pflanzen oft eine Rolle spielen (Omura 2013). Insbesondere vollführen P450s bei der Terpenbiosynthese in Pflanzen und Bakterien oft für die biologische Aktivität essentielle Derivatisierungen der Terpen-Kohlenwasserstoffe (Kap.1.2.1) (Pateraki et al. 2015).

Die roten „Pigmente“ wurden zum ersten Mal 1958 von Klingenberg und Garfinkel unabhängig voneinander aus Lebermikrosomen von Ratten (Klingenberg 1958) und von Schweinen isoliert (Garfinkel 1958). In mehreren Publikationen zwischen 1962 und 1964 wurden sie von Omura und Sato als Hämproteine charakterisiert (Omura and Sato 1962; Omura and Sato 1964; Omura and Sato 1964). In der Folge konnten weitere P450s aus mitochondrialen Nebennierenfraktionen (Estabrook et al. 1963; Estabrook 2003), aber auch Pflanzen (Markham et al. 1972), Pilzen (Ambike and Baxter 1970), und Bakterien (Tyson et al. 1972) isoliert werden.



**Abbildung 5:** A) Schematische Darstellung des reduzierten CO-Häm-Komplexes von Cytochromen P450, das zentrale Fe-Kation trägt im reduzierten Zustand eine formale Ladung von  $2+$  und ist in der äquatorialen Ebene an Protoporphyrin IX als vierzähligen Liganden und axial an den Thiolat-Rest eines hochkonservierten Cysteins und Kohlenmonoxid gebunden; B) UV/Vis-Spektrum des reduzierten CO-gebundenen Komplexes von CYP264B1

Ihre Bezeichnung erhielten sie aufgrund des Lichtabsorptionsmaximums ihres reduzierten CO-Komplexes bei 450 nm (Soret Peak). Bis dahin lagen üblich beobachtete Absorptionsmaxima von Hämproteinen um 420 nm. Die Rotverschiebung ist dadurch begründet, dass das komplexierte  $\text{Fe}^{2+}$  im Cofaktor von P450s statt eines Histidins, wie andere Hämproteine, das Thiolatanion eines

Cysteinrestes des konservierten Hämbindemotivs FxxGx(H/R)xCxG als distalen Liganden trägt (Abb. 5). (Roach et al. 1999; Denisov et al. 2005)

### 1.4.1 Cytochrome P450 katalysieren den Einbau von molekularem Sauerstoff in C-H-Bindungen

Die ubiquitär vorkommenden P450s bilden mit über 21000 gezählten Vertretern (Bernhardt and Urlacher 2014) die größte beschriebene Gensuperfamilie und werden in einer Datenbank, die von Dr. David Nelson (University of Tennessee) betrieben wird, gelistet (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>). Aus diesem Grund wurde für P450s im Gegensatz zu allen anderen Enzymen, deren Nomenklatur der Funktion nach erfolgt, eine systematische Nomenklatur nach Sequenzidentitäten vorgeschlagen. Dabei steht bei der Bezeichnung jedes Enzyms am Anfang die Abkürzung „CYP“ für Cytochrom P450, gefolgt von einer arabischen Zahl, für die Familie (>40% Sequenzidentität), einem Buchstaben für die Subfamilie (>55% Sequenzidentität) und zuletzt wieder einer arabischen Zahl, die das individuelle Enzym bezeichnet (Abb. 6) (Nebert et al. 1987).

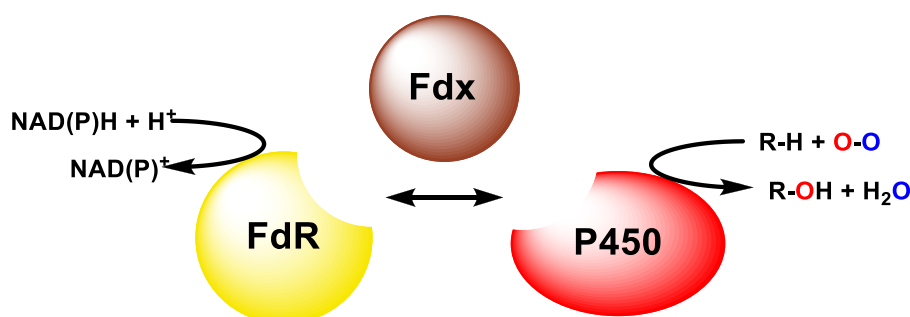
Familie      Individuelles Enzym  
**CYP264B1**  
Subfamilie

**Abbildung 6:** Systematische Nomenklatur von Cytochromen P450

Die Anzahl der P450-Gene in verschiedenen Organismen variiert stark. So enthält das Genom des Darmbakteriums *E. coli* keine P450s, die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* besitzt zwei P450 Gene, der Mensch hingegen 57 (Nebert et al. 2013; Omura 2013). Obwohl Theorien einigen P450s direkte Rollen in der Evolution und der Komplexität des Stoffwechsels zuordnen (Nelson 2011; Nelson 2013; Omura 2013), besitzen evolutionär später entwickelte Arten jedoch nicht automatisch eine größere Anzahl von P450s. Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* (Reis) enthalten 246 bzw. 356 P450 Gene (Nelson et al. 2004), jedoch auch der Pilz *Aspergillus oryzae* enthält 153 (Nelson 2011). Neben hochspezifischen P450s, die oft an Biosynthesen von Naturstoffen beteiligt sind, gibt es auch Vertreter dieser Enzymklasse, die sehr breite Substratspektren haben. Ein eindrucksvolles Beispiel dafür ist das humane Xenobiotika-abbauende CYP3A4 (Anzenbacher and Anzenbacherová 2001).

Mechanistisch vollführen P450s die Aktivierung von molekularem Sauerstoff und übertragen ein Sauerstoffatom auf ihr Substrat, (Schema 9, rot) während das andere Atom zu Wasser reduziert wird (Schema 9, blau). Die häufigste von P450s katalysierte Reaktion ist dabei die Hydroxylierung von chemisch inerten C-H-Bindungen des Substrats. Jedoch sind auch weitere

Reaktionen wie Epoxidierungen, Heteroatom-Oxidierungen, Heteroatomabspaltungen, Oxidationen von Acetylenen, Aromaten, Olefinen und viele weitere beschrieben (Guengerich 2001; Guengerich 2007; Isin and Guengerich 2007; Bernhardt and Urlacher 2014). Damit das P450 katalytisch aktiv werden kann, muss es zunächst reduziert werden. Die dazu notwendigen Elektronen werden von den universellen Reduktionsäquivalenten NADH und/oder NADPH bereitgestellt, weswegen man P450s auch als externe Monooxygenasen bezeichnet. Dabei kommt es nicht zu direkten Interaktionen zwischen NAD(P)H und P450s, sondern die Elektronen werden durch ein System verschiedener Redoxpartner übertragen. Redoxsysteme sind verschiedene Kombinationen aus FAD, FMN, oder Fe-S-Cluster enthaltenden Proteinen und stellen eine weitere Möglichkeit zur Klassifizierung von P450s dar. Die häufigsten bakteriellen Redoxsysteme (Klasse I) bestehen aus den beiden löslichen Elektronentransferproteinen Ferredoxinreduktase (FdR, FAD-Protein) und Ferredoxin (Fdx, FeS-Protein). Zur Aktivierung des P450 werden Elektronen vom NAD(P)H zunächst auf FdR und dann über das als „Shuttle“ agierende Fdx auf das P450 übertragen. Erst das reduzierte P450 aktiviert molekularen Sauerstoff und kann seine Funktion als Katalysator entfalten. Ein Sauerstoffatom wird mit Hilfe des P450 in die C-H-Bindung des Substrats (R-H) eingebaut, während das andere Atom zu Wasser reduziert wird (Schema 9) (Hannemann et al. 2007).



**Schema 9:** Cytochrom P450-katalysierte Oxidation von organischen Verbindungen. Dargestellt ist der Elektronenfluss im Klasse I Redoxsystem von den universellen Reduktionsäquivalenten NADH bzw. NADPH über die löslichen Elektronentransferpartner Ferredoxinreduktase (FdR) und Ferredoxin (Fdx) auf das Cytochrom P450 (P450). Das reduzierte P450 katalysiert den Einbau eines Atoms von molekularem Sauerstoff (rot) in die C-H-Bindung des Substrats (R-H), während das andere Atom zu Wasser reduziert wird (blau), modifiziert aus (Hannemann et al. 2007).

## 1.4.2 Cytochrome P450 spielen eine wichtige Rolle in der Terpenbiosynthese

Wie in den Kapiteln 1.2 und 1.2.1 beschrieben, bilden Terpene trotz ihrer Biosynthese über gemeinsame Prenylpyrophosphat-Intermediate die größte Gruppe von Naturstoffen. Die Diversität der Strukturen ist einerseits durch die unterschiedlichen Geometrien der Kohlenwasserstoffgerüste, andererseits durch die vielfältigen Funktionalisierungen bedingt. Funktionalisierungen – oder Dekorierungen – der Terpene werden durch selektive, oft von P450s

katalysierte, Oxidationen von C-H-Bindungen zu Alkoholen eingeleitet. Die Hydroxylierungen ebneten den Weg für weitere Derivatisierungen zu Aldehyden, Ketonen, organischen Säuren, Estern und Konjugationen. Somit nehmen P450s in der Synthese von biologisch aktiven Terpenen Schlüsselrollen ein und ihre Identifizierung und Charakterisierung ist nicht nur für die Grundlagenforschung interessant. Cytochrome P450 sind unter anderem an der Synthese von bioaktiven Naturstoffen wie Gossypol ((+)-Cadinene-8-hydroxylase, CYP706B1) (Luo et al. 2001), Artemisinin (Amorpha-4,11-diene Oxidase, CYP71A1) (Bertea et al. 2005; Ro et al. 2006), Taxol (mindestens sieben verschiedene P450s) (Kaspera and Croteau 2006) und am Katabolismus von Abscisinsäure (Abscisinsäure-8'-hydroxylasen, CYP707A-Familie) beteiligt (Schema 1) (Finkelstein 2013). Die großtechnische Produktion der genannten Naturstoffe mit Hilfe von Methoden der synthetischen Biologie ist industriell interessant. Aus diesem Grund ist die Charakterisierung der beteiligten P450s essentiell für ihre Anwendung für Biosynthesen.

Gene für Terpensynthese und -funktionalisierung liegen sowohl in Pflanzen (Boutanaev et al. 2015), als auch in Pilzen (Lin et al. 2014), und Bakterien (Moody et al. 2012) oft gemeinsam in Clustern vor. Bei der Suche nach neuen terpenoiden Naturstoffen ist der Ansatz auf Genebene hilfreich. TSn und P450s lassen sich in sequenzierten Genomen mit Hilfe bioinformatischer Methoden über ihre charakteristischen Motive identifizieren (Khatri et al. 2010; Cane and Ikeda 2012; Yamada et al. 2012; Rabe and Dickschat 2013; Dickschat et al. 2014). Die heterologe Expression von TSn und P450s gehört heute zu den etablierten Methoden und hilft dabei, einerseits die Funktion der entsprechenden Gene in isolierten Systemen zu untersuchen und andererseits auch Screenings von TSn und P450s in Ganzzellsystemen auf eine bestimmte Funktion hin durchzuführen (Harada et al. 2011; Rabe and Dickschat 2013).

### **1.4.3 Die Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 oxidieren eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate**

Der Stamm *S. cellulosum* So ce56 enthält mit 13.1 Mbp nicht nur eines der größten sequenzierten bakteriellen Genome (Schneiker et al. 2007), sondern mit 21 P450-Genen auch den größten Satz an putativen Hydroxylasen im Reich der Myxobakterien (Khatri et al. 2011). Yogan Khatri konnte in seiner Dissertation alle 21 P450-Gene exprimieren und einen Elektronentransfer mit funktionellen Redoxpartnern nachweisen (Khatri 2009). Dabei stellte sich durch Arbeiten von Kerstin Ewen das bovine Elektronentransfersystem aus Adrenodoxin (Adx) und Adrenodoxinreduktase (AdR) für einige der P450s als das effizienteste im Vergleich zu allen Kombinationen der endogenen Elektronentransferpartner heraus (Ewen 2010). Die Effizienz konnte weiterhin durch das Ersetzen der AdR durch eine Flavodoxinreduktase (Fdr) aus *E. coli* erhöht werden (Ringle et al. 2013).

Obwohl über die physiologische Funktion der P450-Gene nur spekuliert werden kann, haben Mitarbeiter des Instituts für Biochemie der Universität des Saarlandes in breiten Substratscreening-Ansätzen verschiedene Substratklassen von Naturstoffen und synthetischen Pharmazeutika mit P450s aus *S. cellulorum* So ce56 oxidieren können. Darunter fallen Fettsäuren (Khatri et al. 2010), Steroide (Ringle 2013; Khatri et al. 2016), trizyklische Psychopharmaka (Litzenburger et al. 2014), aber auch kleine, flüchtige Riechstoffe aus den Klassen der Norisoprenoide (Ly et al. 2012; Litzenburger and Bernhardt 2016) und Terpenoide (Khatri 2009; Ly et al. 2012). Dabei fielen insbesondere CYP264B1 als Sesquiterpenoxidase und die CYP267-Familie durch hohe Substratvielfalt und durch Oxidationsprodukte, die denen humaner P450s entsprechen, auf (Tab. 2). So konnte die von Ringle beschriebene „kleine Schatzkiste des *Sorangium cellulorum* So ce56 zur biotechnologischen Anwendung von Cytochromen P450“ bereits teilweise erschlossen werden (Ringle 2013). Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich weiterhin mit dieser Fragestellung.

**Tabelle 2:** Übersicht über die *S. cellulosum* So ce56 P450s und ihre Substrate. Substrate sind Substanzen, deren Umsatz *in vitro* oder mit Ganzzellkatalysatoren durch HPLC-, LC/MS-, GC/MS-, oder DC-Analysen nachgewiesen wurde.

| Cytochrom P450 | Substratklasse | Substrat                                                                                                                                                                                                  | Referenz                                              |
|----------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| CYP109C1       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP109C2       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP109D1       | Fettsäuren     | Caprinsäure<br>Tridekansäure<br>Oleanolsäure<br>13-Methylmyristinsäure<br>15-Methylpalmitinsäure<br>Myristinsäure<br>Palmitinsäure<br>Laurinsäure                                                         | (Khatri 2009)<br><br><br><br><br>(Khatri et al. 2010) |
|                | Monoterpene    | Geraniol<br>Nerol<br>(-)-R-Limonen                                                                                                                                                                        | (Khatri 2009)                                         |
|                | Norisoprenoide | $\alpha$ -Ionon<br>$\beta$ -Ionon                                                                                                                                                                         | (Khatri et al. 2010)                                  |
|                | N-Heterozyklus | Indol                                                                                                                                                                                                     | (Ringle 2013)                                         |
| CYP110H1       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP110J1       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP117B1       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP124E1       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP259A1       |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| CYP260A1       | Norisoprenoide | $\alpha$ -Ionon                                                                                                                                                                                           | (Ringle 2013)                                         |
|                | Sesquiterpene  | (+)-Nootkaton<br>Isolongifolen-9-on                                                                                                                                                                       | (Ewen et al. 2009)<br>(Ringle 2013)                   |
|                | C18-Steroide   | Östron<br>3-Methoxyöstron<br>$\beta$ -Estradiol                                                                                                                                                           | (Ringle 2013)                                         |
|                | C19-Steroide   | Androstendion<br>19-Norandrostendion<br>11-Ketoandrostendion<br>Dehydroepiandrosteron<br>Testosteron<br>7-Methoxytestosteron<br>17 $\alpha$ -Methyltestosteron<br>19-Nortestosteron<br>Testosteron Acetat | (Ringle 2013)                                         |
|                | C21-Steroide   | Progesteron<br>11-Deoxycorticosteron<br>Corticosteron<br>Cortison<br>Cortisol<br>11-Deoxycortisol<br>17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron                                                                      | (Khatri 2009)<br><br>(Ringle 2013)                    |
|                | Phenothiazine  | Chlorpromazin<br>Promethazin                                                                                                                                                                              | (Litzenburger et al. 2014)                            |
|                |                |                                                                                                                                                                                                           |                                                       |

|          |                |                                                                                                                                                                      |                                                    |
|----------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| CYP260B1 | Norisoprenoide | $\alpha$ -Ionon<br>Isomethyl- $\alpha$ -Ionon<br>n-Methyl- $\alpha$ -Ionon<br>$\beta$ -Ionon<br>4-Hydroxy- $\beta$ -Ionon<br>$\beta$ -Damascon<br>$\delta$ -Damascon | (Ringle 2013)<br>(Litzenburger and Bernhardt 2016) |
|          | Sesquiterpene  | (+)-Nootkaton<br>Isolongifolen-9-on                                                                                                                                  | (Ringle 2013)                                      |
|          | C19-Steroide   | Androstendion<br>19-Norandrostendion<br>Testosteron<br>7-Methoxytestosteron<br>17 $\alpha$ -Methyltestosteron<br>19-Nortestosteron<br>Testosteron Acetat             | (Ringle 2013)                                      |
|          | C21-Steroide   | Cortison<br>Corticosteron<br>11-Deoxycorticosteron<br>Progesteron<br>17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron                                                                 | (Ringle 2013)                                      |
| CYP261A1 |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                        |                                                    |
| CYP261B1 |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                        |                                                    |
| CYP262A1 |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                        |                                                    |
| CYP262B1 |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                        |                                                    |
| CYP263A1 |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                        |                                                    |
| CYP264A1 | Norisoprenoide | $\alpha$ -Ionon<br>$\beta$ -Ionon                                                                                                                                    | (Ly et al. 2012)                                   |
|          | O-Heterozyklen | 4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin<br>Flavanon                                                                                                                                | (Ringle 2013)                                      |
|          | Dibenzazepine  | Amitriptylin<br>Clomipramin<br>Imipramin<br>Iminodibenzyl                                                                                                            | (Litzenburger et al. 2014)                         |
|          | Phenothiazine  | Chlorpromazin<br>Phenothiazin                                                                                                                                        | (Litzenburger et al. 2014)                         |
| CYP264B1 | Sesquiterpene  | (+)-Nootkaton<br>(+)-Valencen<br>Isolongifolen-9-on<br>Cloven<br>$\alpha$ -Humulen<br>$\alpha$ -Longipinen                                                           | (Ly et al. 2012)                                   |
| CYP265A1 |                | Nicht bekannt                                                                                                                                                        |                                                    |

|          |                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                  |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| CYP266A1 |                                                                                                                                                                                       | Nicht bekannt                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                  |
| CYP267A1 | Phenothiazine                                                                                                                                                                         | Promethazin<br>Thioridazin<br>Chlorpromazin                                                                                                                                                                                                                                                       | (Litzenburger et al. 2014)<br>(Kern et al. 2016) |
|          | Morphinan<br><br>Phenylpropanoid                                                                                                                                                      | Dextromethorphan<br>Haloperidol<br>Ibuprofen<br>Tamoxifen<br>Terfenadin                                                                                                                                                                                                                           | (Kern et al. 2016)                               |
| CYP267B1 | Norisoprenoide                                                                                                                                                                        | $\alpha$ -Ionon<br>Allyl- $\alpha$ -Ionon<br>Isomethyl- $\alpha$ -Ionon<br>n-Methyl- $\alpha$ -Ionon<br>7,8-Dihydro- $\alpha$ -Ionon<br>$\beta$ -Ionon<br>Allyl- $\beta$ -Ionon<br>7,8-Dihydro- $\beta$ -Ionon<br>$\alpha$ -Iron<br>$\alpha$ -Damascon<br>$\beta$ -Damascon<br>$\delta$ -Damascon | (Litzenburger and Bernhardt 2016)                |
|          | Dibenzazepine                                                                                                                                                                         | Amitriptylin<br>Clomipramin<br>Imipramin<br>Iminodibenzyl                                                                                                                                                                                                                                         | (Litzenburger et al. 2014)                       |
|          | Phenothiazine                                                                                                                                                                         | Chlorpromazin<br>Phenothiazin<br>Promethazin                                                                                                                                                                                                                                                      | (Litzenburger et al. 2014)                       |
|          | 4-Aminochinolin<br>Phenylacetat<br>Phenylpropanoid<br>Tetrazolderivat<br>Benzylisochinolinalkaloid<br>Thienobenzodiazepin<br>Indolderivat<br>Imidazolinderivat<br>Alkaloid<br>Glinide | Amodiaquin<br>Diclofenac<br>Ibuprofen<br>Losartan<br>(3S,5R)-Noscapin<br>Olanzapin<br>Omeprazol<br>Oxymetazolin<br>Papaverin<br>Repaglinide<br>Retonavir<br>Tamoxifen<br>Terfenadin                                                                                                               | (Kern et al. 2016)                               |

## 2. Vorarbeiten und Zielsetzung

Volatile Terpene pflanzlichen Ursprungs finden häufig als Riechstoffe in der Parfümerie Verwendung, jedoch haben sich auch Bakterien als interessante Quelle für volatile Terpene erwiesen. Zu Beginn dieser Arbeit lagen verschiedene Hinweise auf die Rolle des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56 als Produzent volatiler Sesquiterpene vor. Das sequenzierte Genom von *S. cellulosum* So ce56 enthält Informationen über drei Typ I-Terpensynthasen (TSn) (sce1440, sce6369, sce8552) und eine Typ II-TS (sce4636) (Schneiker et al. 2007; Yamada et al. 2012). Insbesondere die TS sce8552 fiel durch die unmittelbare Lage neben dem Cytochrom P450 CYP264B1 (sce8551) auf (Khatri et al. 2011). Vorarbeiten zur heterologen Expression und zum Substratumsatz von CYP264B1 zeigten, dass Sesquiterpene und Ionone durch dieses Enzym umgesetzt werden können (Ewen et al. 2009; Khatri 2009; Ly et al. 2012).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Erschließung der Biosynthese neuer volatiler Sesquiterpene durch *S. cellulosum* So ce56. Alle putativ an der Biosynthese von terpenoiden Naturstoffen beteiligten Enzyme wurden funktional untersucht. Vollkommen neue Terpenstrukturen waren als Produkte der TSn (sce1440, sce4636, sce6369 und sce8552) zu erwarten. Die Strategie schloss die heterologe Expression von TS-Genen, *in vitro* Experimente mit gereinigten TSn und CYP264B1 sowie die Herstellung von Milligramm-Mengen der natürlichen Sesquiterpene mit Hilfe von *E. coli*-basierten Ganzzellsystemen mit ein. Neben der Charakterisierung neuer Terpenstrukturen stand die Frage nach der natürlichen Funktion des Genclusters aus der TS sce8552 und CYP264B1 (sce8551) im Fokus. Dazu wurde das native Produkt der TS sce8552 identifiziert und von CYP264B1 umgesetzt. Die *in vivo* Aktivität der TSn und von CYP264B1 in *S. cellulosum* So ce56 wurde durch einen Vergleich der gereinigten Terpene mit volatilen Extrakten des Myxobakteriums verifiziert. Zur Beantwortung der Frage nach der Präsenz weiterer natürlicher Terpene in *S. cellulosum* So ce56 wurden Umsätze des TS sce8552-Produktes mit einem ausgewählten Satz weiterer Cytochrome P450 des Bakteriums getestet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Erschließung des biosynthetischen Potenzials der insgesamt 21 Cytochrome P450 aus *S. cellulosum* So ce56. Beispielhaft dafür wurde die Bandbreite der von CYP264B1 oxidierbaren Sesquiterpenstrukturen evaluiert. Neben dem nativen Substrat von CYP264B1 (sce8551), dem Produkt der TS sce8552, wurden Strukturklassen der Eremophilane, Humulane, Caryophyllane und Cedrane durch CYP264B1 oxidiert. Die Oxidationsprodukte wurden identifiziert und damit die Selektivität des Enzyms für bestimmte Oxidationspositionen innerhalb der Kohlenwasserstoffskelette untersucht. Für die Umsätze wurde ein *E. coli* Ganzzellsystem genutzt. Mit Hilfe des Strukturmodells von CYP264B1 (Ly et al. 2012) und der Molekülstrukturen von Substraten und Produkten konnten über Docking-

Experimentelle Aussagen über die Struktur-Funktions-Beziehungen bei der Oxidation der verschiedenen Sesquiterpenklassen durch CYP264B1 getroffen werden.

Um die zentrale Frage nach der Relevanz der Substanzen als Riechstoffe zu beantworten, wurden sowohl die hier erhaltenen natürlichen Sesquiterpene aus *S. cellulosum* So ce56 als auch die durch CYP264B1 oxidierten Sesquiterpene in Kooperation mit der Firma Givaudan olfaktorisch evaluiert. Analog zu üblichen Strategien bei der Suche von neuen Riechstoffen, die Derivatisierungen von bekannten Riechstoffmolekülen vorsehen, sind durch chemische Synthesen unzugängliche oxidierte Sesquiterpene höchstinteressante Kandidaten für neue Duftkomponenten.

Die durchgeführte Arbeit führte zu drei Erstautor-Publikationen, die unter Kapitel 3 vollständig reproduziert sind. Weitere Manuskripte befinden sich in Vorbereitung.

### **3. Wissenschaftliche Publikationen**

#### **3.1 „Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation”**

A. Schiffrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt

im Original erschienen in *ChemBioChem*, 2015, 16, 337-344.

In dieser Publikation werden die funktionellen Untersuchungen des Genclusters bestehend aus der Terpensynthase (TS) sce8552 (geoA) und dem Cytochrom P450 CYP264B1 (sce8551) beschrieben. Dabei produziert die TS sce8552 als erstes beschriebenes Enzym das Sesquiterpen (+)-Eremophilen, dessen Struktur mit Methoden der Massenspektroskopie (MS), Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Röntgenbeugung analysiert wurde. (+)-Eremophilen wird von CYP264B1 oxidiert und dient damit als sein natürliches Substrat. In diesem Teil der Arbeit wurde die heterologe Expression und Reinigung von Terpensynthasen aus *S. cellulosum* So ce56 am Beispiel von sce8552 etabliert. Weiterhin wurden *E. coli* basierte *in vivo* Ganzzellkatalysatoren und Reaktionsbedingungen für die Biotransformation von Farnesylpyrophosphat (FPP) zu Sesquiterpenen entwickelt. Diese Arbeiten dienten als Grundlage für die funktionelle Analyse aller TSn aus *S. cellulosum* So ce56.

# Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation

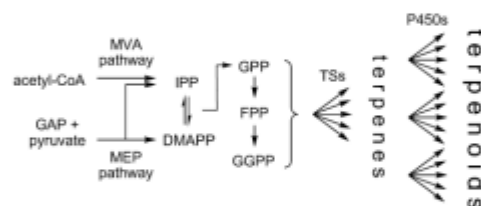
Alexander Schiffrin,<sup>[a]</sup> Thuy T. B. Ly,<sup>[a, b]</sup> Nils Günnewich,<sup>[a]</sup> Josef Zapp,<sup>[c]</sup> Verena Thiel,<sup>[d]</sup> Stefan Schulz,<sup>[d]</sup> Frank Hannemann,<sup>[a]</sup> Yogan Khatri,<sup>[a]</sup> and Rita Bernhardt<sup>\*,[a]</sup>

Terpenoids can be found in almost all forms of life; however, the biosynthesis of bacterial terpenoids has not been intensively studied. This study reports the identification and functional characterization of the gene cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56. Expression of the enzymes and synthesis of their products for NMR analysis and X-ray diffraction were carried out by employing an *Escherichia coli* whole-cell conversion system that provides the geoA substrate farnesyl pyrophosphate through simultaneous overexpression

of the mevalonate pathway genes. The geoA product was identified as a novel sesquiterpene, and assigned NMR signals unambiguously proved that geoA is an (+)-eremophilene synthase. The very tight binding of (+)-eremophilene (~0.40  $\mu\text{M}$ ), which is also available in *S. cellulosum* So ce56, and its oxidation by CYP264B1 suggest that the CYP264B1-geoA gene cluster is required for the biosynthesis of (+)-eremophilene derivatives.

## Introduction

Terpenoids, the largest group of natural products, comprise more than 55 000 different molecules. They are classified according to the number of isoprene units in their structures.<sup>[1]</sup> All terpenoids are biosynthesized by the mevalonate (MVA) pathway in archaeobacteria and most eukaryotes, and by a mevalonate-independent pathway (methyl erythritol pathway, MEP) in most eubacteria. Both pathways lead to the universal linear precursors geranylpyrophosphate (GPP), farnesylpyrophosphate (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP).<sup>[2,3]</sup> The astonishing structural diversity of the terpenoids arises in consecutive biosynthetic steps: terpene synthases (TSs; or terpene cyclases) convert the pyrophosphates into linear, mono- or multicyclic terpenes (or terpene alcohols),<sup>[1-3]</sup> then, the terpenes are derivatized by terpene-modifying enzymes, such as cytochromes P450 (Scheme 1).<sup>[6-8]</sup>



**Scheme 1.** Biosynthesis pathways of terpenoids. GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; IPP: isopentenylpyrophosphate; DMAPP: dimethylallylpyrophosphate; GPP: geranylpyrophosphate; FPP: farnesylpyrophosphate; GGPP: geranylgeranylpyrophosphate; TSs: terpene synthases; P450s: cytochrome P450s.

[a] A. Schiffrin, Dr. T. T. B. Ly, Dr. N. Günnewich, Dr. F. Hannemann, Dr. Y. Khatri, Prof. Dr. R. Bernhardt  
Universität des Saarlandes, Biochemie  
Campus B2.2, 66123 Saarbrücken (Germany)  
E-mail: ritabern@mx.uni-saarland.de

[b] Dr. T. T. B. Ly  
Institute of Biotechnology  
Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)  
18-Hoang Quoc Viet, Hanoi (Vietnam)

[c] Dr. J. Zapp  
Universität des Saarlandes, Pharmazeutische Biologie  
Campus C2.2, 66123 Saarbrücken (Germany)

[d] Dr. V. Thiel, Prof. Dr. S. Schulz  
Technische Universität Braunschweig  
Institut für Organische Chemie  
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Germany)

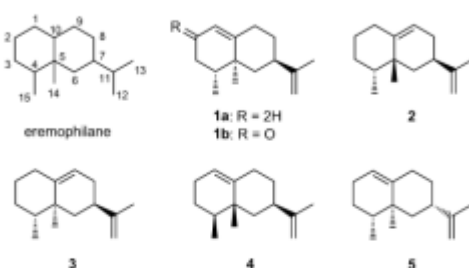
Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201402443>.

TSs share a common alpha-helical fold and two highly conserved motifs (the aspartate-rich motif DDXXD/E and the NSE/DTE triad) in the active site; these bind three essential divalent cations ( $\text{Mg}^{2+}$  in most cases).<sup>[1-3]</sup> Sequence similarity between TSs is rather low. This explains the structural variety within the active site and the broad spectrum of terpene skeletons.

Cytochromes P450s (heme monooxygenase enzymes) are ubiquitously distributed in all forms of life. They serve as the most important metabolizers of xenobiotics, and they are involved in the biosynthesis of natural products.<sup>[9]</sup> The most common reaction catalyzed by cytochromes P450 is the introduction of an oxygen atom into nonactivated carbon-hydrogen bonds, thereby resulting in hydroxylation of the substrate.<sup>[9]</sup> The substrates, with various structures from simple alkanes to highly substituted steroids and polyketides, are converted regio- and stereo-specifically by cytochromes P450.<sup>[6,8,10]</sup>

Biosynthetic pathways involving both TSs and cytochromes P450 are known in plants,<sup>[11–14]</sup> fungi,<sup>[15]</sup> and more recently bacteria.<sup>[16–20]</sup> Volatile mono- (two isoprene subunits) and sesquiterpenoids (three isoprene subunits) are postulated to serve as means of chemical communication in animals, plants, insects, and microorganisms.<sup>[21–23]</sup>

For industrial production, plant terpenoids are of particularly high value,<sup>[24]</sup> because of their wide application as flavors and fragrances such as the grapefruit odorant (+)-nootkatone (Scheme 2, **1b**),<sup>[25–30]</sup> as highly potent pharmaceuticals like the



**Scheme 2.** Eremophilane type sesquiterpenes: **1a** (+)-valencene; **1b** (+)-nootkatone; **2** 5-epiaristolochene; **3** (-)-aristolochene; **4** (-)-eremophilene; **5** (+)-eremophilene.

taxanes in tumor therapy,<sup>[31–32]</sup> and the anti-malarial drug artemisinin.<sup>[33]</sup> Cytochrome P450s are able to perform terpenoid hydroxylations<sup>[29,30]</sup> in a way that is superior to synthetic chemistry concerning selectivity and efficiency.<sup>[34–36]</sup> *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium* have proven to be valuable hosts for in vivo cytochrome P450 bioconversions of terpenoids.<sup>[37–40]</sup> Heterologous combinations of TSs and cytochromes P450 as whole-cell biocatalysts show a high biosynthetic potential.<sup>[41]</sup>

The increasing number of sequenced bacterial genomes<sup>[42]</sup> has revealed a large number of putative TS<sup>[43–5]</sup> and cytochrome P450 genes.<sup>[44]</sup> The most widespread bacterial TS genes are 2-methylisoborneol (2-MIB) synthase,<sup>[44,45]</sup> germacradienol/geosmin synthase,<sup>[46,47]</sup> and epi-isozizaene (EIZ) synthase.<sup>[16,18,48]</sup> However, the number of functionally characterized TSs has increased only very recently.<sup>[49,50]</sup> Because of the low sequence similarities within the TS and cytochrome P450 families, it remains impossible to determine their physiological roles only from the available amino acid sequences. Functional characterization of the enzymes and structural analyses of their products are the only methods to elucidate their natural roles. The most common approach for structural analyses of the volatile terpenoids is GC/MS in EI mode combined with MS databases,<sup>[51]</sup> like NIST<sup>[51]</sup> or Massfinder,<sup>[52]</sup> and GC retention indices. However, this technique is not applicable for the identification of new structures.

Here we report the functional analysis of a gene cluster consisting of CYP264B1 (sce8551) and the terpene synthase *geoA* (sce8552) from the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. CYP264B1 is one of 21 cytochrome P450s in *S. cellulosum* So ce56,<sup>[53,54]</sup> and has previously been shown to catalyze selective hydroxylation of (+)-nootkatone (**1b**) and the noriso-

prenoids  $\alpha$ - and  $\beta$ -ionone; however, smaller monoterpenes and bigger diterpenes and steroids were not able to bind.<sup>[55]</sup> *geoA* is one of three putative TS genes in *S. cellulosum* So ce56.<sup>[5]</sup> The in vitro enzymatic activity of *geoA* was examined, and *E. coli* whole-cell systems for the production of higher yields of the *geoA* and CYP264B1 products were developed. In addition, the molecular structure of *geoA* was elucidated by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, 2D-NMR, GC/MS, X-ray diffraction, and polarimetry; the in vivo CYP264B1 products were analyzed by GC/MS.

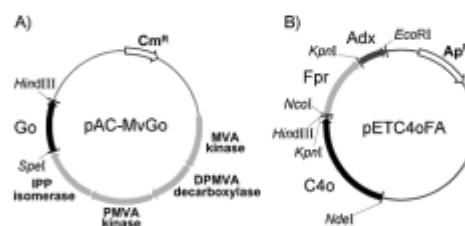
## Results and Discussion

### Bioinformatic analysis of the gene sequences, and vector construction

In the genome of *S. cellulosum* So ce56, a TS gene (sce8552) is located 63 bp downstream of CYP264B1 (sce8551), thus suggesting a putative gene cluster for TS and cytochrome P450. ORF sce8552 (annotated *geoA* in the NCBI database) is predicted to be a germacradienol/geosmin synthase.<sup>[5,46,47]</sup> Both the aspartate-rich motif (81-DDAYD-85) and the NSE triad (231-NDYFSLGKE-239) are present within its amino acid sequence.

For overexpression of *geoA* and CYP264B1, their nucleic acid sequences were optimized by employing the JAVA Codon Adaptation Tool (<http://www.jcat.de>)<sup>[56]</sup> and the Rare Codon Calculator (<http://people.mbl.ucla.edu/sunchar/caltor.html>). All *E. coli* rare codons were replaced.

In addition to their expression vectors (pET-*geoA* and pET22b-CYP264B1), vectors pAC-MvGo (Figure 1A) and pET-

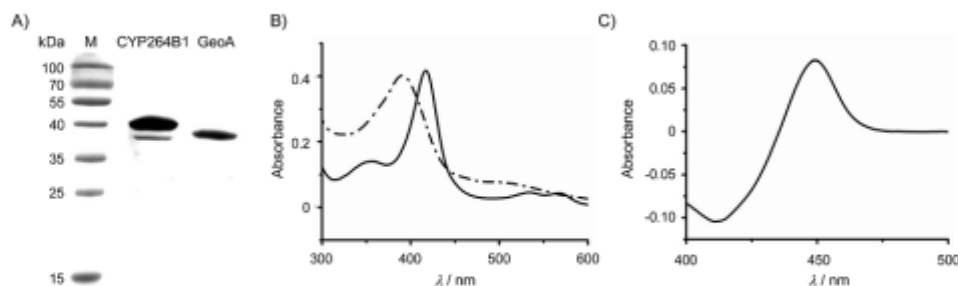


**Figure 1.** A) pAC-MvGo for *geoA* product synthesis, and B) pETC4oFA for synthesis of the oxidized *geoA* product in *E. coli* whole-cell systems; Gene abbreviations: Go: *geoA*; C4o: CYP264B1; Fpr: *E. coli* ferredoxin reductase; Adx: *Bos taurus* adrenodoxin.

C4oFA (Figure 1B) were constructed for *E. coli* whole-cell conversion systems. For in vivo *geoA* synthesis, MVA pathway genes from *Streptomyces* sp. strain CL190 were co-expressed. For in vivo sesquiterpene oxidation by CYP264B1, the heterologous electron-transfer system consisting of Fpr and Adx<sup>[57]</sup> was used for the co-expression.

### Protein expression and purification

The purification of both TS and CYP264B1 was performed by affinity chromatography. In SDS-PAGE the masses of purified TS



**Figure 2.** Analysis of purified proteins: A) SDS-PAGE of purified *geoA* gene product (GeoA) and purified CYP264B1; M: protein marker. B) UV-visible absorbance spectrum of oxidized CYP264B1 (4 μM) (—) and (+)-eremophilene (125 μM) bound CYP264B1 (----). C) CO-difference spectrum of CYP264B1.

(~40 kDa) and CYP264B1 (~45 kDa) were in a good agreement with their predicted molar masses (38 and 46 kDa, respectively; Figure 2A). The UV-visible spectrum of CYP264B1 showed a characteristic Soret peak at 417 nm (Figure 2B). The observed CO-difference spectrum was stable for 1–2 min and did not show any appearance of a 420 nm peak (Figure 2C), whereas the 450 nm peak increased with time.<sup>[55]</sup> The yield of CYP264B1 after the purification, as determined by the CO-difference spectrum method, was 864 nmol L<sup>-1</sup>.

#### Product analysis

A functional analysis of the gene cluster CYP264B1-*geoA* was conducted by structural characterization of the enzymatic products. In the first step, *in vitro* conversion by purified TS was performed to determine the molecular masses by GC/MS. Then, *E. coli* whole-cell conversion systems were used for the production of milligram quantities of the *GeoA* and CYP264B1 products for NMR and X-ray diffraction analyses.

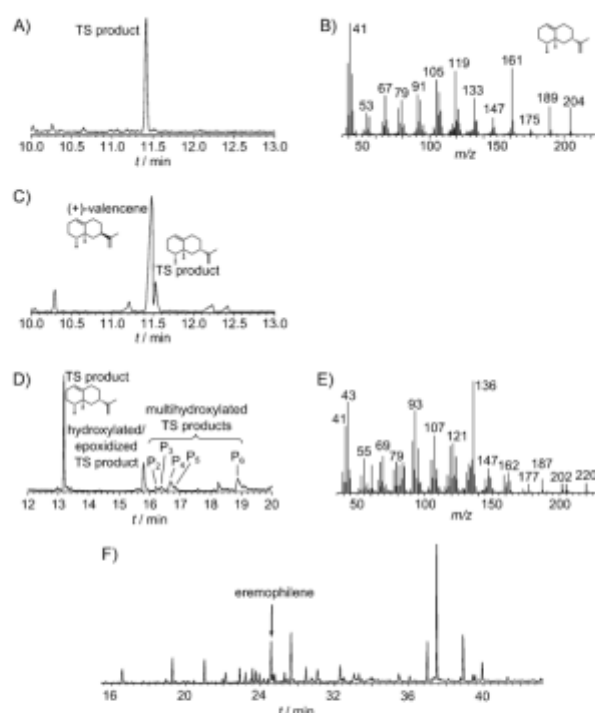
#### *In vitro* conversion of FPP by *geoA*

*In vitro* conversion of FPP by the *geoA* TS resulted in a single 204 Da product (Figure 3A), which corresponds to a sesquiterpene with the chemical formula C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (Figure 3B). A comparison of the EI-MS data of the sesquiterpene with the NIST Database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Data Version NIST 05) gave eremophilene and valencene as the first two preliminary hits; both compounds have an eremophilane skeleton (Scheme 2). The GC/MS run of (+)-valencene (**1a**), as an internal standard, showed that the *geoA* sesquiterpene product and **1a** are different compounds (Figure 3C). Therefore, **1a** was excluded.

#### *In vivo* conversion of mevalonolactone by *geoA*

For a detailed structural analysis of the TS sesquiterpene product by NMR and X-ray diffraction, milligram quantities were produced *in vivo* with an *E. coli*

whole-cell system and mevalonolactone as the substrate, rather than FPP (expensive with and tedious and time consuming purification of the sensitive terpene synthase). Thus, *E. coli* was transformed with vector pAC-MvGo, which harbors MVA pathway genes from *Streptomyces* sp. strain CL190 as well *geoA*. The purified TS and the strain produce the same single



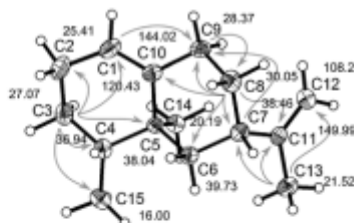
**Figure 3.** Total ion chromatograms (TICs) of terpenoids obtained by GC/MS. A) TIC of the *in vivo* conversion of mevalonolactone with *E. coli* harboring pAC-MvGo. B) Mass spectrum of the TS sesquiterpene product. C) TIC of the *in vivo* conversion of mevalonolactone with *E. coli* harboring pAC-MvGo with (+)-valencene (**1a**) as internal standard. D) TIC of the *in vivo* conversion of the TS sesquiterpene product with *E. coli* harboring pETC4oFA. E) Mass spectrum of the monohydroxylated/epoxidized TS product. F) TIC of the *S. cellulorum* So ce56 extract.

sesquiterpene product with a mass of 204 Da. The yield of the purified (+)-eremophilene was  $\sim 19 \text{ mg L}^{-1}$  per day in *E. coli* cell culture.

#### Structural analysis of the TS sesquiterpene product

$^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  NMR, 2D NMR and X-ray diffraction analyses of the purified sesquiterpene confirmed its relative stereochemistry in accordance with the structure of eremophilene (enantiomer **4** or **5**).

The specific rotation of the purified product was determined as  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +131.7$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). The absolute value is thus in agreement with previously reported data for enantiomer (–)-eremophilene (**4**) ( $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -142.5$ ).<sup>[56]</sup> Therefore, the purified sesquiterpene was unambiguously identified as (+)-eremophilene (**5**; Figure 4; Figures S1–S7 in the Supporting Information).



**Figure 4.** Crystal structure of (+)-eremophilene (**5**) at the 50% probability level; gray arrows indicate key HMBC coupling interactions (H—C); the complete set of HMBC interactions are given in Scheme S1 and Figure S6.

Therefore, the TS is considered a (+)-eremophilene synthase.

A multitude of eremophilane-type sesquiterpenes have been isolated from different plant species and structurally elucidated by NMR, including the (+)-nootkatone (**1b**) precursor (+)-valencene (**1a**),<sup>[59]</sup> 5-epiaristolochene (**2**),<sup>[60]</sup> the precursor of the phytoalexin capsidiol,<sup>[61]</sup> (–)-aristolochene (**3**),<sup>[62]</sup> and (–)-eremophilene (**4**).<sup>[63]</sup> The structure of **4** has been a topic of discussion in a multitude of publications,<sup>[58,63–67]</sup> because the NMR signals from the nonfunctionalized hydrocarbons have similar chemical shifts and coupling constants. None of these studies gave a complete assignment of the corresponding atoms in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum.

When Hochmannová et al. first described the structural analysis of eremophilene isolated from *Petasites officinalis* and *Petasites albus*, the NMR data were sufficient to show the existence of a trisubstituted double bond and an *exo*-isopropylidene group.<sup>[63]</sup> Piers and Keziere obtained **4** by chemical synthesis and explained properly its configuration.  $^1\text{H}$  NMR signals could clearly be assigned for H-1, H-12, H-13, H-14, and H-15,<sup>[64,65]</sup> as confirmed by Krepinsky et al.,<sup>[58]</sup> and Joulain and König.<sup>[67]</sup> However, because of multiple coupling and superposition of the  $^1\text{H}$  NMR signals, the assignment for the secondary and tertiary carbons was hindered. Although Näf and co-workers synthesized various eremophilane derivatives (including **4**) and compared them by assignment of their  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, there is ambiguity in the assignment of the signals of C-8 and C-9.<sup>[66]</sup>

The present work included HSQC (Figure S5), and HMBC (Figure S6) data for **5** (Figure 4), the enantiomer of **4**, thus completing Näf's work for the assignment of the signals for tertiary carbon atoms C-4 and C-7, and secondary carbons C-8 and C-9. In the HMBC spectrum, the H-13 signal ( $\delta = 1.71 \text{ ppm}$ , brs, 3H) shows  $^2J$  coupling with C-11 ( $\delta = 149.99 \text{ ppm}$ ) and  $^3J$  coupling with C-12 ( $\delta = 108.20 \text{ ppm}$ ), as well as the signal at  $\delta = 38.46 \text{ ppm}$ , which can only belong to C-7. The signal from the two H-3 couples were via  $^3J$  with C-1 ( $\delta = 120.43 \text{ ppm}$ ), C-5 ( $\delta = 38.04 \text{ ppm}$ ), and C-15 ( $\delta = 20.19 \text{ ppm}$ ), and via  $^2J$  with C-2 ( $\delta = 25.41 \text{ ppm}$ ) and C-4 ( $\delta = 36.94 \text{ ppm}$ ). Thus, the  $^{13}\text{C}$  signal at  $36.94 \text{ ppm}$  is exhibited by C-4. The adjacent carbon atoms (8 and 9) couple with each other's H atoms via  $^2J$ .

The  $^{13}\text{C}$  signal at  $28.37 \text{ ppm}$  couples with H-1 ( $\delta = 5.32 \text{ ppm}$ ), H-7 ( $\delta = 2.01 \text{ ppm}$ ) and the  $^1\text{H}$  signals at  $1.67$  and  $1.65 \text{ ppm}$ , which are bound to the carbon atom at  $30.05 \text{ ppm}$ . These  $^1\text{H}$  signals (besides the  $^{13}\text{C}$  signal at  $28.37 \text{ ppm}$ ) couple with C-6 ( $\delta = 39.73 \text{ ppm}$ ), C-7 ( $\delta = 38.46 \text{ ppm}$ ), C-10 ( $\delta = 144.02 \text{ ppm}$ ), and C-11 ( $\delta = 149.99 \text{ ppm}$ ). The peak at  $28.37 \text{ ppm}$  belongs to C-9, and the peak at  $30.05 \text{ ppm}$  belongs to C-8 (Figure 4). Thus, we unambiguously determined all  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals for **5** (Table 1). The product was obtained as single crystals, which were subjected to X-ray diffraction. The result confirmed the NMR data.

**Table 1.** NMR data: Chemical shifts and multiplicities of (+)-eremophilene in  $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) (Figure S1–S4).

| C atom | $^{13}\text{C}$ NMR [ $\delta$ in ppm] | $^1\text{H}$ NMR [ $\delta$ in ppm, m] |
|--------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1      | 120.43                                 | 5.32, m                                |
| 2      | 25.41                                  | 2.02, m; 1.93, m                       |
| 3      | 27.07                                  | 1.43, m, 2H                            |
| 4      | 36.94                                  | 1.50, m                                |
| 5      | 38.04                                  | –                                      |
| 6      | 39.73                                  | 1.51, m, 2H                            |
| 7      | 38.46                                  | 2.01, m                                |
| 8      | 30.05                                  | 1.67, m; 1.65, m                       |
| 9      | 28.37                                  | 2.37, m; 1.94, m                       |
| 10     | 144.02                                 | –                                      |
| 11     | 149.99                                 | –                                      |
| 12     | 108.20                                 | 4.70, m; 4.68, m                       |
| 13     | 21.52                                  | 1.71, br s, 3H                         |
| 14     | 20.19                                  | 0.90, s, 3H                            |
| 15     | 16.00                                  | 0.85, d, $J = 6.45 \text{ Hz}$ , 3H    |

Most importantly, (+)-eremophilene (**5**) was also detected as one of the most abundant among a multitude of sesquiterpenoids in the cell extract of *S. cellululosum* So ce56 (Figure 3F). This confirms the importance of this new compound in myxobacterial metabolism.

#### Binding and conversion of (+)-eremophilene (**5**) by CYP264B1

For the characterization of CYP264B1, purified **5** ((+)-eremophilene, its natural substrate) was employed for binding and conversion studies. The binding of **5** with CYP264B1 showed a high spin shift ( $\sim 99\%$ ; Figure 2B), and very tight binding was

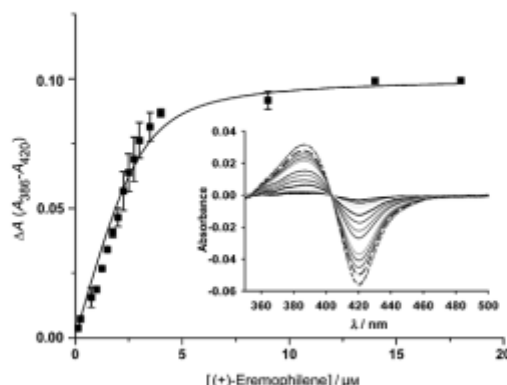


Figure 5. Spectral change of CYP264B1 with various concentrations of (+)-eremophilene; inset: spectral shifts induced by (+)-eremophilene binding to CYP264B1.

observed ( $K_d$  0.40  $\mu\text{M}$ ; Figure 5). Both findings suggest the physiological relevance of **5** as a *geoA* product. During *in vivo* conversion, at least six products were observed in the extraction of **5** (Figure 3D). The most abundant one ( $t_R$  = 15.8 min, Figure 3D) had a monoisotopic mass of 220 Da, which corresponds to a monohydroxylated or epoxidized sesquiterpene with the formula  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$  (Figure 3E). The same product was also observed in an extract of a whole-cell system containing two strains, one harboring the plasmid pAC-MvGo and the other with pETC4oFA (data not shown). We also observed multihydroxylated products  $\text{P}_2$ – $\text{P}_6$  (Figure 3D) during the *in vivo* conversion of **5**. However, because of the low abundance of the products, the precise masses could not be accurately measured. (Figure S8–S12). Although we attempted to purify the monohydroxylated (+)-eremophilene product, we could not obtain it in a sufficient amount because of degradation or derivatization during the purification. Nevertheless, none of the CYP264B1 products were detected in a cell extract of *S. cellulorum* So ce56 (Figure 3F), thus suggesting further conversion or derivatization of the products by this bacterium.

## Conclusion

We have proven the functional role of the gene cluster consisting of *geoA* and CYP264B1 from the myxobacterium *S. cellulorum* So ce56 by structural analysis of its sesquiterpenoid products. The *geoA* TS synthesizes the previously undescribed sesquiterpene (+)-eremophilene (**5**); the sesquiterpene hydroxylase CYP264B1 converts this compound into various products.

To the best of our knowledge, this is the first description of an (+)-eremophilene synthase and its product (**5**), which is the natural substrate of CYP264B1. Although Ghalib et al. reported the presence of **5** in the  $\text{CHCl}_3$  extract of *Cinnamomum iners*, only GC/MS-TOF was employed for the analytical approach and product characterization. As this technique is not suitable for the determination of absolute stereochemistry, an unambiguous identification of **5** was not performed.<sup>[64]</sup> The detec-

tion of **5** as one of the most important sesquiterpenoids in the volatile fraction of the *S. cellulorum* So ce56 extracts proves its importance in myxobacterial metabolism (Figure 3F).

CYP264B1 oxidizes **5** (its physiological substrate) to various products (Figure 3D). The most abundant product has a mass of 220 Da, thus suggesting a monohydroxylated or epoxidized (+)-eremophilene derivative (Figure 3E). It is likely that this molecule is an intermediate in the biosynthesis of multioxidized eremophilanes or other (+)-eremophilene derivatives.

An eudesmane-type sesquiterpene adenoside with antibacterial properties has been isolated from *S. cellulorum* KM1003.<sup>[66]</sup> The fungal multioxidized eremophilene derivative sporogen-AO 1 has been found to have cytotoxic, phytotoxic, and antiviral properties.<sup>[70,71]</sup> Oxidized plant eremophilanes including petasins have been reported to have anti-inflammatory<sup>[72]</sup> and cytotoxic effects.<sup>[73]</sup>

Myxobacteria are known producers of terpenoids.<sup>[74–75]</sup> In the genome of *S. cellulorum* So ce56, a terpene pathway gene cluster is also evident,<sup>[53]</sup> thus probably highlighting a need for the TS product. As myxobacteria are known to form fruiting bodies upon starvation,<sup>[76]</sup> single cells need to communicate in order to facilitate the complex lifestyle,<sup>[77]</sup> and the emission and sensing of such volatile terpenes could be a mechanism of chemical communication. Trace amounts of eremophilene have also been detected in the volatiles extracted from another myxobacterial species, *Chondromyces crocatus*, though its stereochemistry has not been elucidated.<sup>[78]</sup> (–)-Eremophilene (**4**) has been isolated from a multitude of plants.<sup>[63,79–81]</sup> It was also found in extracts of the coral *Plexaurella fusifera*,<sup>[82]</sup> and has been synthesized by different chemical methods.<sup>[64–66]</sup> This work proves the existence of pairs of enantiomers of natural products: the (–)-enantiomer in plants and the (+)-enantiomer one in bacterium. This provides indirect proof of parallel evolution of enantiocomplementary TS enzymes in different species.

## Experimental Section

**Bioinformatic analysis of the gene sequences:** The coding sequence for CYP264B1 (sce8551) was identified previously.<sup>[54,55]</sup> The sequences of the genes in immediate proximity of CYP264B1 were determined by using the BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The open reading frame sce8552 (*geoA*) showed sequence similarities with terpene synthases and was further investigated for the conserved aspartate rich DXXX(D/E) motif and NSE/DTE triad, (N/D)DXX(S/T)XX(K/R)(D/E).

**Molecular cloning:** For the genes *geoA* and CYP264B1, *E. coli* expression vectors (pET-*geoA* and pET22b-CYP264B1) and vectors for *E. coli* based whole-cell conversion systems (pAC-MvGo, pET-C4oFA) were constructed. *geoA* was amplified PCR from genomic DNA of *S. cellulorum* So ce56 by using forward primer 5'-cca atc ata tgt cat ctg atc gaa cta gcg-3' (NdeI restriction site in italics) and reverse primer 5'-cca ata agc ttg cag tga tgg tga tgg tga tgt cca gcg cgc acg atc a-3' (HindIII site in italics). The purified PCR product was inserted into pET-17b (Invitrogen) at NdeI and HindIII sites to create pET-*geoA*. For the construction of vector pAC-MvGo, a sequence-optimized *geoA* gene flanked by restriction sites SpeI and HindIII (Life Technologies) was synthesized and cloned at the same restriction sites into the pAC-Mv vector,<sup>[83,84]</sup> which was generously

provided by Prof. Dr. Norihiko Misawa (Ishikawa Prefectural University, Ishikawa, Japan). The CYP264B1 expression vector pET22b\_CYP264B1 was obtained by cloning the sequence-optimized CYP264B1 gene flanked by restriction sites NdeI and HindIII (Life Technologies) at the same restriction sites into pET-22b (Invitrogen). The vector pETC4oFA was constructed from three fragments: NdeI/HindIII-flanked CYP264B1, EcoRI/HindIII-digested pET\_MR8<sup>[57]</sup> and NdeI/EcoRI-digested pET-17b.

**Expression and purification of the *geoA* and CYP264B1 gene products:** A single colony of *E. coli* BL21(DE3) or C43(DE3) cells co-transformed with pET\_*geoA* and Gro12\_groES-groEL<sup>[60]</sup> or pET22b\_CYP264B1 was grown overnight in Nutrient Broth I (Sifin Diagnostics) containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) and kanamycin (50 µg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C with shaking. Terrific Broth medium (250 mL) containing these antibiotics in a 2 L Erlenmeyer flask was inoculated with overnight culture (2.5 mL) and grown under the same conditions until the absorbance (*A*<sub>600</sub>) reached 0.6–1.0. Expression of proteins was induced with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; 1 mM); for the expression of CYP264B1, 5-aminolevulinic acid (0.5 mM) was added to support heme synthesis. The cultures were left for 48 h at 28 °C with shaking (100 rpm). CYP264B1 was purified as described before.<sup>[55]</sup> For the purification of *geoA*, cells were harvested by centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) and then resuspended in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7) containing NaCl (500 mM), imidazole (2.5 mM), mercaptoethanol (10 mM), glycerol (10%, v/v), and Tween 20 (1%, v/v), then lysed on ice with lysozyme (750 µg mL<sup>-1</sup>, 1 h). The cell suspension was centrifuged (12 000 g, 20 min, 4 °C), and the supernatant (containing the TS) was loaded on TALON resin (Clontech). The TS was purified according to the manufacturer's instructions. Purity of the fractions was assessed by SDS-PAGE. The pure fractions were pooled and loaded on PD-10 columns (GE Healthcare) for buffer exchange (HEPES buffer (500 µL, 50 mM, pH 7.5) containing dithiothreitol (2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), KCl (10 mM), and glycerol (10%, v/v)). The TS was used immediately after purification. CYP264B1 was stored at –20 °C until further use.

**Determination of the cytochrome P450 concentration:** The concentration of cytochrome P450 was determined at room temperature in a UV2100PC double-beam spectrophotometer (Shimadzu Kyoto, Japan), based on the reduced CO-difference spectra method.<sup>[62]</sup> The enzyme in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) with glycerol (20%) was reduced with a few grains of sodium dithionite and divided into two cuvettes. The baseline was recorded between 400 and 500 nm. The sample cuvette was bubbled gently with carbon monoxide for 1 min, and a spectrum was recorded. The concentration of functional CYP264B1 was estimated by using  $\epsilon_{420-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>[63]</sup>

**In vitro TS activity assay:** The terpene cyclase assay was conducted in HEPES buffer (500 µL, 50 mM, pH 7.5) containing dithiothreitol (2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), KCl (10 mM), and glycerol (10%, v/v) with the purified *geoA* gene product and FPP (10–30 µM). The assay was overlaid with *n*-hexane (500 µL) to trap the volatile terpenes and incubated for 1 h at 30 °C; the enzymatic reaction was stopped on ice. After incubation, the assay mixture was mixed vigorously, centrifuged (14 000 g, 1 min), and the hexane phase was removed. The sample was extracted a second time, and the combined hexane phases were concentrated (200 µL) under a stream of N<sub>2</sub> and analyzed by GC/MS.

***E. coli* whole-cell conversion of mevalonolactone to (+)-eremophilene (5):** A single colony of *E. coli* C43(DE3) cells transformed with pAC-MvGo (or pAC-Mv for the negative control) was grown

overnight in Nutrient Broth I containing chloramphenicol (30 µg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C with shaking (100 rpm). Terrific Broth medium (100 mL) containing chloramphenicol (30 µg mL<sup>-1</sup>) in a 1 L baffled flask was inoculated with overnight culture (1 mL), and cells were grown under the same conditions until *A*<sub>600</sub> reached 0.6–1.0. Expression was induced with IPTG (1 mM), mevalonolactone (500 µM) was added, and the flask was closed tightly. The cultures were left for 24 h at 30 °C with shaking (100 rpm). Conversion was stopped by cooling the flask on ice, and the products were extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. An aliquot (2 mL) of the organic phase was concentrated (200 µL) under a stream of N<sub>2</sub> and analyzed by GC/MS. The whole-cell conversion extracts were kept at –20 °C until purification.

**Spin-state shift and (+)-eremophilene binding:** The spin-state shift upon (+)-eremophilene binding was assayed at room temperature under aerobic conditions in an UV-2101PC UV-Vis scanning photometer (Shimadzu) equipped with two tandem cuvettes containing CYP264B1 (1 µM) as previously described.<sup>[60]</sup> The dissociation constant (*K*<sub>d</sub>) of (+)-eremophilene for CYP264B1 was calculated with SigmaPlot 9.0 (Systat Software, San Jose, CA) by fitting the peak-to-trough difference against the substrate concentration to the non-linear tight-binding quadratic Equation (1):

$$\Delta A = (A_{\text{max}}/2[E]) \{ (K_d + [E] + [S]) - \{ (K_d + [E] + [S])^2 - 4[E][S] \}^{1/2} \}$$

where  $\Delta A$  is the observed peak-to-trough absorbance difference at each substrate addition, *A*<sub>max</sub> is the maximum absorbance difference at substrate saturation, [E] is the total concentration of CYP264B1, and [S] is the (+)-eremophilene concentration.

***E. coli* whole-cell conversion of (+)-eremophilene (5) to oxidized eremophiles:** A single colony of *E. coli* C43(DE3) cells transformed with pETC4oFA was grown overnight in Nutrient Broth I containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C with shaking (100 rpm). Terrific Broth medium (100 mL) containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) in a 1 L baffled flask was inoculated with 1 mL of the overnight culture, and cells were grown under the same conditions until *A*<sub>600</sub> reached 0.6–1.0. Expression was induced with IPTG (1 mM), and 5-aminolevulinic acid (0.5 mM) was added. After 24 h at 30 °C with shaking (100 rpm) the cells were harvested by centrifugation (4000 g) and resuspended in potassium phosphate buffer (100 mL, 50 mM, pH 7.4) containing glycerol (4%, v/v). (+)-Eremophilene (5, 200 µM), IPTG (1 mM), and 5-aminolevulinic acid (0.5 mM) were added, and the conversion was carried out for another 24 h at 30 °C with shaking (100 rpm) in a sealed baffled flask. The reaction was stopped by cooling the flask on ice, and the products were extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. An aliquot (2 mL) of the organic phase was concentrated (200 µL) under a stream of N<sub>2</sub> and analyzed by GC/MS. The whole-cell conversion extracts were kept at –20 °C until purification.

**GC/MS analysis of the *S. cellulosum* So ce56 volatiles:** *S. cellulosum* So ce56 was grown in liquid MD 1 medium as described before.<sup>[73]</sup> The cultures were connected to a closed-loop stripping apparatus, the volatiles were collected for 24 h, and then analyzed by GC/MS, according to the method of Fuhlendorff et al.<sup>[76]</sup>

**GC/MS analysis of the produced terpenoids:** Each sample was analyzed in a Focus GC/DSQ II GC/MS spectrometer (Thermo Scientific) equipped with an HP-5 capillary column (25 m × 0.32 mm i.d., 0.52 µm film; Agilent Technologies) with the following conditions: inlet pressure, 50 kPa; column flow, 10 mL min<sup>-1</sup>; injection volume, 1 µL; transfer line, 280 °C; electron energy, 70.5 eV. The tempera-

ture gradient was 50 °C for 1 min, increasing (10 °C min<sup>-1</sup>) to 310 °C, and holding at 310 °C for 5 min (operated in splitless mode). The carrier gas was He (1 mL min<sup>-1</sup>). Mass spectra were recorded over *m/z* 35–350.

**Product purification and characterization:** Products for purification were obtained from *in vivo* conversions in a total reaction volume of 1.9 L. (+)-Eremophilene (**5**) was purified on silica gel with an isocratic eluent mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (99:1). The fractions containing the product were identified by TLC in a solvent tank containing the same eluent and stained with anisaldehyde. The obtained product (12 mg) was used for NMR characterization. The NMR spectra of the product were recorded in CDCl<sub>3</sub> with a DRX 500 NMR spectrometer (Bruker). All chemical shifts ( $\delta$  in ppm) are relative to CHCl<sub>3</sub> at  $\delta$  = 7.24 (<sup>1</sup>H NMR) or CDCl<sub>3</sub> at  $\delta$  = 77.00 ppm (<sup>13</sup>C NMR). The 2D NMR spectra were recorded as gradient-selected (gs-) HH-COSY, gs-NOESY, gs-HSQC, and gs-HMBC. The optical rotation of **5** was analyzed on a model 241 Polarimeter (PerkinElmer) with (+)-valencene (**1a**) as the standard.

**X-ray diffraction of 5:** Crystals suitable for single-crystal X-ray analysis were obtained at –20 °C. The data were collected at –140 °C on an AXS X8 Apex CCD diffractometer (Bruker) with graphite-monochromatized Cu K $\alpha$  radiation. Frames of 0.5° oscillation were exposed, thus deriving data in a  $\theta$  range of 2–63.4° (completeness ~98%). Unit cell: orthorhombic, *P*2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *a* = 6.0493(4), *b* = 7.7094(4), *c* = 27.274(2) Å, 1271.96(13) Å<sup>3</sup>. Structure solution and full least-squares refinement with anisotropic thermal parameters of all non-hydrogen atoms and free refinement of the hydrogen were performed in SHELXL<sup>[32]</sup>. The final refinement resulted in *R*<sub>1</sub> = 0.027. The absolute structure could not be determined reliably. CCDC 1009046 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif)

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R.B. (Be1343/23–1), and from the DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) as well as from the Vietnam National Foundation for Science and Technology Development (NAFOSTED) under grant number 106-NN.02–2013.57 to T.T.B.L. The authors are very grateful to Prof. Dr. Norihiko Misawa for providing the plasmid pAC-Mv, to Prof. Dr. Rolf Müller for providing the *S. cellulorum* So ce56 extract, to Dr. Volker Huch for help with the X-ray diffraction analysis, to Reiner Wintringer for help with GC/MS measurements, to Prof. Dr. Andreas Speicher for help with the polarimetric measurements and to Dr. Michael Ringle and Dipl. Chem. Maël Charpentier for helpful advice.

**Keywords:** cytochromes • eremophilenes • hydroxylation • *Sorangium cellulosum* So ce56 • terpenes

- [1] Y. Gao, R. B. Honzatko, R. J. Peters, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1153–1175.
- [2] E. Oldfield, F.-Y. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1124–1137; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1150–1163.
- [3] D. J. Miller, R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 60–71.
- [4] D. E. Cane, H. Ikeda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 463–472.
- [5] Y. Yamada, D. E. Cane, H. Ikeda in *Methods in Enzymology*, Vol. 515: *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part A* (Ed.: D. Hopwood), Academic Press, San Diego, **2012**, pp. 123–162.

- [6] R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128–145.
- [7] J. Kirby, J. D. Keadling, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2009**, *60*, 335–355.
- [8] F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, R. Bernhardt, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 330–344.
- [9] R. Bernhardt, M. R. Waterman in *Metal Ions in Life Sciences* Vol. 3: *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Wiley, New York, **2007**, pp. 361–396.
- [10] R. Bernhardt, V. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6185–6203.
- [11] A. Aharoni, A. P. Giri, F. W. A. Verstappen, C. M. Berteau, R. Sevenier, Z. Sun, M. A. Jongsma, W. Schwab, H. J. Bouwmeester, *Plant Cell* **2004**, *16*, 3110–3131.
- [12] D. P. Drew, B. Dueholm, C. Weitzel, Y. Zhang, C. W. Sensen, H. T. Simonson, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9080–9098.
- [13] B. Hamberger, D. Hall, M. Yuen, C. Oddy, B. Hamberger, C. Keeling, C. I. Ritland, K. Ritland, J. Bohlmann, *BMC Plant Biol.* **2009**, *9*, 106.
- [14] B. Hamberger, T. Ohnishi, B. Hamberger, A. Séguin, J. Bohlmann, *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 1677–1695.
- [15] H.-C. Lo, R. Entwistle, C.-J. Guo, M. Ahuja, E. Szewczyk, J.-H. Hung, Y.-M. Chiang, B. R. Oakley, C. C. C. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4709–4720.
- [16] B. Zhao, L. Lei, D. G. Vassilyev, X. Lin, D. E. Cane, S. L. Kelly, H. Yuan, D. C. Lamb, M. R. Waterman, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36711–36719.
- [17] B. Zhao, M. R. Waterman, *J. Nat. Prod.* **2011**, *63*, 473–477.
- [18] S. Takamatsu, X. Lin, A. Nara, M. Komatsu, D. E. Cane, H. Ikeda, *J. Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 184–191.
- [19] S. C. Moody, B. Zhao, L. Lei, D. R. Nelson, J. G. L. Mullins, M. R. Waterman, S. L. Kelly, D. C. Lamb, *FEBS J.* **2012**, *279*, 1640–1649.
- [20] R. Quaderer, S. Omura, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13036–13037.
- [21] J. Gershenzon, N. Dudareva, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 408–414.
- [22] R. Kramer, W.-R. Abraham, *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 15–37.
- [23] S. Schulz, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 814–842.
- [24] J. Zhou, G. Du, J. Chen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *25*, 17–23.
- [25] M. A. Fraatz, R. G. Berger, H. Zorn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 35–41.
- [26] H. Zorn, M. A. Fraatz, S. J. L. Riemer, M. Takenberg, U. Krings, R. G. Berger, S. Marx, K. Zelena, WO 2011/147453 A1, **2011**.
- [27] C. Gavira, R. Höfer, A. Lesot, F. Lambert, J. Zucca, D. Werck-Reichhart, *Metab. Eng.* **2013**, *18*, 25–35.
- [28] D. Belsito, D. Bickers, M. Bruze, P. Calow, H. Greim, J. M. Hanifin, A. E. Rogers, J. H. Saurat, I. G. Sipes, H. Tagami, *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, S1–S71.
- [29] R. J. Sowden, S. Yasmin, N. H. Rees, S. G. Bell, L.-L. Wong, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 57–64.
- [30] M. Girhard, K. Machida, M. Itoh, R. Schmid, A. Arisawa, V. Urlacher, *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 36.
- [31] L. S. Bachegowda, D. F. Makower, J. A. Sparano, *Anticancer Drugs* **2014**, *19*, 19.
- [32] B. Orlikova, N. Legrand, J. Panning, M. Dicato, M. Diederich in *Cancer Treatment and Research*, Vol. 159: *Advances in Nutrition and Cancer* (Eds.: V. Zappia, S. Panico, G. L. Russo, A. Budillon, F. Della Ragione), Springer, Berlin, **2014**, pp. 123–143.
- [33] K. Brukvoort, C. Goodman, S. P. Kachur, D. Schellenberg, *PLoS One* **2014**, *9*, e84555.
- [34] S. Bleif, F. Hannemann, M. Lisurek, J. P. von Kries, J. Zapp, M. Dietzen, I. Antes, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 576–582.
- [35] S. Bleif, F. Hannemann, J. Zapp, D. Hartmann, J. Jauch, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1135–1146.
- [36] S. Janocha, J. Zapp, M. Hutter, M. Kleser, J. Bohlmann, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 467–473.
- [37] F. Hannemann, C. Virus, R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 172–181.
- [38] D. Zehentgruber, F. Hannemann, S. Bleif, R. Bernhardt, S. Lütz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 713–721.
- [39] S. Janocha, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7639–7649.
- [40] D. Schmitz, J. Zapp, R. Bernhardt, *FEBS J.* **2012**, *279*, 1663–1674.
- [41] M. Farhi, E. Marheva, J. Ben-Ari, A. Algamias-Dimantov, Z. Liang, V. Zeevi, O. Edelbaum, B. Spitzer-Rimon, H. Abellavich, B. Schwartz, T. Tzfira, A. Vainstein, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1072–1074.
- [42] M. J. Dark, *Infect. Drug Resist.* **2013**, *6*, 115–123.

- [43] Y. Khatri, F. Hannemann, O. Perlova, R. Müller, R. Bernhardt, *FEBS Lett.* **2011**, 585, 1506–1513.
- [44] M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 7422–7427.
- [45] C.-M. Wang, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8908–8909.
- [46] B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1541–1546.
- [47] D. E. Cane, R. M. Watt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1547–1551.
- [48] B. Zhao, X. Lin, L. Lei, D. C. Lamb, S. L. Kelly, M. R. Waterman, D. E. Cane, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 8183–8189.
- [49] R. Riclea, C. A. Citron, J. Rinkel, J. S. Dickschat, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 4228–4230.
- [50] P. Baer, P. Rabe, K. Fischer, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, M. Groll, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 7652–7656; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 7783–7787.
- [51] F. W. McLafferty, *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 7<sup>th</sup> Edition, Wiley, New York, **2005**.
- [52] Terpenoids Library [http://massfinder.com/wiki/Terpenoids\\_Library](http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library).
- [53] S. Schneider, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, H. B. Bode, C. J. Bolten, J. V. Choudhuri, S. Doss, Y. A. Elnakady, B. Frank, L. Gaigalat, A. Goemann, C. Groeger, F. Gross, et al., *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 1281–1289.
- [54] Y. Khatri, F. Hannemann, K. M. Ewen, D. Pistorius, O. Perlova, N. Kagawa, A. O. Brachmann, R. Müller, R. Bernhardt, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 1295–1305.
- [55] T. T. B. Ly, Y. Khatri, J. Zapp, M. Hutter, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 95, 123–133.
- [56] A. Grote, K. Hiller, M. Scheer, R. Münch, B. Nörtemann, D. C. Hempel, D. Jahn, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, W526–W531.
- [57] M. Ringle, Y. Khatri, J. Zapp, F. Hannemann, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 7741–7754.
- [58] J. Křepinský, O. Motl, L. Dolejš, L. Novotný, V. Herout, R. B. Bates, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 3315–3318.
- [59] G. L. K. Hunter, W. B. Brogden, Jr., *J. Food Sci.* **1965**, 30, 1–4.
- [60] I. M. Whitehead, D. R. Threlfall, D. F. Ewing, *Phytochemistry* **1989**, 28, 775–779.
- [61] Y. Zhao, D. J. Schenk, S. Takahashi, J. Chappell, R. M. Coates, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7428–7435.
- [62] T. R. Govindachari, P. A. Mohamed, P. C. Parthasarathy, *Tetrahedron* **1970**, 26, 615–619.
- [63] J. Hochmannová, V. Herout, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2369–2376.
- [64] E. Piers, R. J. Keziere, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 583–586.
- [65] E. Piers, R. J. Keziere, *Canadian J. Chem.* **1969**, 47, 137–144.
- [66] F. Näf, R. Decorzant, W. Thommen, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 2212–2223.
- [67] D. Joulain, W. A. König, *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, E.B. Verlag, Hamburg, **1998**.
- [68] R. M. Ghalib, R. Hashim, O. Sulaiman, S. H. Mehdi, Z. Anis, S. Z. Rahman, B. M. K. Ahamed, A. M. S. Abdul Majid, *Nat. Prod. Res.* **2011**, 26, 2155–2158.
- [69] J.-W. Ahn, K. H. Jang, S.-C. Chung, K.-B. Oh, J. Shin, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1167–1169.
- [70] S. Tanaka, K. Wada, S. Marumo, H. Hattori, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5907–5910.
- [71] G. Schneider, H. Anke, O. Sterner, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, 10, 133–138.
- [72] B. L. Fiebig, M. Grozdeva, S. Hess, M. Hüll, U. Danesch, A. Bodensieck, R. Bauer, *Planta Med.* **2005**, 71, 12–19.
- [73] R. T. Gallagher, J. Wei-Dong, J. Zhi-Dong, WO 199800121 A1, **1998**.
- [74] W. Lorenzen, M. W. Ring, G. Schwär, H. B. Bode, *J. Bacteriol.* **2009**, 191, 5849–5853.
- [75] J. S. Dickschat, T. Nawrath, V. Thiel, B. Kunze, R. Müller, S. Schulz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8287–8290; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8436–8439.
- [76] S. Huntley, N. Hamann, S. Wegener-Feldbrügge, A. Treuner-Lange, M. Kube, R. Reinhardt, S. Klages, R. Müller, C. M. Ronning, W. C. Nierman, L. Søgaard-Andersen, *Mol. Biol. Evol.* **2011**, 28, 1083–1097.
- [77] D. Kaiser, *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, 1, 663–668.
- [78] S. Schulz, J. Fuhlendorff, H. Reichenbach, *Tetrahedron* **2004**, 60, 3863–3872.
- [79] J. C. Chalchat, J. L. Chabard, M. S. Gorunovic, V. Djermanovic, V. Bulatovic, *J. Essent. Oil Res.* **1995**, 7, 147–152.
- [80] W. S. Schlotzhauer, R. J. Horvat, O. T. Chortyk, S. F. Nottingham, D. M. Jackson, *J. Essent. Oil Res.* **1995**, 7, 265–269.
- [81] M. Tori, A. Watanabe, S. Matsuo, Y. Okamoto, K. Tachikawa, S. Takaoka, X. Gong, C. Kuroda, R. Hanai, *Tetrahedron* **2008**, 64, 4486–4495.
- [82] J. Frenz-Ross, J. Enticknap, R. G. Kerr, *Mar. Biotechnol.* **2008**, 10, 572–578.
- [83] H. Harada, K. Shindo, K. Iki, A. Teraoka, S. Okamoto, F. Yu, J.-i. Hattan, R. Utsumi, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 90, 467–476.
- [84] H. Harada, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 84, 1021–1031.
- [85] T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2379–2385.
- [86] Y. Khatri, F. Hannemann, M. Girhard, R. Kappl, M. Hutter, V. B. Urlacher, R. Bernhardt, *FEBS J.* **2014**; DOI: 10.1111/febs.13104.
- [87] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, 64, 112–122.
- [88] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 1694–1699.

Received: August 6, 2014

Published online on ■■■ ■■. 0000

### **3.2 „New Sesquiterpene Oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56”**

A. Schiffrin, M. Litzenburger, M. Ringle, R. Bernhardt,  
im Original erschienen in *ChemBioChem*, 2015, 16, 337-344.

Die in diesem Artikel zusammengefassten Arbeiten beschäftigen sich mit der möglichen Anwendung der (+)-Eremophilenoxidase CYP264B1 zur selektiven Hydroxylierung von Sesquiterpenen verschiedener Strukturklassen. Das Enzym erwies sich als selektive allylische Hydroxylase von Eremophilanen, Humulanen, Caryophyllanen und Cedranen. Zum Vergleich wurde ihm CYP260A1, ein weiteres Cytochrom P450 (P450) aus *S. cellulosum* So ce56, gegenüber gestellt. CYP260A1 setzt oxidierte Sesquiterpene zwar effizienter, jedoch weniger selektiv um als CYP264B1. Die Arbeit zeigt das Potential von neuen bakteriellen P450s zur selektiven Funktionalisierung volatiler Kohlenwasserstoffe auf.



## New Sesquiterpene Oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* Soce56

Alexander Schiffrin,<sup>[a]</sup> Martin Litzenburger,<sup>[a]</sup> Michael Ringle,<sup>[a]</sup> Thuy T. B. Ly,<sup>[a, b]</sup> and Rita Bernhardt<sup>\*[a]</sup>

Sesquiterpenes are natural products derived from the common precursor farnesyl pyrophosphate (FPP) but are highly diverse in structure and function. Cytochrome P450 enzymes (P450s) exhibit the unique ability to introduce molecular oxygen into non-activated C–H bonds. In plant biosynthetic pathways, P450s commonly derivatize sesquiterpene hydrocarbons. However, the potential of bacterial P450s for terpene derivatization is still underinvestigated. This work compares the substrate specificities and regioselectivities of the sesquiterpene hydrox-

ylases CYP260A1 and CYP264B1 from myxobacterium *Sorangium cellulosum* Soce56. Four tested substrate classes (eremophilanes, humulanes, caryophyllanes, and cedranes) were converted by both P450s. The achievable variety of oxidations is demonstrated on the model substrates (+)-nootkatone and zerumbone. Increasing the number of functionally investigated P450s, this study represents a step towards the selective derivatization of sesquiterpenes.

### Introduction

Sesquiterpenes are a group of natural products biosynthesized either through the mevalonate pathway or the methylerythritol pathway.<sup>[1]</sup> Although all sesquiterpenes contain 15 carbon atoms (C<sub>15</sub>) and derive from the common precursor farnesyl pyrophosphate (FPP) through bioconversion catalyzed by terpene synthases (TPSs),<sup>[2]</sup> they display highly diverse branched, mono-, bi-, and tricyclic hydrocarbon skeletons.<sup>[3]</sup> Physiological derivatization is conducted by other enzymes, most often cytochromes P450 (P450s),<sup>[4]</sup> so that 89.5 % of all known sesquiterpenes are derivatized.<sup>[5]</sup> P450s are external monooxygenases. They selectively introduce molecular oxygen into non-activated C–H bonds, and this makes them very powerful for applications in synthesis as a complement to chemical methods.<sup>[6]</sup>

Lightly derivatized sesquiterpenes are volatile and serve for plants as a means of chemical communication either for defense or for attraction of pollinators.<sup>[7]</sup> Mankind has discovered plant sesquiterpenoids as highly valuable flavors and fragrances,<sup>[8]</sup> and multiply oxidized derivatives as antitumor<sup>[9]</sup> or anti-malaria agents.<sup>[10]</sup>

Recently, bacterial sesquiterpenes have been studied more intensely,<sup>[11–12]</sup> their physiological functions remain a topic of discussion.<sup>[12]</sup> Nevertheless, bacterial sesquiterpene biosynthe-

sis pathways have been identified as analogous to those in plants, including conversion of FPP by TPSs and derivatization of the hydrocarbons by P450s.<sup>[11,12]</sup> In a similar way, smaller monoterpenes (C<sub>10</sub>) and bigger di- (C<sub>20</sub>) and triterpenes (C<sub>30</sub>) are synthesized.<sup>[11]</sup>

Obtaining valuable terpene intermediates is an important challenge, because they often do not accumulate in the host organisms. Chemical synthesis is also often inefficient or unselective. An increasing knowledge of biosynthesis pathways has thus led to the evolution of synthetic biology as a tool for the production of valuable terpene compounds.<sup>[14]</sup> Crucial steps in the synthesis of oxidized sesquiterpenes are catalyzed by P450s.<sup>[15]</sup> Consequently, whole-cell biocatalysts are designed for efficient P450-mediated derivatization of sesquiterpenes. The hydrocarbon precursors or low-priced mevalonate pathway intermediates are used as substrates.<sup>[15–16]</sup> P450s of microbial origin have shown to perform commercially interesting terpene oxidations.<sup>[17]</sup> For biosynthetic purposes they could represent an efficient alternative to plant P450s, because they show generally high expression rates in *Escherichia coli*, and their combinations with electron-transfer proteins are readily available as bacterial whole-cell catalysts.<sup>[17]</sup>

Previously, we have identified the CYP106 family from *Bacillus megaterium* as di- and triterpene hydroxylases.<sup>[18–20]</sup> We have also revealed the biosynthetic potential of CYP105A1 from *Streptomyces griseolus*. It mediates the direct conversion of the diterpene resin abietic acid to its 15-hydroxy derivative, a key precursor of 15-hydroperoxyabietic acid, thus allowing a nine-step chemical synthesis to be avoided.<sup>[21]</sup>

Because bacterial P450s are able to perform these reactions, we have previously established P450-based *E. coli* whole-cell catalysts for in vivo terpene oxidations,<sup>[22–24]</sup> and have optimized the electron transfer onto bacterial P450s.<sup>[25]</sup> Seeking for

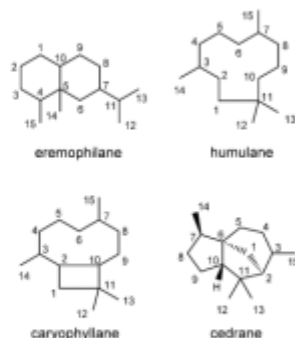
[a] A. Schiffrin, M. Litzenburger, Dr. M. Ringle, Dr. T. T. B. Ly, Prof. Dr. R. Bernhardt  
Universität des Saarlandes, Biochemie  
Campus B2.2, 66123 Saarbrücken (Germany)  
E-mail: ritabern@mx.uni-saarland.de

[b] Dr. T. T. B. Ly  
Institute of Biotechnology  
Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)  
18-Hoang Quoc Viet, Hanoi (Vietnam)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201500417>.

new versatile sesquiterpene-derivatizing P450s, we turned to the myxobacterial strain *Sorangium cellulosum* So ce56. It is commonly found in upper soil fractions close to plant roots and possesses one of the largest bacterial genomes (13.1 Mbp), including 21 functional P450 genes with great potential for biosynthetic applications.<sup>[26]</sup>

Among them we found two sesquiterpene-converting enzymes: CYP260A1 oxidizes the grapefruit flavor (+)-nootkatone,<sup>[29]</sup> whereas CYP264B1 is a native (+)-eremophilene hydroxylase,<sup>[27]</sup> which was also shown to convert other sesquiterpenes of different parent structures.<sup>[30]</sup> While further exploiting the sesquiterpene derivatization potential of these P450s, we treated them with a broad range of sesquiterpenes for conversion. The current work reveals CYP260A1 and CYP264B1 to be versatile sesquiterpene oxidases, and compares their substrate specificities and selectivities. As substrates we chose monocyclic humulanes and their bicyclic caryophyllane derivatives, bicyclic eremophilanes, and tricyclic cedranes (Scheme 1). It was demonstrated that CYP260A1 efficiently converts oxygenated sesquiterpenes and that CYP264B1 regioselectively introduces allylic alcohol functions.



**Scheme 1.** Hydrocarbon skeletons of the sesquiterpenes tested for CYP260A1- and CYP264B1-mediated derivatization.

## Results and Discussion

For conversions of a broad range of sesquiterpene substrates, the (+)-nootkatone oxidase CYP260A1<sup>[29]</sup> and the native (+)-eremophilene hydroxylase CYP264B1<sup>[27]</sup> were selected from a range of 21 functional *S. cellulosum* So ce56 cytochromes P450.<sup>[26]</sup> The readily available *E. coli*-based P450 whole-cell catalysts allow cost-efficient conversions on a milligram scale for structural analysis of the major products by NMR spectroscopy, in addition to GC/MS.<sup>[25,27,31]</sup>

Four structural classes of sesquiterpene substrates (Scheme 1) were chosen for conversion tests with CYP260A1 and CYP264B1. Pairs of substrates were used from the classes of eremophilanes, humulanes, and cedranes. The eremophilanes (+)-nootkatone (Scheme 2, 1) and (+)-valencene (4), as well as the humulanes zerumbone (6) and  $\alpha$ -humulene (12), represent pairs of hydrocarbons and their corresponding ke-

tones. The cedranes (+)-3(15)-cedren-4-ol (16) and  $\alpha$ -cedrene (21) differ in the hydroxy function at C-4 and in the position of a double bond: between carbon atoms 3 and 4 or 3 and 15, respectively.  $\beta$ -Caryophyllene (14) is related to 12; however, it is less flexible due to the additional intramolecular bond between C-2 and C-10, which forms a strained cyclobutane ring.

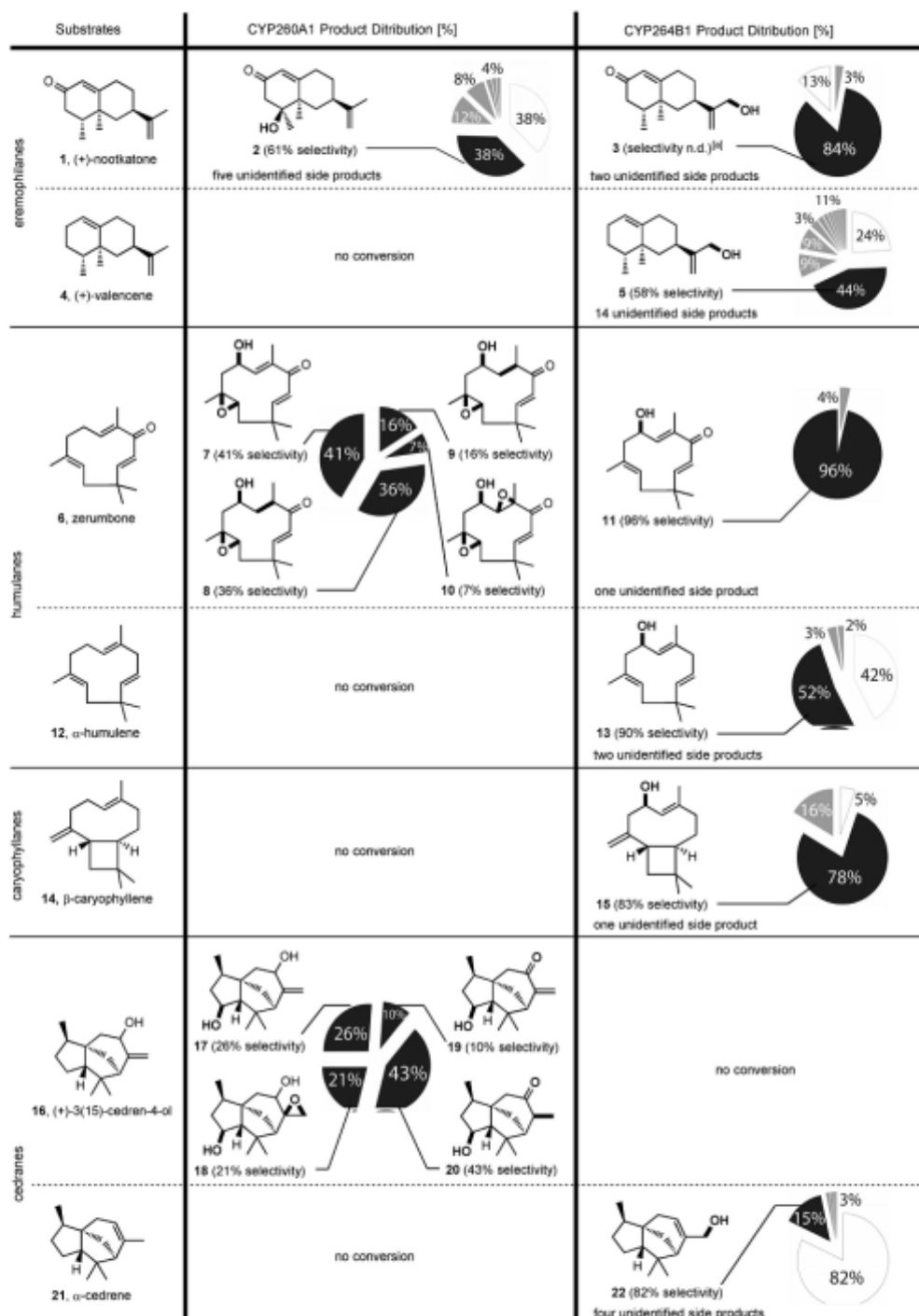
### CYP260A1-dependent conversion of sesquiterpenes

CYP260A1 converts the sesquiterpene ketones (+)-nootkatone (Scheme 2, 1) and zerumbone (6), as well as the allylic sesquiterpene alcohol (+)-3(15)-cedren-4-ol (16). Whereas 1 is 62% consumed, the other two substrates are converted completely under the experimental conditions (Scheme 2, column 2). The tested non-oxidized hydrocarbon sesquiterpenes (compounds 4, 12, 14, and 21) are not converted by this P450.

The extract from the whole-cell conversion of 1 by CYP260A1 contains six products. Its main product was determined to be 4-hydroxynootkatone (2, 61% selectivity; Scheme 2, line 1). Addition of (+)-valencene (4) to the whole-cell catalyst gave no conversion. The humulane-type zerumbone (6) was converted quantitatively into four different products. Each of these oxidation products bears a hydroxy function at the C-5 atom and an epoxide group between the atoms C-2 and C-3 (compounds 7–10; Scheme 2, line 3). Two of the products, 8 and 9, are isomers, with a saturated bond between C-6 and C-7. In the fourth product, compound 10, this initial double bond is epoxidized. The hydrocarbon  $\alpha$ -humulene (12) and the related  $\beta$ -caryophyllene (14) are not oxidized by CYP260A1. From the group of cedrane-type sesquiterpenes, CYP260A1 oxidized (+)-3(15)-cedren-4-ol (16) to four products, all hydroxylated at position 9 (compounds 17–20; Scheme 2, line 6). Additionally, the conversion of 16 by CYP260A1 affected the double bond between C-3 and C-15, which was either epoxidized in compound 18 or reduced in compound 20. The allylic alcohol function of 16 at C-4 can be oxidized to a ketone, in compounds 19 and 20.

Overall, CYP260A1 catalyzes sesquiterpene conversion for eremophilane-, humulane-, and cedrane-type structures, into a multitude of products in each case. The presence of oxy functions seems to be imperative, because non-derivatized hydrocarbon sesquiterpenes 4, 12, 14, and 21 are not oxidized. Under the defined reaction conditions, the substrates are efficiently converted and often oxidized at different positions (compounds 7–10 and 17–20). The selectivities are rather low, with 61% selectivity for the oxidation of 1 to 2 being the high-

**Scheme 2.** Overview of the sesquiterpene conversions mediated by CYP260A1 and CYP264B1: structures of the tested sesquiterpene substrates (including names) and the determined products (including selectivities). The product structures were determined by NMR and confirmed by GC/MS. Functionalizations introduced by the P450s are represented in bold. The yields and selectivities were calculated on the basis of GC/MS and HPLC UV/Vis peak areas. Pie charts for the degrees of substrate conversion include substrates (white), structurally determined main products (black), and undetermined side products (gray). n.d.: not determined. [a] The substances 3 and another (+)-nootkatone product could not be completely separated by GC/MS: 84% refers to the sum of both products.



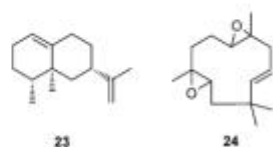
est (Scheme 2, column 2). However, it has to be taken into account that the reaction conditions have not been optimized to obtain higher selectivities.

The introduced oxy functions in the humulanes **7–10** and the cedranes **17–20** are situated at considerable distances from each other. Thus, several binding modes for the substrates and intermediate products seem to be possible. This is also the case for **1**, because four out of its six products are monohydroxylated (results not shown). The conversion of **6** is likely to begin either with hydroxylation at C-5 (compounds **7–10**) or with the epoxidation of the C-2=C-3 double bond (also compounds **7–10**). It is likely to be completed with saturation of the C-6=C-7 double bond (compounds **8** and **9**) through the epoxide intermediate **10**. Compound **16** is first hydroxylated at C-9 (compounds **17–20**); further reaction steps involving oxidation of the 4-hydroxy group (compounds **19** and **20**) as well as epoxidation and reduction of the C-3=C-15 double bond (compounds **18** and **20**) do not seem to be conducted in a defined order.

#### CYP264B1-dependent conversion of sesquiterpenes

In contrast to the experiments with CYP260A1, each of the tested sesquiterpenes was converted by CYP264B1, with the exception of (+)-3(15)-cedren-4-ol (Scheme 2, **16**). All of the determined products—compounds **3**, **5**, **11**, **13**, **15**, and **22**—contain allylic hydroxy groups.

CYP264B1, a native (+)-eremophilene hydroxylase, oxidized (+)-nootkatone (**1**) and its non-oxygenated precursor (+)-valencene (**4**), the C-7 epimer of (+)-eremophilene (Scheme 3,



**Scheme 3.** Sesquiterpene derivatives of the tested substrates. (+)-Eremophilene (**23**) is the native substrate of CYP264B1,<sup>[25]</sup> (9E)-humulene-2,3,6,7-diepoxide (**24**) has been shown to have anti-acetylcholinesterase activity.<sup>[26]</sup>

**23**). In vivo conversions of **1** produced mainly 13-hydroxynootkatone (**3**) along with two side products (Scheme 2, line 1). Compound **4** was oxidized to 15 different products, with 13-hydroxyvalencene (**5**) as the main product (58% selectivity, Scheme 2, line 2). Both of the humulane-type substrates zembone (**6**) and  $\alpha$ -humulene (**12**) were hydroxylated at position C-5 with selectivities of 96 and 90%, respectively (Scheme 2, lines 3 and 4). The humulane-related  $\beta$ -caryophyllene (**14**) was also selectively converted into its 5-hydroxy derivative **15** (83% selectivity, Scheme 2, line 5). Relative to those of the eremophilanes, the selectivities for humulane and caryophyllane conversions are remarkably high. Even the native CYP264B1 substrate (+)-eremophilene (**23**) is converted into six different products.<sup>[27]</sup> For products obtained from both ere-

mophilane- and humulane-type substrates, the levels of conversion were higher and more selective for the keto derivatives **1** (97% conversion, three products) and **6** (100%, two products) than for the non-oxidized hydrocarbons **4** (76%, 15 products) and **12** (58%, three products; Scheme 2, column 3). Compound **16** was the only substrate that could not be oxidized by CYP264B1. In contrast, this P450 converted  $\alpha$ -cedrene (**21**) into its 15-hydroxy derivative **22**, introducing a primary allylic alcohol function. Steric hindrance in binding of **16** might have been due to the hydroxy group at C-4 or the terminal double bond between C-3 and C-15. This might affect the difference between the conversions of **16** and **21**.

Overall, it can be stated that CYP264B1 is a highly selective sesquiterpene hydroxylase. It produces allylic alcohols (at position C-5) from the humulanes **6** and **12** and also from caryophyllene (**14**). In the cases of the eremophilane-type substrates **1** and **4** it shows increased 13-hydroxylation activity, likewise producing allylic alcohols. For these structural sesquiterpene classes, the regioselectivity of the hydroxylation does not seem to be affected by the presence of a carbonyl function or by the higher flexibility of humulanes in relation to caryophyllene. However, a carbonyl group enhances the catalytic activity of CYP264B1 towards eremophilanes and humulanes: hydrocarbon substrates **4** and **12** are converted less efficiently and less selectively than their keto derivatives **1** and **6**. For cedranes, the presence of a 4-hydroxy group and a change in a double bond (**16** in comparison with **21**) abolish the catalytic function of CYP264B1.

#### Comparison of CYP260A1 and CYP264B1

Both P450s—CYP260A1 and CYP264B1—have shown their versatilities in oxidizing sesquiterpenes. All of the four structural classes of sesquiterpenes employed as substrates (Scheme 1) were converted either by one or by both of the enzymes. This indicates that the active sites of the P450s form cavities large or flexible enough for the binding of these structurally diverse sesquiterpenes.

Sesquiterpenes possessing oxygen-containing functional groups (Scheme 2, compounds **1**, **6**, and **16**) serve as substrates for CYP260A1, whereas the corresponding hydrocarbons are not converted. Thus, this enzyme is likely to bind the substrates through hydrogen bonds. Its oxidation reactions show high promiscuity, producing several products in similar amounts (compounds **7–10** from **6**, compounds **17–20** from **16**) by oxidizing each substrate at different positions. Wild-type CYP260A1 therefore seems a rather poor candidate for selective sesquiterpene oxidation. However, it does hydroxylate sesquiterpenes at chemically inert positions (compound **1** at C-4, compound **16** at C-9). In analogy to previous studies with CYP106A2,<sup>[27]</sup> rational mutagenesis of CYP260A1 could be conducted to increase its selectivity. The conversions of **1**, **6**, and **16** demonstrated in this study represent suitable model reactions for this purpose.

CYP264B1 converts all of the employed substances, whether they are oxygenated or non-oxygenated hydrocarbons, except for (+)-3(15)-cedren-4-ol (**16**). The enzyme's active site seems

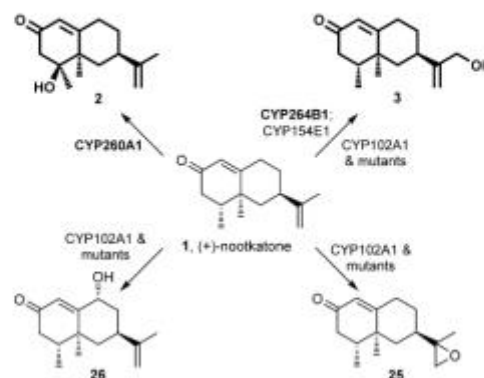
to be governed by hydrophobic residues, able to bind unpolar sesquiterpene hydrocarbons. However, the ketones **1** and **6** are converted more efficiently and more selectively than their non-oxidized parent sesquiterpenes **4** and **12**. This might be explained by hydrogen-bond-directed preorientation of the substrate ketones in the active site. A computational model of **1** bound to CYP264B1 shows binding of the carbonyl group to the backbone amide of Met286.<sup>[30]</sup> CYP264B1 shows high selectivities for C-5 hydroxylation of the humulanes **6** and **12** as well as for  $\beta$ -caryophyllene (**14**). Therefore, neither the 8-keto function nor the greater flexibility of humulanes in relation to the related caryophyllanes have an effect on the regioselectivity of the hydroxylation. Eremophilane-type substrates are converted into a multitude of products, mainly hydroxylated at C-13 (compounds **3** and **5**). The occurrence of some side products, which has likewise been observed for the physiological substrate (+)-eremophilene,<sup>[27]</sup> is probably due to reactions taking place in the *E. coli* whole-cell catalyst. CYP264B1-mediated in vitro hydroxylations of **1** and **4** have been shown to produce only one and four side products, respectively.<sup>[30]</sup> Thus, CYP264B1 is a selective sesquiterpene oxidase, which is able to functionalize a broad range of substrate structures. In general, sesquiterpene olefins of every hydrocarbon skeleton type should be considered as substrates for CYP264B1.

Taken together, both P450s—CYP260A1 and CYP264B1—should be considered for oxidation studies of further sesquiterpene classes. Whereas wild-type CYP264B1 is selective for allylic hydroxylations, CYP260A1 needs to be engineered to perform reactions with higher selectivities.

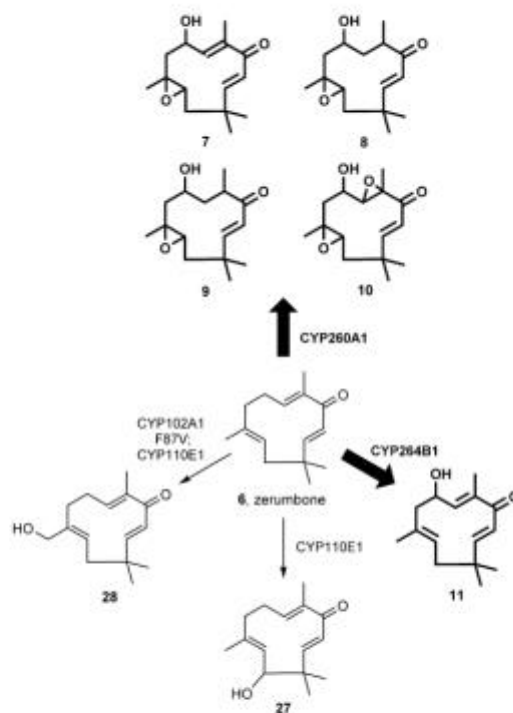
#### Filling gaps in the range of sesquiterpene oxidations

Most of the bacterial P450s that have been functionally investigated and found to oxidize sesquiterpenes are contained in biosynthetic clusters of different species,<sup>[33–38]</sup> including *S. cellulosum* So ce56, close to TPS genes.<sup>[27]</sup> Sesquiterpene-oxidizing P450s that are not clustered with TPS genes include CYP109B1, which performs the commercially attractive conversion of **4** into **1**,<sup>[39]</sup> CYP102A1 (P450<sub>u3</sub>) and CYP154E1, which both oxidize **1** to form **3**, **25**, and **26** (Scheme 4), and the cyanobacterial CYP110 family.<sup>[40]</sup> CYP110E1 hydroxylates **6** to various products, although yielding mainly **27** and **28** (Scheme 5).<sup>[41]</sup>

Compounds **1** and **6** are the most widely studied sesquiterpenes in terms of bacterial P450-mediated selective oxidations. The existing choice of tools, however, covers only a few oxidation positions of model substrates **1** and **6**. In this study we provide a new product—(4S)-hydroxynootkatone (**2**)—through hydroxylation of the chemically inert C-4 of **1**. We also provide another way to access the primary (+)-nootkatone alcohol **3**. Previous studies have shown only allylic hydroxylation products **3** and **26** and the epoxide **25** (Scheme 4).<sup>[42–44]</sup> Oxidation of **6** leads even to a greater variety of described products. Here, we contribute a new selective hydroxylation by CYP264B1 to yield 5-hydroxyzerumbone (**11**) and the multiply oxidized CYP260A1 products **7–10** (Scheme 5). The side products of the CYP260A1- and CYP264B1-catalyzed reactions include new and unidentified structures. Further development



**Scheme 4.** Oxidation products of (+)-nootkatone (**1**) obtained through conversion with different bacterial P450s. The products identified in this study and the enzymes used are shown in bold. The other derivatization studies of **1** to **3**, **25**, and **26** were conducted by Sowden et al.,<sup>[42]</sup> by Kolev et al.,<sup>[43]</sup> and by von Bühler et al.<sup>[44]</sup>



**Scheme 5.** Oxidation products of zerumbone (**6**) obtained through treatment with different bacterial P450s. The products identified in this study and the enzymes used are shown in bold. The derivatization of **6** by treatment with CYP110E1 and CYP102A1F87V was conducted by Makino et al.<sup>[41]</sup>

based on the previous successful engineering studies of CYP102A1,<sup>[41]</sup> CYP101,<sup>[42]</sup> and CYP106A2<sup>[32]</sup> and including the P450s that have been used in this study should lead to further changes in reaction selectivities, and consequently, to expansion of the range of sesquiterpene products.

#### Applications of the oxidized sesquiterpene products

Oxidized eremophilane- and humulane-type sesquiterpenes have been shown to exhibit various pharmaceutically interesting activities. Compounds **3** and **11** are inhibitors of NO production in interferon- and lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophage cells.<sup>[43–46]</sup> Compound **3** and other oxidized derivatives of (+)-nootkatone (**1**) inhibit proliferation in human cancer cell lines A549 and HL-60.<sup>[47]</sup> The oxidized zerumbone (**6**) products **7–10** are structurally close to (9E)-humulene-2,3,6,7-diepoxyde (< Scheme 3, **24**), a promising anti-acetylcholinesterase agent for the treatment of Alzheimer's disease.<sup>[28]</sup> Compounds **7–10** could thus be tested for similar functions. Generally, the introduction of functional groups by P450s paves the way for further derivatizations. Selectively oxidized sesquiterpenes might serve as lead structures for the development of compound libraries for screening for biological activities.

Another important field of application for oxidized sesquiterpenes is that of flavors and fragrances. Introducing an alcohol or keto function significantly alters the olfactory properties of natural terpene hydrocarbons and artificial sesquiterpene-like ketones.<sup>[48]</sup> Selectively oxidized sesquiterpenes could thus serve for structure–odor relationship studies.<sup>[49]</sup>

#### Conclusion

The increasing industrial demand for oxidized sesquiterpenoids as pharmaceuticals, flavors, and fragrances requires synthetic methods for selective oxidation of their hydrocarbon precursors.<sup>[39,50]</sup> The methods of organic synthesis are often not able to meet this need, due to low efficiencies and selectivities. Cytochromes P450 from plants are known as native terpene oxidases.<sup>[5,13]</sup> However, bacterial P450s have been little studied for sesquiterpene derivatization until now. In this study we have focused on conversions of a structural variety of sesquiterpenes by the two P450s CYP260A1 and CYP264B1 from *S. celulosum* So ce56. Three structural sesquiterpene types—eremophilanes, humulanes, and cedranes (Scheme 1)—were converted by both of the enzymes. The humulane-related caryophyllene (Scheme 2, **14**) was selectively hydroxylated by CYP264B1. Using the model substrates (+)-nootkatone (**1**) and zerumbone (**6**), we were able to produce the new oxidized derivatives **2** and **7–11**, complementary to products formed by other P450s (Schemes 4 and 5).

We also observed side products in the conversion analyses (Scheme 2), but these were not produced in sufficient amounts for structural analysis by NMR spectroscopy. The activity of CYP264B1 might be improved and the selectivities of both CYP260A1 and CYP264B1 increased by engineering through different mutagenesis techniques.<sup>[42–43,51]</sup> In this way, new ox-

idation positions could be accessible, to build up a toolbox for selective sesquiterpene derivatization with the aid of P450s. P450 expression can be efficiently coupled with the MVA pathway and TPS genes in terpene-producing strains to test CYP260A1 and CYP264B1 for oxidations of commercially unavailable sesquiterpenes.<sup>[15,52]</sup> Cadinane- and cubebane-type sesquiterpenes, which have recently been discovered as products of a *S. celulosum* So ce56 TPS,<sup>[53]</sup> represent potential new substrates for CYP260A1 and CYP264B1.

Overall, CYP260A1 and CYP264B1 have been shown to be versatile oxidases, able to convert various structural sesquiterpene classes. Therefore, both P450s are promising oxidases for other sesquiterpene types. CYP264B1 is a highly selective allylic hydroxylase, derivatizing oxidized and non-oxidized substrates. CYP260A1 exclusively converts oxy-sesquiterpenes, producing unselective product mixtures. It is, however, valuable for its ability to hydroxylate chemically inert carbon atoms (compound **1** at C-4, compound **16** at C-9), and could be engineered to achieve higher selectivities.

The oxidized sesquiterpenes obtained in this study have been shown to exhibit antiproliferative (compound **3**)<sup>[47]</sup> and NO-synthesis-inhibiting (compounds **3** and **11**) abilities.<sup>[45–46]</sup> The products **7–10** are structurally close to the acetylcholinesterase-inhibiting agent **24**<sup>[28]</sup> and, therefore, likely to show similar properties. The oxidized sesquiterpenes can serve as precursors for compound libraries for the improvement of these pharmaceutically interesting properties. Because oxidation can change the odor of a fragrance compound,<sup>[48]</sup> the obtained products should be tested for their qualities as flavors and fragrances, and they could be used for structure–odor relationship studies.

#### Experimental Section

**Enzymes and chemicals:** The substrate  $\alpha$ -cedrene was provided by Dr. Fanny Lambert (V. Mane & Fils, Bar-Sur-Loup, France), and  $\beta$ -caryophyllene was provided by Prof. Dr. Danièle Werck-Reichhart (University of Strasbourg, France). Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and 5-aminolevulinic acid were purchased from Carbolution chemicals (Saarbrücken, Germany). Bacterial media were purchased from Becton Dickinson (Heidelberg, Germany). All other chemicals were obtained from standard sources in the highest purity available.

**Strains:** The *E. coli* strain BL21-Gold(DE3) for the whole-cell conversions was purchased from Agilent Technologies, and the *E. coli* strain C43(DE3) was purchased from Lucigen Corp. (Middleton, USA).

**Expression vectors:** The redox partners Fpr and Adx<sub>4–108</sub> were used for the *E. coli*-based whole-cell conversions. CYP260A1 (pET17b) was applied with the duet vector (pCDF dFA) coding for Fpr and Adx<sub>4–108</sub><sup>[31]</sup> whereas a tricistronic vector (pETC4ofA) coding for CYP264B1, Fpr and Adx<sub>4–108</sub> was used for the CYP264B1-dependent conversions.<sup>[27]</sup>

**Media:** Terrific broth medium consisted of (per liter H<sub>2</sub>O) yeast extract (24 g), peptone (12 g), glycerol (4 mL), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.31 g), and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (12.54 g).

M9CA medium consisted of (per liter H<sub>2</sub>O) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g), NaCl (0.5 g), NH<sub>4</sub>Cl (1 g), casamino acids (4 g), glucose (4 g), CaCl<sub>2</sub> (1 M, 50 µL), MgSO<sub>4</sub> (1 M, 2 mL), and trace elements solution (2 mL, trace elements solution contained (per 50 mL H<sub>2</sub>O) EDTA (2.5 g), FeSO<sub>4</sub> (250 mg), ZnCl<sub>2</sub> (25 mg), and CuSO<sub>4</sub> (5 mg)).

**E. coli-based whole-cell conversions with CYP260A1:** The experiments were performed with *E. coli* BL21(DE3) gold cells. The cells were transformed with two plasmids, one for CYP260A1 (pET17b) and the other for the redox partners Fpr and Adx<sub>1-108</sub> (pCDF dFA). The overnight culture was prepared in nutrient broth containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) and streptomycin (50 µg mL<sup>-1</sup>). The main culture with M9CA medium was inoculated with the overnight culture (dilution 1:100) and incubated at 37 °C in sealed baffled flasks. The induction of the corresponding genes was initiated by adding IPTG (1 mM) and 5-aminolevulinic acid (0.5 mM) when the optical density reached ≈ 0.9, and the culture was grown further at 28 °C. After 21 h of expression, the temperature was set to 30 °C, and the substrates (50 mM stock solution in EtOH) were added to a final concentration of 200 µM. The reaction was carried out for 48 h under the same conditions, quenched by addition of the same volume of ethyl acetate, and extracted twice. The organic phases were collected, pooled, and concentrated to dryness. The obtained extracts were stored at -20 °C until purification.

**E. coli-based whole-cell conversions with CYP264B1:** *E. coli* C43(DE3) cells were transformed with the tricistronic vector pET-C4oFA and grown overnight in nutrient broth containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C. Terrific Broth medium containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) was inoculated with the overnight culture (dilution 1:100) and grown under the same conditions until the optical density reached ≈ 0.9. The expression was induced with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (1 mM) and 5-aminolevulinic acid (0.5 mM). After shaking for 24 h at 30 °C, the cells were harvested by centrifugation (4000 g) and resuspended in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) containing glycerol (4%). The substrates (200 µM), IPTG (1 mM), and 5-aminolevulinic acid (0.5 mM) were added, and the conversion was carried out at 30 °C for a further 24 h in sealed baffled flasks. The reactions were stopped by cooling at 4 °C for 30 min, and then the same volume of ethyl acetate was added. The products were extracted twice, and the organic phases were pooled and concentrated to dryness. The extracts were kept at -20 °C until purification.

**Purification of the products:** The extracts of α-cedrene, β-caryophyllene, (+)-3(15)-cedren-4-ol, α-humulene, and (+)-valencene zerumbone (CYP260A1-dependent conversion) were dissolved in ethyl acetate and loaded on a silica gel column. Mixtures of ethyl acetate and hexane were used as mobile phase. The ratios of these solvents are substrate-dependent: β-caryophyllene (ethyl acetate/hexane 1:9), α-cedrene (1:99), (+)-3(15)-cedren-4-ol (8:2), α-humulene (1:9), (+)-valencene (5:95), and zerumbone (8:2 for the CYP260A1-dependent conversion). The collected fractions were analyzed by thin-layer chromatography (silica gel on PET) with the same solvent mixture as the mobile phase. The separated compounds were stained with *p*-anisaldehyde for detection.<sup>[31]</sup> The obtained products were pooled, concentrated to dryness, and prepared for the analysis by GC/MS or NMR spectroscopy.

The extracts of (+)-nootkatone (CYP260A1-dependent conversion) and zerumbone (CYP264B1-dependent conversion) were purified by preparative HPLC. A system consisting of a PU-2080 HPLC pump, an AS-2059-SF autosampler, and a MD-2010 multi-wavelength detector (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) was used. The products of (+)-nootkatone were purified with a reversed-phase

Nucleodur 100-5 C18 column (250 × 5 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and use of A) water containing acetonitrile (10%), and B) pure acetonitrile as mobile phase. A gradient from 30% to 90% B was used for the separation of the corresponding products. The product of CYP264B1-dependent zerumbone conversions were purified with an unmodified VP Nucleodur 100-5 column (250 × 10 mm, Macherey-Nagel) and use of hexane and ethyl acetate as mobile phase. The zerumbone product was separated under isocratic conditions (ethyl acetate/hexane 2:8). The product-containing fractions were pooled, concentrated to dryness, and prepared for further analysis by GC/MS or NMR spectroscopy.

**GC/MS analysis of the products:** GC/MS analysis was performed with a system consisting of an AI/AS 3000 autosampler, a DSQII quadrupole, a Focus GC column oven (Thermo Scientific), and a HP-5 ms capillary column (25 m × 0.32 mm i.d., 0.52 µm film, Agilent Technologies). The compounds were analyzed under the following conditions: inlet pressure 50 kPa, column flow 10 mL min<sup>-1</sup>, injection volume 1 µL, transfer line 280 °C, electron energy 70.5 eV, splitless mode. The starting oven temperature was 50 °C for 1 min; then the temperature was increased by 10 °C min<sup>-1</sup> to 310 °C and held for 5 min. The carrier gas was He with a flow of 1 mL min<sup>-1</sup>. Mass spectra were recorded in a *m/z* range of 20–350.

**HPLC analysis of the (+)-nootkatone conversion by CYP260A1:** HPLC analysis was performed with a system consisting of a PU-2080 HPLC pump, an AS-2059-SF autosampler, and a MD-2010 multi-wavelength detector (Jasco). A Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub> column (125 × 4 mm, Macherey-Nagel) was used at 40 °C. The mobile phase consisted of A) a mixture of water and acetonitrile (90:10), and B) pure acetonitrile. The samples were dissolved in a mixture of water and acetonitrile (70:30) and separated by use of the following gradient with a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>: 30% solvent B for 1 min, linear increase to 90% for 8 min, maintained for 1 min, immediate decrease to 30%, maintained for 5 min. (+)-Nootkatone and its oxidation products were detected at 254 nm.

**NMR analysis and data for the obtained products:** NMR spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub> with a Bruker DRX 500 spectrometer (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes). The 2D NMR spectra were recorded as gs-HH-COSY, gs-HSQC, and gs-HMBC. All chemical shifts are relative to CHCl<sub>3</sub> or CDCl<sub>3</sub> (δ = 77.00 ppm for <sup>13</sup>C NMR, δ = 7.24 ppm for <sup>1</sup>H NMR) with use of the standard δ notation.

**(4S)-Hydroxynootkatone (2):** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.24 (s, 3H; H-14), 1.26 (s, 3H; H-15), 1.36 (m, 1H; H-8a), 1.62 (ddd, *J* = 13.0, 3.0 and 3.0 Hz, 1H; H-6a), 1.73 (s, 3H; H-13), 1.85 (m, 1H; H-8b), 1.96 (dd, *J* = 13.0, 13.0 Hz, 1H; H-6b), 2.31 (dddd, *J* = 15.5, 13.0, 3.0, 3.0 Hz, 1H; H-7), 2.42 (dd, *J* = 17.0, 1.0 Hz, 1H; H-3a), 2.43 (m, 1H; H-9a), 2.51 (m, 1H; H-9b), 2.76 (d, *J* = 17 Hz, 1H; H-3b), 4.73 (s, 2H; H-12), 5.83 ppm (brs, H-1); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 20.8 (C-13), 22.4 (C-14), 23.4 (C-15), 30.8 (C-8), 33.1, (C-9), 35.9 (C-6), 40.4 (C-7), 44.5 (C-5), 49.0 (C-3), 75.9 (C-4), 109.4 (C-12), 124.5 (C-1), 149.1 (C-11), 167.0 (C-10), 197.3 ppm (C-2).

**13-Hydroxynootkatone (3):** The NMR data for this compound are presented in Ly et al.<sup>[30]</sup>

**13-Hydroxyvalencene (5):** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.85 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H; H-15), 0.93 (s, 3H; H-14), 0.97 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; H-6a), 1.19 (m, 1H; H-8a), 1.40 (m, 3H; H-3, H-4), 1.80 (m, 1H; H-8b), 1.89 (m, 1H; H-6b), 1.92 (m, 1H; H-2a), 2.05 (m, 1H; H-9a), 2.08 (m, 1H; H-2b), 2.29 (m, 2H; H-7, H-9b), 4.11 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H; H-13), 4.86 (s, 1H; H-12a), 5.00 (s, 1H; H-12b), 5.32 ppm (m, 1H; H-1); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 15.6 (C-15), 18.5 (C-14), 25.9 (C-2),

27.1 (C-3), 32.7 (C-9), 33.6 (C-8), 36.7 (C-7), 37.9 (C-5), 40.9 (C-4), 45.4 (C-6), 65.3 (C-13), 107.9 (C-12), 120.4 (C-1), 142.7 (C-10), 154.1 ppm (C-11).

**2,3-Epoxy-5-hydroxyzerumbone (7):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.06 (s, 3H; H-12, H-13), 1.28 (s, 3H; H-12, H-13), 1.21 (s, 3H; H-14), 1.29 (m, 1H; H-4a), 1.42 (m, 1H; H-1a), 1.91 (m, 1H; H-1b), 1.97 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 3H; H-15), 2.63 (m, 1H; H-4b), 2.74 (dd,  $J$  = 11.2, 1.7 Hz, 1H; H-2), 4.58 (m, 1H; H-5), 5.92 ppm (d,  $J$  = 9.7, 1.5 Hz, 1H; H-6), H-9 and H-10 were not present;  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 12.6 (C-15), 16.8 (C-14), 24.0 and 29.7 (C-12 and C-13), 35.9 (C-11), 42.6 (C-1), 47.6 (C-4), 59.3 (C-3), 62.7 (C-2), 64.9 (C-5), 128.7 (C-9), 142.5 (C-7), 144.4 (C-6), 161.3 (C-10), 202.7 ppm (C-8).

**6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbone (8):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.13 (s, 3H; H-12, H-13), 1.24 (s, 3H; H-12, H-13), 1.18 (s, 3H; H-14), 1.18 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H; H-15), 1.33 (m, 2H; H-4a, H-1a), 1.89 (m, 2H; H-6a, H-1b), 2.08 (d,  $J$  = 13.3 Hz, 1H; H-4b), 2.16 (dd,  $J$  = 15.7, 3.3 Hz, 1H; H-6b), 2.63 (m, 1H; H-2), 2.79 (m, 1H; H-7), 3.33 (dd,  $J$  = 10.2, 6.9 Hz, 1H; H-5), 6.25 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H; H-9), 6.29 ppm (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H; H-10);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 12.6 (C-15), 17.5 (C-14), 23.4 and 29.6 (C-12 and C-13), 36.1 (C-11), 40.4 (C-1), 42.7 (C-6), 44.7 (C-7), 51.1 (C-4), 59.1 (C-3), 60.5 (C-2), 66.3 (C-5), 128.0 (C-9), 150.4 (C-10), 204.0 ppm (C-8).

**6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbone (9):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.13 (s, 3H; H-12, H-13), 1.25 (s, 3H; H-12, H-13), 1.21 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H; H-15), 1.22 (s, 3H; H-14), 1.31 (m, 1H; H-4a), 1.34 (m, 1H; H-1a), 1.70 (m, 1H; H-6a), 1.80 (dd,  $J$  = 15.1, 11.7 Hz, 1H; H-6b), 1.86 (m, 1H; H-1b), 2.13 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1H; H-4b), 2.61 (m, 1H; H-2), 2.63 (m, 1H; H-7), 3.32 (m, 1H; H-5), 6.25 (d,  $J$  = 16.1 Hz, 1H; H-10), 6.33 ppm (d,  $J$  = 16.1 Hz, 1H; H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 16.7 (C-15), 17.5 (C-14), 23.5 and 29.7 (C-12 and C-13), 36.3 (C-11), 39.8 (C-1), 45.4 (C-6), 46.4 (C-7), 50.2 (C-4), 59.3 (C-3), 60.1 (C-2), 68.1 (C-5), 124.9 (C-9), 151.2 (C-10), 206.5 ppm (C-8).

**2,3,6,7-Diepoxy-5-hydroxyzerumbone (10):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.15 (s, 3H; H-12, H-13), 1.25 (s, 3H; H-12, H-13), 1.37 (s, 3H; H-14), 1.37 (m, 1H; H-4b), 1.51 (dd,  $J$  = 14.3, 11.2 Hz, 1H; H-1a), 1.69 (s, 3H; H-15), 1.97 (m, 1H; H-1b), 2.60 (m, 1H; H-4b), 2.65 (dd,  $J$  = 11.3, 1.5 Hz, 1H; H-2), 2.78 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H; H-6), 3.74 (m, 1H; H-5), 5.95 (d,  $J$  = 17.2 Hz, 1H; H-9), 6.83 ppm (d,  $J$  = 17.2 Hz, 1H; H-10);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 16.6 (C-15), 17.6 (C-14), 25.1 and 30.1 (C-12 and C-13), 35.3 (C-11), 41.6 (C-1), 44.7 (C-4), 58.1 (C-3), 61.7 (C-2), 65.2 (C-5), 65.9 (C-6), 66.7 (C-7), 126.4 (C-9), 160.0 (C-10), 197.2 ppm (C-8).

**5-Hydroxyzerumbone (11):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.06 (s, 3H; H-12, H-13), 1.18 (s, 3H; H-12, H-13), 1.54 (s, 3H; H-14), 1.90 (s, 3H; H-15), 1.90 (m, 1H; H-1a), 2.13 (m, 1H; H-4a), 2.34 (t,  $J$  = 12.8 Hz, 1H; H-1b), 2.74 (m, 1H; H-4b), 4.62 (m, 1H; H-5), 5.28 (brd,  $J$  = 10.9 Hz, 1H; H-2), 5.79 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 1H; H-6), 5.88 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H; H-10), 5.98 ppm (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H; H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 12.2 (C-15), 16.5 (C-14), 24.2 and 29.3 (C-12 and C-13), 38.5 (C-11), 42.5 (C-1), 49.3 (C-4), 64.9 (C-5), 126.7 (C-2), 127.3 (C-9), 133.0 (C-3), 140.6 (C-7), 145.6 (C-6), 162.4 (C-10), 204.2 ppm (C-8).

**5-Hydroxyhumulene (13):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.02 (s, 3H; H-12, H-13), 1.07 (s, 3H; H-12, H-13), 1.45 (s, 3H; H-14), 1.70 (s, 3H; H-14), 1.80 (dd,  $J$  = 13.5, 5.2 Hz, 1H; H-1a), 1.98 (dd,  $J$  = 13.5, 10.0 Hz, 1H; H-1b), 2.05 (dd,  $J$  = 12.0, 8.2 Hz, 1H; H-4a), 2.31 (m, 1H; H-8a), 2.46 (dd,  $J$  = 12.0, 5.2 Hz, 1H; H-4b), 2.71 (dd,  $J$  = 13.8, 8.3 Hz, 1H; H-8b), 4.54 (m, 1H; H-5), 4.94 (dd,  $J$  = 9.7, 5.3 Hz, 1H; H-2), 5.00, dt,  $J$  = 9.6, 1.4 Hz, 1H; H-6), 5.14 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H; H-

10), 5.58 ppm (m, 1H; H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 16.7 (C-14), 19.1 (C-15), 25.5 and 28.7 (C-12 and C-13), 36.9 (C-11), 39.4 (C-8), 41.7 (C-1), 49.3 (C-4), 67.0 (C-5), 126.5 (C-2), 127.5 (C-9), 130.0 (C-6), 131.7 (C-3), 141.5 (C-10), 141.9 ppm (C-7).

**5-Hydroxycaryophyllene (15):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.94 (s, 3H; H-12, H-13), 0.95 (s, 3H; H-12, H-13), 1.41 (t,  $J$  = 9.7 Hz, 1H; H-10), 1.53–1.58 (m, 3H; H-1a, H-8a, H-9a), 1.60 (s, 3H; H-14), 1.67 (m, 1H; H-9b), 1.78 (m, 1H; H-1b), 1.92 (t,  $J$  = 10.6 Hz, 1H; H-4a), 2.25 (dd,  $J$  = 9.7, 8.9 Hz, 1H; H-2), 2.51 (dd,  $J$  = 13.7, 6.7 Hz, 1H; H-8), 2.76 (dd,  $J$  = 11.5, 6.6 Hz, 1H; H-4b), 4.58 (m, 1H; H-5), 4.89 (s, 1H; H-15a), 4.98 (s, 1H; H-15b), 5.24 ppm (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H; H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 21.8 and 22.9 (C-12 and C-13), 29.8 (C-14), 31.2 (C-9), 32.7 (C-11), 34.7 (C-8), 42.2 (C-1), 48.9 (C-2), 49.2 (C-4), 55.5 (C-10), 70.8 (C-5), 112.4 (C-15), 127.8 (C-6), 136.9 (C-7), 150.0 ppm (C-3).

**4,9-Dihydroxy-3(15)-cedrene (17):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.92 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H; H-14), 1.00 (s, 3H; H-12, H-13), 1.11 (s, 3H; H-12, H-13), 1.18 (dd,  $J$  = 11.9, 10.2 Hz, 1H; H-5a), 1.31 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1H; H-1a), 1.50 (m, 1H; H-8a), 1.65 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H; H-10), 1.72 (m, 1H; H-1b), 1.78 (m, 1H; H-7), 2.08 (m, 1H; H-8b), 2.20 (m, 1H; H-5b), 2.35 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H; H-2), 4.10 (m, 1H; H-9), 4.35 (m, 1H; H-4), 4.74 (t,  $J$  = 2.1 Hz, 1H; H-15a), 4.98 ppm (t,  $J$  = 2.1 Hz, 1H; H-15b);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 15.2 (C-14), 26.4 and 26.5 (C-12 and C-13), 39.0 (C-7), 41.1 (C-11), 45.0 (C-5), 45.6 (C-1), 46.6 (C-8), 53.5 (C-6), 60.8 (C-2), 65.8 (C-10), 69.7 (C-4), 73.6 (C-9), 107.0 (C-15), 153.4 ppm (C-3).

**3,15-Epoxy-4,9-dihydroxycedrene (18):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.93 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H; H-14), 1.10 (s, 3H; H-12, H-13), 1.17 (s, 3H; H-12, H-13), 1.22 (m, 1H; H-5a), 1.39 (m, 1H; H-2), 1.50 (AB q,  $J$  = 2.0 Hz,  $\Delta\nu$  = 5.2 Hz, 1H H-8a), 1.62 (m, 2H; H-1), 1.72 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H; H-10), 1.80 (m, 1H; H-7), 2.08 (m, 1H; H-8b), 2.22 (m, 1H; H-5b), 2.61 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H; H-15a), 3.05 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H; H-15b), 4.10 (m, 1H; H-4), 4.11 ppm (m, 1H; H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 15.1 (C-14), 25.9 and 26.4 (C-12 and C-13), 39.1 (C-7), 40.3 (C-11), 42.3 (C-1), 43.2 (C-5), 46.5 (C-8), 51.7 (C-15), 52.9 (C-6), 58.1 (C-2), 61.5 (C-3), 65.1 (C-10), 65.3 (C-4), 73.5 ppm (C-9).

**9-Hydroxy-4-keto-3(15)-cedrene (19):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.93 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H; H-14), 0.93 (s, 3H; H-12, H-13), 1.14 (s, 3H; H-12, H-13), 1.52 (AB q,  $J$  = 2.2 Hz,  $\Delta\nu$  = 5.5 Hz, 1H; H-8a), 1.59 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H; H-10), 1.69 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H; H-1a), 1.91 (m, 1H; H-7), 1.93 (m, 1H; H-1b), 2.11 (m, 1H; H-8b), 2.32 (dd,  $J$  = 17.5, 1.0 Hz, 1H; H-5a), 2.53 (dd,  $J$  = 17.5, 3.2 Hz, 1H; H-5b), 2.57 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H; H-2), 4.15 (m, 1H; H-9), 5.04 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H; H-15a), 5.90 ppm (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H; H-15b);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 15.4 (C-14), 25.8 and 28.9 (C-12 and C-13), 39.3 (C-7), 42.2 (C-11), 42.8 (C-1), 46.3 (C-8), 51.6 (C-5), 53.1 (C-6), 58.3 (C-2), 67.9 (C-10), 73.5 (C-9), 121.1 (C-15), 148.2 (C-3), 201.1 ppm (C-4).

**9-Hydroxy-4-ketocedrene (20):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.91 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H; H-14), 1.05 (s, 3H; H-12, H-13), 1.09 (s, 3H; H-12, H-13), 1.16 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H; H-15), 1.45 (AB q,  $J$  = 1.9 Hz,  $\Delta\nu$  = 5.1 Hz, 1H; H-8a), 1.57 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H; H-10), 1.78 (m, 1H; H-1a), 1.90 (m, 1H; H-7), 1.97 (m, 1H; H-2), 1.97 (m, 1H; H-1b), 2.10 (m, 1H; H-8b), 2.31 (d,  $J$  = 14.5 Hz, 1H; H-5a), 2.40 (dd,  $J$  = 14.7, 2.6 Hz, 1H; H-5b), 2.50 (m, 1H; H-3), 4.07 ppm (m, 1H; H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 14.5 (C-15), 15.4 (C-14), 27.8 and 28.8 (C-12 and C-13), 38.5 (C-7), 43.5 (C-11), 46.5 (C-8), 47.1 (C-1), 51.7 (C-5), 51.8 (C-3), 55.3 (C-6), 56.7 (C-2), 67.7 (C-10), 73.4 (C-9), 212.5 ppm (C-4).

**15-Hydroxy-3(4)-cedrene (22):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.84 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H; H-14), 0.95 (s, 3H; H-12, H-13), 0.98 (s, 3H; H-12,

H-13), 1.34–1.38 (m, 3H; H-1a, H-8a, H-9a), 1.57 (m, 1H; H-9b), 1.66–1.78 (m, 3H; H-1b, H-2, H-7b), 1.82–1.87 (m, 2H; H-5a, H-8b), 1.93 (d,  $J=3.8$  Hz, 1H; H-10), 2.23 (dd,  $J=17.2$  and 1.4 Hz, 1H; H-7), 3.99 (AB q,  $J=13.5$  Hz,  $\Delta\nu=41.4$  Hz, 1H; H-15), 5.50 ppm (m, 1H; H-1);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=15.4$  (C-14), 24.8 (C-9), 25.5 (C-13), 27.7 (C-12), 36.1 (C-8), 38.6 (C-5), 40.6 (C-1), 41.4 (C-7), 48.4 (C-11), 50.4 (C-10), 54.3 (C-6), 59.1 (C-2), 67.2 (C-15), 120.4 (C-4), 144.1 ppm (C-3).

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R.B. (Be1343/23-1) and from the DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), as well as from the Vietnam National Foundation for Science and Technology Development (NAFOSTED) under grant number 106-NN.02–2013.57 to T.T.B.L. We want to express our gratitude to Dr. Fanny Lambert (V. Mane & Fils, Bar-Sur-Loup, France) and to Prof. Dr. Danièle Werck-Reichhart (University of Strasbourg, France) for the kind gifts of  $\alpha$ -cedrene and  $\beta$ -caryophyllene. Furthermore, we wish to thank Dr. Josef Zapp, Reiner Wintringer, and Dr. Geradine Pereira (Universität des Saarlandes) for conducting the NMR measurements, for help with GC/MS measurements, and for helpful comments on the manuscript, respectively.

**Keywords:** cytochromes • enzyme catalysis • hydroxylation • regioselectivity • terpenoids

- [1] Y. Gao, R. B. Honzatzko, R. J. Peters, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1153–1175.
- [2] D. J. Miller, R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 60–71.
- [3] D. Joulain, W. A. König, *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, E. B.-Verlag, Hamburg, **1998**.
- [4] C. Weitzel, H. T. Simonsen, *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 7–24.
- [5] I. Pateraki, A. M. Heskies, B. Hamberger in *Biotechnology of Isoprenoids*, Vol. 148 (Eds.: J. Schrader, J. Bohlmann), Springer, Berlin, **2015**, pp. 107–139.
- [6] R. Bernhardt, V. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6185–6203.
- [7] J. Gershenzon, N. Dudareva, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 408–414.
- [8] E. Breitmaier in *Terpene*, Wiley, Weinheim, **2008**, pp. 23–50.
- [9] G. Schneider, H. Anke, O. Sterner, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 133–138.
- [10] C. J. Paddon, J. D. Keasling, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 355–367.
- [11] D. E. Cane, H. Ikeda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 463–472.
- [12] S. Schulz, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 814–842.
- [13] B. Hamberger, S. Bak, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2013**, *368*, 20120426.
- [14] N. Kitaoka, X. Lu, B. Yang, R. J. Peters, *Mol. Plant* **2015**, *8*, 6–16.
- [15] H. Harada, F. Yu, S. Okamoto, T. Kuzuyama, R. Utsumi, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 915–925.
- [16] J. Kirby, J. D. Keasling, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2009**, *60*, 335–355.
- [17] S. Janocha, D. Schmitz, R. Bernhardt in *Biotechnology of Isoprenoids*, Vol. 148 (Eds.: J. Schrader, J. Bohlmann), Springer, Berlin Heidelberg, **2015**, pp. 215–250.
- [18] S. Bleif, F. Hannemann, M. Lisurek, J. P. von Kries, J. Zapp, M. Dietzen, I. Antes, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 576–582.
- [19] D. Schmitz, J. Zapp, R. Bernhardt, *FEBS J.* **2012**, *279*, 1663–1674.
- [20] E. Brüll, F. Hannemann, J. Zapp, G. Brünig, J. Jauch, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1703–1717.
- [21] S. Janocha, J. Zapp, M. Hutter, M. Kleiser, J. Bohlmann, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 467–473.
- [22] D. Zehentgruber, F. Hannemann, S. Bleif, R. Bernhardt, S. Lütz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 713–721.
- [23] S. Bleif, F. Hannemann, J. Zapp, D. Hartmann, J. Jauch, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1135–1146.
- [24] S. Janocha, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7639–7649.
- [25] M. Ringle, Y. Khatri, J. Zapp, F. Hannemann, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7741–7754.
- [26] Y. Khatri, F. Hannemann, K. M. Ewen, D. Pistorius, O. Perlova, N. Kagawa, A. O. Brachmann, R. Müller, R. Bernhardt, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1295–1305.
- [27] A. Schiffrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 337–344.
- [28] P. Chen, P.-P. Wang, Z.-Z. Jiao, L. Xiang, *Helv. Chim. Acta* **2014**, *97*, 388–397.
- [29] K. M. Ewen, F. Hannemann, Y. Khatri, O. Perlova, R. Kappl, D. Krug, J. Hüttermann, R. Müller, R. Bernhardt, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28590–28598.
- [30] T. B. Ly, Y. Khatri, J. Zapp, M. Hutter, R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 123–133.
- [31] M. Litzenburger, F. Kern, Y. Khatri, R. Bernhardt, *Drug Metab. Dispos.* **2015**, *43*, 392–399.
- [32] K. T. Nguyen, C. Virus, N. Günnewich, F. Hannemann, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1161–1166.
- [33] D. Zhu, M.-J. Seo, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2128–2131.
- [34] B. Zhao, X. Lin, L. Lei, D. C. Lamb, S. L. Kelly, M. R. Waterman, D. E. Cane, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8183–8189.
- [35] B. Zhao, L. Lei, D. G. Vassilyev, X. Lin, D. E. Cane, S. L. Kelly, H. Yuan, D. C. Lamb, M. R. Waterman, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36711–36719.
- [36] B. Zhao, M. R. Waterman, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 473–477.
- [37] S. C. Moody, B. Zhao, L. Lei, D. R. Nelson, J. G. L. Mullins, M. R. Waterman, S. L. Kelly, D. C. Lamb, *FEBS J.* **2012**, *279*, 1640–1649.
- [38] R. Quaderer, S. Omura, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13036–13037.
- [39] M. Girhard, K. Machida, M. Itoh, R. Schmid, A. Arisawa, V. Urlacher, *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 36.
- [40] H. Harada, K. Shindo, K. Iki, A. Teraoka, S. Okamoto, F. Yu, J.-L. Hattori, R. Utsumi, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 467–476.
- [41] T. Makino, T. Otomatsu, K. Shindo, E. Kitamura, G. Sandmann, H. Harada, N. Misawa, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 95.
- [42] R. J. Sowden, S. Yasmin, N. H. Rees, S. G. Bell, L. L. Wong, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 57–64.
- [43] J. N. Kolev, J. M. Zaengle, R. Ravikumar, R. Fasan, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1001–1010.
- [44] C. von Bühler, P. Le-Huu, V. B. Urlacher, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2189–2198.
- [45] J. Xu, J. Su, Y. Li, N. Tan, *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 457–461.
- [46] H.-Y. Min, M. S. Kim, D. S. Jang, E.-J. Park, E.-K. Seo, S. K. Lee, *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 844–849.
- [47] A. Głuszczyńska, A. Łysek, T. Janeczko, M. Świątalska, J. Wietrzyk, C. Wawrzyniuk, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2464–2469.
- [48] B. Schilling, R. Kaiser, A. Natsch, M. Gaudschi, *Chemoecology* **2010**, *20*, 135–147.
- [49] C. Delasalle, C. A. de March, U. J. Meierhenrich, H. Brevard, J. Golebiowski, N. Baldovini, *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 1843–1860.
- [50] C. Gavira, R. Höfer, A. Lesot, F. Lambert, J. Zucca, D. Werck-Reichhart, *Metab. Eng.* **2013**, *18*, 25–35.
- [51] A. Glieder, E. T. Farinas, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1135–1139.
- [52] M. C. Chang, R. A. Eachus, W. Trieu, D. K. Ro, J. D. Keasling, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 274–277.
- [53] Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D. E. Cane, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 857–862.

Manuscript received: August 17, 2015

Accepted article published: October 9, 2015

Final article published: November 10, 2015

### **3.3 „A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in *Sorangium cellulosum* So ce56”**

A. Schiffrin, Y. Khatri, P. Kirsch, V. Thiel, S. Schulz, R. Bernhardt

im Original erschienen in *Org Biomol Chem.*, 2016, 14, 3385-3393

Diese Publikation fasst die Arbeiten der funktionellen Untersuchungen aller Terpensynthasen (TSn) aus *S. cellulosum* So ce56 zusammen. Neben der bereits beschriebenen (+)-Eremophilensynthase (sce8552) besitzt der Stamm zwei weitere Typ I-TSn (sce1440 und sce6369). Sce1440 ist eine Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol-/Geosminsynthase und sce6369 eine 10-*epi*-Cubebolsynthase, die neben dem Hauptprodukt jedoch eine Vielzahl weiterer Cadalan- und Cubebansesquiterpene produziert. Durch Vergleiche der von den TSn hergestellten Sesquiterpene mit dem Extrakt der Volatile von *S. cellulosum* So ce56 konnte nahezu allen Terpenen das synthetisierende Enzym zugeordnet werden. Die überwiegende Mehrheit von mindestens zwölf der 17 Sesquiterpene in *S. cellulosum* So ce56 wird von sce6369 synthetisiert.

## PAPER



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 3385

# A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in *Sorangium cellulosum* Soce56†

Alexander Schiffrin,<sup>a</sup> Yogan Khatri,<sup>a</sup> Philine Kirsch,<sup>a</sup> Verena Thiel,<sup>b</sup> Stefan Schulz<sup>b</sup> and Rita Bernhardt<sup>\*a</sup>

The myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 is a prolific producer of volatile sesquiterpenes. The strain harbours one of the largest prokaryotic genomes (13.1 Mbp). However, it codes only for three type I terpene synthases (TSs; sce1440, sce6369, sce8552) and one type II TS (sce4636), responsible for the production of at least 17 sesquiterpenes. We report here the gene expression of TSs and biosynthesis of the TS products in *E. coli*. Comparison with the So ce56 volatiles allows the assignment of the terpenes to their synthesizing genes. Both, the geosmin synthase sce1440 and the previously examined (+)-eremophilene synthase sce8552 are highly specific. In contrast, Sce6369, the first characterized 10-*epi*-cubebol synthase, is responsible for the formation of most of the So ce56 sesquiterpenes, mainly cadalanes and cubebanes. In contrast, Sce4636 does not convert FPP. Having characterized the So ce56 TSs, we screened all the 27 sequenced myxobacterial species from the NCBI and JGI-IMG databases for parent genes to predict the sesquiterpenes produced by them.

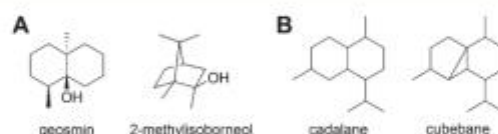
Received 15th January 2016,  
Accepted 25th February 2016  
DOI: 10.1039/c6ob00130k  
www.rsc.org/obc

## Introduction

Terpene synthase (TS)-mediated conversions of farnesyl pyrophosphate (FPP) to sesquiterpenes, the C-15 subgroup of terpenes, belong to the most complex biochemical reactions observed in nature. These reactions can involve up to four C–C bond formations, several consecutive cationic intermediates, hydride shifts and Wagner-Meerwein rearrangements. A single conversion can induce up to six stereogenic centers (and one more in case of water quenching as the final reaction step).<sup>1–3</sup> Over 80 sesquiterpene hydrocarbon skeletons are known to date. Highly specific TSs, which convert FPP to a single product, represent interesting targets for studies of nature's incomparable precision in bioreactions.<sup>4,5</sup> However, in some cases, less specific TS catalysts produce trace amounts of side products, which bear important structural information. This information can be directly used to draw conclusions about the reaction mechanism.<sup>6–9</sup> The accelerating speed of genomic sequencing reveals a steadily increasing number of bacterial TS genes. Although bacteria are a rich source of structurally

diverse terpenoids,<sup>10–12</sup> terpene biosynthesis in the subgroup of myxobacteria has been studied in detail only for the off-flavours geosmin and 2-methylisoborneol (Scheme 1A).<sup>13–16</sup> The genome sequence data of the strain *Sorangium cellulosum* So ce56 revealed one of the largest bacterial genomes with a size of 13.1 Mbp<sup>17</sup> containing three type I TS genes (sce1440, sce6369, sce8552) and one type II TS gene (sce4636).<sup>18</sup> We recently described the gene product of sce8552 as a specific (+)-eremophilene synthase, clustered with the cytochrome P450 CYP264B1 (sce8551), which oxidizes (+)-eremophilene.<sup>16</sup>

Despite mutualities of sesquiterpene synthases including the common  $\alpha$ -helical fold and the characteristic motifs in the active site (aspartate-rich DDxxD/E motif on helix D and NSE/DTE-triad on helix H),<sup>1</sup> amino acid sequence identities among bacterial sesquiterpene synthases as well as between bacterial and other TSs are rather low.<sup>18</sup> In general, the structure of each sesquiterpene is governed by the shape of the TS binding



**Scheme 1** (A) Common myxobacterial terpenoids geosmin and 2-methyl-isoborneol; (B) sesquiterpene hydrocarbon scaffolds of cadalane and cubebene.

<sup>a</sup>Universität des Saarlandes, Institut für Biochemie, Campus B2.2, 66123 Saarbrücken, Germany. E-mail: ritabern@mx.uni-saarland.de

<sup>b</sup>Technische Universität Braunschweig, Institut für Organische Chemie, Hagenring 30, 38106 Braunschweig, Germany. E-mail: stefan.schulz@tu-bu.de; Fax: (+49) 0531-391-5273

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ob00130k

pocket.<sup>1–3</sup> Furthermore, TSs can undergo large conformational changes observed in an induced-fit reaction mechanism.<sup>19</sup> Hence, the biochemical function of TSs and the structures of their corresponding products can only be assigned by direct experiments.<sup>18</sup> The assignment of bacterial TS functions has been conducted *via* three main approaches:

- (1) *In vitro* conversion of FPP with the purified enzyme and analysis of the products.<sup>16,20,21</sup>
- (2) Direct analysis of bacterial volatiles in combination with a phylogenetic analysis of the corresponding strain.<sup>22</sup>
- (3) Expression of the TS gene in a heterologous host and *in vivo* production of terpenes followed by their analysis.<sup>12,16,23,24</sup>

The first approach is the most rigorous one as it allows an unambiguous functional assignment of the gene and the determination of new terpene structures. Often, purification and handling of the sensitive TSs are tedious and time consuming. In addition, the production of new terpenes for structural determination requires a sufficient quantity of pure enzyme. The second approach allows an efficient assignment of TS functions. However, it is only applicable for the analysis of TSs, whose homologs have been functionally described by an individual experiment. In exceptional cases, new functions of TS genes without any known homologue can be suggested. The function can be deduced by process of elimination, if all the other TSs in the same strain have functional homologs and can thus be identified.<sup>22</sup> Structures of new terpenes and functions of the corresponding genes avoiding the isolation and purification of TSs can be determined *via* the third approach. However, purification of single terpenes from terpene mixtures and a complex whole-cell matrix remains a challenge. In addition, FPP availability and sufficient expression of the TS in the recombinant host have to be guaranteed.

Here, based on our previous studies with the (+)-eremophilene synthase<sup>16</sup> and in analogy to previous studies with *Actinomyces*<sup>24</sup> we chose a combinatorial approach of the second and the third methods for the analysis of TSs from the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. The overexpression of TSs in *E. coli* allows an efficient production of terpenes for structural elucidation, and the volatile analysis of So ce56 reconfirms the occurrence of the terpenes *in vivo*.

The present work is based on gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses of the volatile sesquiterpenes emitted by *S. cellulosum* So ce56. For a detailed investigation of their biosynthesis, each of its TS genes has been overexpressed in an *E. coli* whole-cell system. Genes coding for mevalonate pathway enzymes (mevalonate kinase, diphosphomevalonate decarboxylase, phosphomevalonate kinase, isopentenylpyrophosphate isomerase) were simultaneously co-expressed to ensure a sufficient *in vivo* FPP supply. The corresponding terpene products have been analyzed by GC/MS and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and compared with the *S. cellulosum* volatiles to suggest reaction mechanisms. The genomes of all 27 myxobacterial species present in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)) and the Joint Genome Institute Integrated Microbial Genome Database (JGI-IMG, [img.jgi.doe.gov](http://img.jgi.doe.gov))

were investigated for orthologs of the So ce56 TS genes. Thus, the occurrence of certain sesquiterpenes in myxobacterial volatile compositions can be predicted.

## Results and discussion

### Volatiles from *S. cellulosum* So ce56

The volatiles of *S. cellulosum* have been trapped using a closed loop stripping apparatus (CLSA) from liquid cultures. GC/MS analysis of the volatile extract revealed 17 sesquiterpenes with masses of 202, 204, 222 Da (Fig. 1A) and the common myxobacterial sesquiterpene degradation product geosmin (182 Da). Most of the sesquiterpenes were identified *via* comparison of their mass spectra (MS) and gas chromatographic retention indices (*I*) with authentic standards (Table 1). (+)-Eremophilene (11),  $\delta$ -cadinene (17), 10-*epi*-cubebol (19), germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (26), and 1,10-di-*epi*-cubenol (28) were isolated and their structures proven by NMR spectroscopy. 10-*epi*- $\alpha$ -Cubebene (1) and 10-*epi*- $\beta$ -cubebene (2) have not been described before. Their mass spectra were similar to those of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cubebene, but their retention indices were about 40 units higher. A synthetic sample of 19 contained both 1 and 2 as minor water elimination products, proving the proposed structure.<sup>25</sup> Compound 13 could not be structurally determined. The most prominent peaks were 11, 17 and 19 (Fig. 1A). Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (26, 222 Da) is also among the most abundant sesquiterpenes. However, it appears only as a minor peak in Fig. 1 due to the low abundance of its 204 Da fragment.

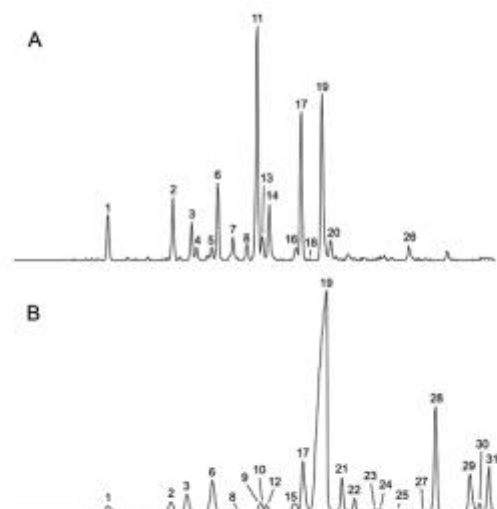


Fig. 1 Selected ion chromatogram (SIM) of sesquiterpenes with *m/z* 204. (A) The sesquiterpenes in the extract of volatiles of *S. cellulosum* So ce56; (B) the sesquiterpenes produced by sce6369 in *E. coli* whole-cell cultures.

**Table 1** Sesquiterpenes identified in an extract of volatiles of *S. cellulorum* So ce56 and the corresponding terpene synthase (TS) genes. ST: sesquiterpene, *I*: retention index, MS: mass spectrum, NMR: nmr spectrum, n.d.: no corresponding TS gene determined

|    | Sesquiterpenoid                              | <i>I</i> | Mass, empirical formula                | Identification                                | So ce56 extract | TS gene              |
|----|----------------------------------------------|----------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 1  | 10- <i>epi</i> - $\alpha$ -Cubebene          | 1395     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369              |
| 2  | 10- <i>epi</i> - $\beta$ -Cubebene           | 1440     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369              |
| 3  | Cadina-3,5-diene                             | 1453     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369 <sup>a</sup> |
| 4  | ( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesene             | 1456     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | n.d.                 |
| 5  | 7 $\beta$ H,10 $\beta$ H-Cadina-1(6),4-diene | 1460     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369 <sup>b</sup> |
| 6  | <i>cis</i> -Muurolo-4(15)5-diene             | 1469     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369              |
| 7  | $\gamma$ -Gurjunene                          | 1480     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | n.d.                 |
| 8  | Germaene D                                   | 1489     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369              |
| 9  | ST                                           | 1493     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS                                            |                 | sce6369              |
| 10 | ST alcohol                                   | 1495     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 11 | (+)-Eremophilene                             | 1496     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i> , NMR, <sup>16</sup> polarimetry | x               | sce8552 <sup>c</sup> |
| 12 | 10- <i>epi</i> -Zonarene                     | 1499     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  |                 | sce6369              |
| 13 | ST                                           | 1499     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS                                            | x               | n.d.                 |
| 14 | Bicyclogermaene                              | 1503     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369 <sup>b</sup> |
| 15 | Cubebol                                      | 1517     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i>                                  |                 | sce6369              |
| 16 | $\gamma$ -Cadinene                           | 1522     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369 <sup>b</sup> |
| 17 | $\delta$ -Cadinene                           | 1524     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i> , NMR                            | x               | sce6369              |
| 18 | <i>trans</i> -Calamenene                     | 1530     | 202, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369 <sup>b</sup> |
| 19 | 10- <i>epi</i> -Cubebol                      | 1537     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i> , NMR                            | x               | sce6369              |
| 20 | $\alpha$ -Cadinene                           | 1543     | 204, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | MS, <i>I</i>                                  | x               | sce6369 <sup>d</sup> |
| 21 | ST alcohol                                   | 1549     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 22 | ST alcohol                                   | 1558     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 23 | ST alcohol                                   | 1573     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 24 | ST alcohol                                   | 1576     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 25 | ST alcohol                                   | 1590     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 26 | Germa-1(10) <i>E</i> ,5 <i>E</i> -dien-11-ol | 1594     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i> , NMR                            | x               | sce1440              |
| 27 | ST alcohol                                   | 1609     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS                                            |                 | sce6369              |
| 28 | 1,10-di- <i>epi</i> -Cubebol                 | 1616     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i> , NMR                            |                 | sce6369              |
| 29 | T-Cadinol                                    | 1642     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i>                                  |                 | sce6369              |
| 30 | Cubanol                                      | 1649     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i>                                  |                 | sce6369              |
| 31 | $\alpha$ -Cadinol                            | 1655     | 222, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | MS, <i>I</i>                                  |                 | sce6369              |

<sup>a</sup> Reported here and in ref. 12. <sup>b</sup> These cadinanes and cubebanes have not been found in the sce6369 expressing *E. coli* extract, however, their occurrence can be reasonably deduced from the reaction mechanism. <sup>c</sup> Reported in ref. 16 and in ref. 12. <sup>d</sup> Reported only in ref. 12.

The newly described (+)-eremophilene (**11**) is the single product of the TS gene sce8552. Germa-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (**26**) appears in diverse bacterial strains together with geosmin. *In vivo* and *in vitro* conversion experiments with geosmin synthases revealed **26** as the typical sesquiterpene alcohol precursor of geosmin.<sup>13,26–30</sup> (+)- $\delta$ -Cadinene (**17**) has been identified as an intermediate of the phytoalexin gossypol in cotton (*Gossypium arboreum*), but it is also present in other plant species.<sup>31,32</sup> The cotton (+)- $\delta$ -cadinene synthase has been crystallized and its reaction mechanism has been extensively studied.<sup>5</sup> The enantiomer (–)-**17** has been isolated from fungi<sup>8,33</sup> and bacteria.<sup>34</sup> The termites *Reticulitermes flavipes* and *R. virginicus* both produce **17**, however, its absolute configuration has not been determined.<sup>35,36</sup> 10-*epi*-Cubebol (**19**) has been extracted from different plant species<sup>27,38</sup> and a stereospecific synthesis has been performed.<sup>25</sup> However, a bacterial source of **19** has not been described previously.

Interestingly, most of the *S. cellulorum* sesquiterpenes, including **17** and **19**, belong to the structural classes of cadalanes and cubebanes (Scheme 1B). Studies of promiscuous TSs have shown that these sesquiterpene classes are not only structurally closely related, but also share common biosynthetic mechanisms.<sup>22,39</sup>

#### Terpene synthases from *S. cellulorum* So ce56

Gene mining in *S. cellulorum* So ce56 revealed three putative type I TSs (sce1440, sce6369, sce8552) and one type II TS (sce4636).<sup>18</sup> In a previous study, we have functionally characterized the two-gene cluster consisting of the highly specific (+)-eremophilene synthase (sce8552) and the (+)-eremophilene oxidase CYP264B1 (sce8551).<sup>16</sup> Here, we additionally characterize the three other TSs regarding FPP conversion. Co-expression of the TS genes with mevalonate pathway genes in an *E. coli* based whole-cell catalyst yielded the corresponding sesquiterpenes after feeding mevalonolactone. In addition to GC/MS analyses of the *E. coli* extracts, the main products of each conversion were analyzed by NMR spectroscopy after purification.

In this study, the type II TS sce4636 did not give any product. Typically, this type of TSs convert the larger GGPP to diterpene derivatives, however rarely FPP.<sup>3</sup>

The amino acid sequence alignment of sce1440 shows high similarities with bifunctional germa-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol/geosmin synthases having twice the length of usual TSs, and containing two sets of each, the characteristic Mg<sup>2+</sup>-binding motif (DDxxD) and the NSE/DTE triad.<sup>37–39</sup> Sce1440 yielded exclusively **26**, without geosmin. Sequence analysis of sce1440

does not allow drawing conclusions on why half of the sequence seems inactive. The highly sensitive multi-step conversion of FPP to geosmin involves 26. However the germacr-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol/geosmin synthase activity and thus the observed intermediates and final product depend on various conditions like the pH and the nature of the divalent metal cation cofactor.<sup>27–30</sup> Therefore, we concluded that sce1440 acts as a germacr-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol/geosmin synthase.

Feeding mevalonolactone to a sce6369 expressing *E. coli* strain resulted in a mixture of 21 sesquiterpene products (Fig. 1B). Eight of them – mostly sesquiterpene alcohols – do not match any compound from mass spectral and retention index databases (Table 1, 9, 10, 21–25, 27). The thirteen structurally identified sesquiterpenes have all cadalane- and cubebene-type scaffolds with the exception of germacrene D (8) (Table 1 and Scheme 1B, 1, 2, 3, 6, 8, 12, 15, 17, 19, 28–31). The main product was identified as 10-*epi*-cubebol (19), which is also one of the major sesquiterpenoids in the *S. cellululosum* extract. Altogether, seven of the substances have been detected in both, the *S. cellululosum* whole cell extract and the sce6369 expressing *E. coli* culture (1, 2, 3, 6, 8, 17, and 19).

#### Reaction mechanism of cadalane- and cubebene-synthesis

At least eight out of 17 sesquiterpenes from *S. cellululosum* share common cadalane- and cubebene-skeletons. These scaffolds are closely related to each other (Scheme 1B). Indeed, sce6369 is a promiscuous enzyme, which produces 21 sesquiterpenes. The main products include the cubebanes 10-*epi*-cubebol (Fig. 1B, 19) and 1,10-di-*epi*-cubebol (28) as well as the cadalanes  $\delta$ -cadinene (17), T-cadinol (29) and  $\alpha$ -cadinol (31). However, only seven sesquiterpenes (1, 2, 3, 6, 8, 17, and 19) were present in both, the *S. cellululosum* So ce56 extract and the sce6369 expressing *E. coli* culture. Sce6369 is likely to produce different sets of sesquiterpenes when overexpressed in *E. coli* or in its native host *S. cellululosum* So ce56. TS-mediated reactions have shown to be highly sensitive and the selectivities of TSs strongly dependent on the plasticities of their active sites.<sup>40,41</sup> Furthermore, enzymatic derivatizations of the sesquiterpenes, for instance by one of the 21 cytochromes P450 in So ce56,<sup>16,42–48</sup> could lead to a change of volatility and, therefore, to a different sesquiterpene pattern in different host organisms.

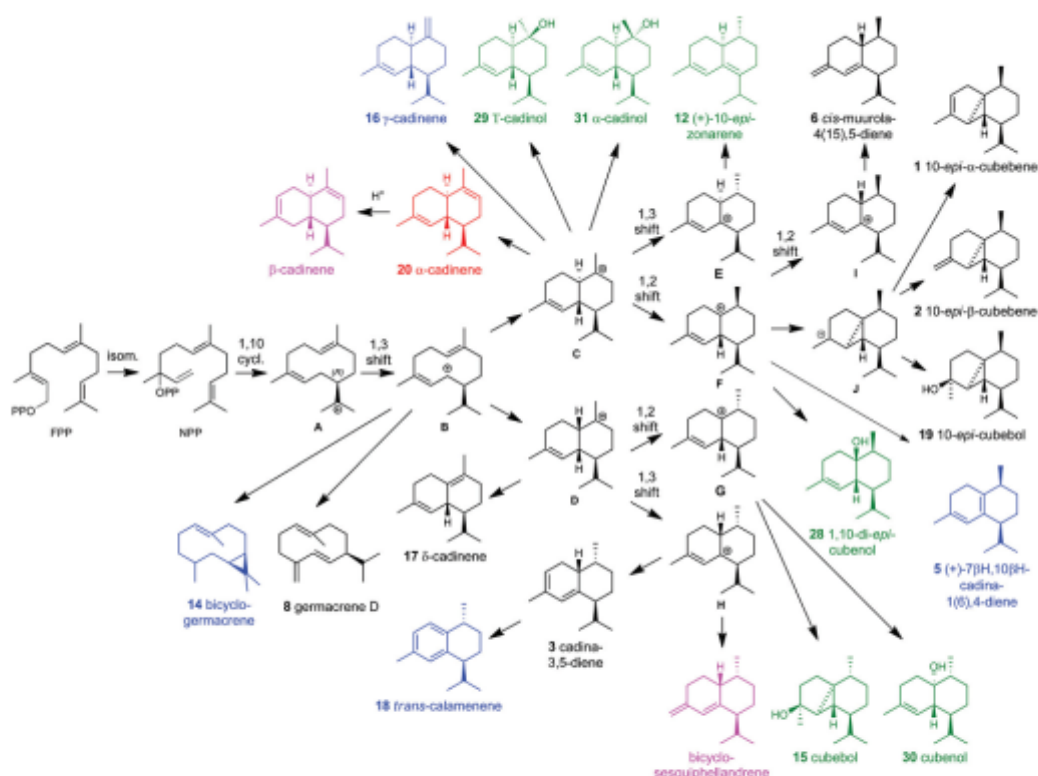
The early steps of FPP cyclization during the formation of cadalane and cubebene quiterpenes have been intensely investigated by theoretical calculations<sup>49</sup> and experimental data.<sup>4,20,50</sup> The promiscuous reactions show the involvement of common cationic intermediates. We thus could propose a comprehensive reaction mechanism, which explains the occurrence of all observed cadalanes and cubebanes in the volatile fraction of *S. cellululosum* So ce56 (Scheme 2, black, red and blue), in the sce6369 expressing in *E. coli* strain (Scheme 2, black and green), and, in addition, in the previously reported sce6369 expressing *S. avermitilis* strain (Scheme 2, pink and red).<sup>12</sup> A reaction mechanism including enantiomers of the terpene structures has been suggested and included as (ESI,† Scheme 1).

FPP isomerizes to NPP to enable the 1,10 cyclization to the germacradienyl cation (Scheme 2, A). The following 1,3-hydride shift to yield the allylic cation B is energetically favoured. B can directly undergo cyclopropanation to bicyclogermacrene (14) or terminal proton loss to germacrene D (8). An intramolecular nucleophilic attack of the 1,10 double bond in B continues the reaction cascade. The C–C bond formation leads either to a cadinane-type (C) or a muurolane-type (D) tertiary carbocation. The *trans*-decalin intermediate C is a branching point for the formation of the diastereomers T-cadinol (29) and  $\alpha$ -cadinol (31) by water quenching as well as the formation of  $\gamma$ -cadinene (16) and  $\alpha$ -cadinene (20) by hydrogen abstraction. The latter one can isomerize to  $\beta$ -cadinene (Scheme 2, pink) by de- and re-protonation. The *cis*-decalin intermediate D is deprotonated to  $\delta$ -cadinene (17). Hydride shifts of C and D lead to tertiary allylic cations (E and H) or tertiary carbocations (F and G), which are the key intermediates for the synthesis of cubebanes. Cation E can be deprotonated to (+)-10-*epi*-zonarene (12). Deprotonation of H gives bicyclosesquiphellandrene (Scheme 2, pink) or cadina-3,5-diene (3). The latter one can aromatize to *trans*-calamenene (18). Water quenching of G at C-4 gives the fully saturated cubebol (15). Water attack at C-1 leads to cubenol (30). The 1,2-hydride shift turning carbocation C into F involves the epimerization of the methyl group at C-10. This epimerization paves the way to the products 10-*epi*- $\alpha$ -cubebene (1), 10-*epi*- $\beta$ -cubebene (2), 7 $\beta$ H,10 $\beta$ H-cadina-1(6),4-diene (5), *cis*-muurola-4(15)5-diene (6), through proton abstraction and to the major products 10-*epi*-cubebol (19) and 1,10-di-*epi*-cubebol (28) through nucleophilic attack of water. The conversion of F to the final products 1, 2, 5, 6, 19, and 28, whether it is direct or over the intermediates I or J, proceeds always under retention of the stereochemistry at C-7 and C-10.

#### Screening for terpene synthase orthologs in myxobacterial genomes

Since myxobacteria possess a complex physiology and are considered as potential sources of novel natural products,<sup>51,52</sup> the inherited TS genes could have a multitude of influences on the biosynthesis of natural terpenoids. So far, only few studies on myxobacterial TSs and their products have been performed. Therefore, after the functional characterization of the *S. cellululosum* TSs ce1440, sce6369, and sce8552, we searched for homologue TSs in all 27 sequenced myxobacterial species available in the NCBI and the JGI-IMG genome databases.

We observed that the germacr-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol/geosmin synthases (sce1440) are widespread among myxobacteria and thus, orthologs with over 50% sequence identity and over 65% similarity have been identified in 15 out of the 27 myxobacterial species (ESI, Table 1 and Fig. 1†). Eight gene sequences related to the type II TS sce4636 were found in only four myxobacteria (ESI, Table 2 and Fig. 2†). Since sce4636 does not convert FPP, its homologs are not likely to contribute to the production of sesquiterpenes in myxobacteria. The 10-*epi*-cubebol synthase (sce6369) has seven homologous genes with sequence identities between 24% and 34% (similarities



**Scheme 2** Proposed mechanism for the biosynthesis of cadalane- and cubebene-type sesquiterpenes by sce6369; sesquiterpenes observed in *S. cellulosum* and the sce6369 expressing *E. coli* strain are represented in black; sesquiterpenes observed only in *S. cellulosum* are represented in blue; sesquiterpenes observed only in the sce6369 expressing *E. coli* strain are represented in green; sesquiterpenes observed in *S. cellulosum* and the sce6369 expressing *Streptomyces avermitilis* SUKA22<sup>12</sup> are represented in red; sesquiterpenes observed only in the sce6369 expressing *S. avermitilis* SUKA22<sup>12</sup> are represented in pink; cadina-3,5-diene (3) was observed in *S. cellulosum* as well as both *E. coli* and *S. avermitilis* SUKA22 expressing sce6369.<sup>12</sup>

from 38% to 47%) within myxobacterial genomes (ESI, Table 3 and Fig. 3†). The (+)-eremophilene synthase (sce8552) shares 68.9% identity (81.2% similarity) with a gene from the related *S. cellulosum* strain So0157-2. Sequence identities with the other twelve related genes range in between 22% and 30% (similarities between 37% and 47%) (ESI, Table 4 and Fig. 4†).

Functional orthologs of the 10-*epi*-cubebol synthase and (+)-eremophilene synthase from other strains have not been described yet. However, various TSs producing cubebene- and cadalane-type compounds have been characterized in *actinomycetes*.<sup>53</sup> The genes include *epi*-cubebol synthase (*Streptomyces roseum* DSM 43021)<sup>54</sup> *epi*-cubenol synthase (*Streptomyces griseus*),<sup>4,55</sup>  $\delta$ -cadinene synthase (*Streptomyces clavuligerus*),<sup>54</sup>  $\gamma$ -cadinene synthase (*Chitinophaga pinensis* DSM 2588),<sup>24</sup> T-murolol synthases (*S. clavuligerus*, *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941)<sup>12,24,34</sup> In addition, studies of the myxobacterium *Chondromyces crocatus* showed the presence of

(+)-eremophilene (11), cubenol (30) and other cadalanes (cadina-1,4-diene,  $\alpha$ -murolene, zonarene) among the volatiles.<sup>56</sup> Its genes related to 10-*epi*-cubebol synthase (WP\_050430829) and (+)-eremophilene synthase (WP\_012241161) are considered to be highly promising candidates for the synthesis of the corresponding terpenes. Taken together, this data provides the availability of sets of different TSs which can be used for biotechnological purposes. However, experimental analyses of these TSs and their products are necessary to assign the gene functions.

## Conclusions

We used a combined approach to assign the sesquiterpenes present in *Sorangium cellulosum* So ce56 to their corresponding genes: Besides the direct analysis of the myxobacterial

volatiles, each of the four TSs (sce1440, sce4636, sce6369, and sce8552) was individually overexpressed in *E. coli*. Simultaneous co-expression of the mevalonate pathway genes provided FPP as a TS substrate *in vivo*.

Out of the 17 sesquiterpenes identified among the volatiles of the myxobacterium (Fig. 1A and Table 1), (+)-eremophilene (11) and germacradienol (26) could be unambiguously assigned as products of their corresponding specific TSs sce8552<sup>16</sup> and sce1440, respectively. Among the remaining sesquiterpenes, mainly of the cadalane- and cubebene-type, seven (1, 2, 3, 6, 8, 17, and 19) were observed in the extract of the sce6369 overexpressing *E. coli* strain identifying this TS as the most versatile one of So ce56. 10-*epi*-Cubebol (19), the main product of sce6369 and also one of the most abundant terpenes in the cell extract of So ce56, designates the enzyme function. In contrast,  $\alpha$ -cadinene (20) was previously detected in a sce6369 overexpressing *S. avermitilis* strain along with cadina-3,5-diene (3),  $\beta$ -cadinene, and bicyclosesquiphellandrene.<sup>12</sup> This difference in the product spectrum of sce6369 might be due to conformational changes of the enzyme in different environments. As shown before, TS selectivities are strongly dependent on the plasticities of the enzyme's active sites. Another possibility for the observed differences in the product patterns could be subsequent reactions catalyzed by autologous enzymes of the various expression strains. To the best of our knowledge, differences in the product spectrum of the same TS, overexpressed in different hosts have not been reported yet and, thus, should be investigated in more detail.

Furthermore, a comprehensive reaction mechanism could be established, which explains the formation of all observed cadalanes including 5, 16, and 18, as well as germacranes 8 and 14 by sce6369 (Scheme 2). The formation of (*E*)- $\beta$ -farnesene (4),  $\gamma$ -gurjunene (7)<sup>27</sup> and the unidentified sesquiterpene 13 could not be related to any of the examined TS.

Besides the previously described specific (+)-eremophilene synthase (sce8552),<sup>16</sup> sce1440 was characterized as a germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol/geosmin synthase, whereas sce4363 does not convert FPP. Thus, sce6369 is the first described, however, highly promiscuous 10-*epi*-cubebol (19) synthase. Volatile analysis has shown, that *C. crocatus* is the only investigated myxobacterium besides *S. cellulosum* that produces (+)-eremophilene (11) and cadalanes.<sup>26</sup> As shown by our bioinformatics analyses, orthologs of sce6369 and sce8552 might be involved in their synthesis. Further analyses will show if the sesquiterpene synthases in *Sorangium cellulosum* So ce56 are unique throughout the bacterial kingdom or if other strains are able to shape FPP to the same compounds.

## Experimental

### GC/MS analysis of the *S. cellulosum* So ce56 volatiles and the *E. coli* whole-cell conversion extracts

The strain So ce 56 was grown in liquid MD 1 medium as described before.<sup>14</sup> A closed-loop-stripping-apparatus (CLSA)

was used to collect the volatiles during 24 h. The volatile fraction was then analyzed by GC/MS, according to the method of Fuhlendorff *et al.*<sup>56</sup>

Terpene production in *E. coli* C43(DE3) cells transformed with pAC-Mv\_sce1440, pAC-Mv\_sce4636, or pAC-Mv\_sce6369 and sampling was conducted as described previously.<sup>16</sup> Online GC/MS analyses of the *E. coli* extracts to observe the occurrence of terpenes was carried out on a GC/MS (Focus GC/DSQ II, Thermo Scientific) equipped with a HP-5 ms capillary column (25 m  $\times$  0.32 mm i.d., 0.52  $\mu$ m film, Agilent) using the previously described conditions.<sup>16</sup> GC/MS analyses for structural determination of the terpenes were conducted according to the method of Fuhlendorff *et al.*<sup>56</sup>

### Bioinformatic analysis and molecular cloning of the TS genes

The coding sequences for the TSs sce1440, sce4636, sce6369, and sce8552 were identified previously.<sup>18</sup> The sequences for sce1440, sce4636, and sce6369 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA of *S. cellulosum* So ce56 using primers:

sce1440 forward primer (5'-cca atcatatgt cat ctgcatgaacta gcg-3') and reverse primer (5'-ccaataagctttcag tgatggtgatggtgagtcacgcgcacgatca-3').

sce4636 forward primer (5'-ccaatcatatgtcatctgcatgaactagcg-3') and reverse primer (5'-ccaataagctttcagtgatggtgatggtgagtcacgcgcacgatca-3').

sce6369 forward primer (5'-ccaatcatatgtcatctgcatgaactagcg-3') and reverse primer (5'-ccaataagctttcag tgatggtgatggtgagtcacgcgcacgatca-3').

The purified PCR products were inserted into vector pCR™-Blunt II-TOPO® using the Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen). The *E. coli* expression vectors pAC-Mv\_sce1440, pAC-Mv\_sce4636, and pAC-Mv\_sce6369 were constructed using the *Nde*I and *Hind*III restriction sites in analogy to pAC-MvGo (containing sce8552) from pAC-Mv as described by Schiffrin *et al.*<sup>16</sup>

### Product purification and NMR characterization

Products for purification were obtained from *in vivo* conversions and a total reaction volume of 1.9 L.  $\delta$ -Cadinene (17), 10-*epi*-cubebol (19) and germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (26) were purified on silica gel with isocratic eluent mixtures of *n*-hexane and ethyl acetate (9:1). Fractions containing the products were identified *via* TLC in a solvent tank containing the same eluent and stained with anisaldehyde.

1,10-di-*epi*-Cubebol (28) was purified using a setup produced by Waters (Eschborn, Germany) containing a 2767 Sample Manager, a 2545 binary gradient pump, a 2998 PDA detector and a 3100 electron spray mass spectrometer. After separation the solvent flow has been split using a flow splitter and a 515 HPLC pump for makeup flow. Water containing 0.1% formic acid and acetonitrile containing 0.1% formic acid were used as solvents for the analysis and separation. A Waters X-Bridge column (C18, 150  $\times$  19 mm, 5  $\mu$ m) has been used with a flow of 20 mL min<sup>-1</sup> for the separation. A gradient of

60% to 95% acid containing acetonitrile in eight minutes has been applied.

The obtained products were used for NMR characterization. The NMR spectra of the products were recorded in CDCl<sub>3</sub> with a Bruker DRX 500 NMR spectrometer. All chemical shifts are relative to CHCl<sub>3</sub> at  $\delta = 7.26$  (<sup>1</sup>H-NMR) or CDCl<sub>3</sub> at  $\delta = 77.00$  (<sup>13</sup>C-NMR) using the standard  $\delta$  notation in parts per million.

#### Genome mining of myxobacteria for terpene synthases

The homologues of the terpene synthase encoding open reading frames (ORFs) of respective synthase genes from *Sorangium cellulosum* So ce56 were obtained by comparing the published genomic sequences of the myxobacteria *Anaeromyxobacter* (BAZG000000000), *Myxococcus xanthus* DK 1622 (NC\_008095), *Sorangium cellulosum* So0157-2 (NC\_010162.1), *Myxococcus fulvus* HW-1 (NC\_015711.1), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C (NC\_007760.1), *Haliangium ochraceum* (NC\_013440.1), *Plesiocystis pacifica* (NZ\_ABCS000000000.1), *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (NC\_014623.1), *Byssosvorax cruenta* (BBEO000000000.1), *Cystobacter violaceus* Cb vi76 (NZ\_JPMI000000000.1), *Corallococcus* (CBAX000000000.1), *Myxococcus* (NZ\_CP012109.1), *Myxococcus stipitatus* DSM 14675 (NC\_020126.1), *Cystobacter fuscus* DSM 2262 (NZ\_ANAH000000000.2), *Chondromyces apiculatus* DSM 436 (NZ\_ASRX000000000.1), *Corallococcus coralloides* DSM 2259 (NC\_017030.1), *Myxococcales bacterium* SG8\_38 (LJTN000000000.1), *Myxococcales bacterium* SG8\_38\_1 (LJTO000000000.1), *Labiliithrix luteola* (CP012333.1), *Vulgatibacter incomptus* (NZ\_CP012332.1), *Chondromyces crocatus* (NZ\_CP012159.1), *Archangium gephyra* (NZ\_CP011509.1), *Sandaracinus amylolyticus* (NZ\_CP011125.1), *Hyalangium minutum* (NZ\_JMCB000000000.1), and *Enhygromyxa salina* (JMCC000000000.2).

The homologues of the genes were searched using the global NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) or the DOE Joint Genome Institute database (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>). Thus obtained homologous protein sequences were aligned using CLUSTAL W<sup>58</sup> and the radial view of an unrooted phylogenetic tree was obtained by MEGA4 (version 4.0)<sup>59</sup> analysis for the determination of relatedness of the TSs from *Sorangium cellulosum* So ce56 with the TSs from other myxobacterial species.

**$\delta$ -cadinene (17).** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.77, d,  $J = 6.9$  Hz, 3H and 0.94, d,  $J = 6.9$  Hz, 3H (H-12 and H-13); 1.03, m (H-7); 1.15, m (H-8a); 1.59, m (H-8b); 1.63, s, 3H (H-14); 1.65, s, 3H (H-15); 2.06–1.84, m, 6H (H-11, H-9a, H-9b, H-3a, H-3b, H-2a); 2.50, br d,  $J = 9.5$  Hz (H-6); 2.69, ddd,  $J = 12.8, 4.7$  and 2.5 Hz (H-2b); 5.43, m (H-5). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  15.7 and 21.8 (C-12 and C-13); 18.5 (C-14); 21.2 (C-8); 23.6, (C-15); 26.7 and 26.8 (C-2 and C-11); 32.0 and 32.3 (C-3 and C-9); 39.5 (C-6); 45.4 (C-7); 124.5 (C-10); 124.7 (C-5); 129.9 (C-1); 134.2 (C-4).

**10-*epi*-Cubebol (19).** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.77, t,  $J = 2.9$  Hz (H-6); 0.92, m (H-5); 0.92, d,  $J = 6.7$  Hz, 3H and 0.95, d,  $J = 6.7$  Hz, 3H (H-12 and H-13); 0.97, d,  $J = 6.8$  Hz, 3H (H-14); 1.03–1.09, m (H-8a); 1.13–1.16, m (H-8b); 1.21–1.26, m (H-7); 1.28, d,  $J = 0.7$  Hz, 3H (H-15); 1.30–1.35, m, 2H (H-2);

1.33, m (H-3a); 1.52, m (H-9a); 1.53, m (H-3b); 1.63, m (H-11); 1.73, m (H-9b); 1.92, m (H-10). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  17.4 (C-14); 19.2 and 19.9 (C-12 and C-13); 19.6 (C-8); 20.8 (C-6); 28.0, (C-15); 29.3 (C-2 and C-10); 30.8 (C-9); 32.9 (C-1); 33.7 (C-11); 36.4 (C-3); 41.1 (C-5); 42.4 (C-7); 80.3 (C-4).

**Germacrene-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (26).** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.22, d,  $J = 2.0$  Hz, 3H and 1.32, d,  $J = 2.0$  Hz, 3H (H-12 and H-13); 1.25, d,  $J = 6.9$  Hz, 3H (H-15); 1.33–1.42, m, (H-8a); 1.61–1.66, m, (H-8b); 1.69, br s, 4H (H-14 and H-3a); 1.81–1.88, m, (H-8b); 2.04, br d,  $J = 14.8$  Hz (H-2a); 2.33–2.43, m, 3H (H-7 and H-9); 2.54, m, (H-2b); 2.57, m, (H-4); 5.13, m, (H-6); 5.17, d,  $J = 11.6$  Hz (H-1); 5.80, d,  $J = 16.0$  Hz (H-5). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  14.7 (C-15); 16.7 (C-14); 22.0 (C-2), 23.7 (C-8); 26.2 and 26.8 (C-12 and C-13); 32.7 (C-3); 33.8 (C-4); 41.2 (C-9); 58.9 (C-7); 71.9 (C-11); 123.6 (C-6); 130.6 (C-1); 131.1 (C-10); 143.3 (C-5).

**1,10-di-*epi*-Cubebol (28).** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.84, d,  $J = 6.9$  Hz, 3H and 0.90, d,  $J = 6.9$  Hz, 3H (H-12 and H-13); 1.01, d,  $J = 7.1$  Hz, 3H (H-14); 1.13, sept,  $J = 4.9$  (H-7); 1.30–1.32, m, 2H (H-2); 1.35–1.41, m (H-8a); 1.48–1.53, m, 2H (H-9); 1.68, s, 3H (H-15); 1.78, m (H-10); 1.96–2.00, m (H-3a and H-11); 2.05, m (H-6); 2.09–2.18, m, 2H (H-3b and H-8b); 5.36, m, (H-1). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  13.9 (C-14); 16.6 and 21.8 (C-12 and C-13); 18.9 (C-2); 23.4 (C-15); 27.2 (C-11); 27.8 (C-3); 28.5 (C-9); 31.2 (C-8); 37.1 (C-10); 41.8 (C-6); 49.1 (C-7); 72.3 (C-1); 123.3 (C-5); 133.7 (C-4).

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R. B. (Be1343/23). The authors want to express their gratitude to Reiner Wintringer (Universität des Saarlandes, Bioanalytik) for help with the GC/MS measurements, to Dr Carsten Börger (PharmBioTec GmbH) for purification of 1,10-di-*epi*-cubebol, and to Dr Josef Zapp (Universität des Saarlandes, Pharmazie) for NMR measurements. We thank N. Misawa for providing the plasmid pAC-Mv and D. M. Hodgson for an authentic sample of 10-*epi*-cubebol.

## References

- D. W. Christianson, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3412–3442.
- D. J. Miller and R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.*, 2012, **29**, 60–71.
- Y. Gao, R. B. Honzatko and R. J. Peters, *Nat. Prod. Rep.*, 2012, **29**, 1153–1175.
- D. E. Cane, M. Tandon and P. C. Prabhakaran, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 8103–8106.
- X.-Y. Chen, Y. Chen, P. Heinstein and V. J. Davisson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **324**, 255–266.
- C. L. Steele, J. Crock, J. Bohlmann and R. Croteau, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 2078–2089.
- B. Felicetti and D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7212–7221.

- 8 S. Agger, F. Lopez-Gallego and C. Schmidt-Dannert, *Mol. Microbiol.*, 2009, **72**, 1181–1195.
- 9 C. A. Citron, L. Barra, J. Wink and J. S. Dickschat, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 2673–2683.
- 10 D. E. Cane and H. Ikeda, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 463–472.
- 11 C. A. Citron and J. S. Dickschat, *Synlett*, 2014, 766–782.
- 12 Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D. E. Cane and H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**, 857–862.
- 13 J. S. Dickschat, H. B. Bode, T. Mahmud, R. Müller and S. Schulz, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 5174–5182.
- 14 J. S. Dickschat, T. Nawrath, V. Thiel, B. Kunze, R. Müller and S. Schulz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 8287–8290.
- 15 N. L. Brock, S. R. Ravella, S. Schulz and J. S. Dickschat, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 2100–2104.
- 16 A. Schiffrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri and R. Bernhardt, *ChemBioChem*, 2015, **16**, 337–344.
- 17 S. Schneiker, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, H. B. Bode, C. J. Bolten, J. V. Choudhuri, S. Doss, Y. A. Elnakady, B. Frank, L. Gaigalat, A. Goessmann, C. Groeger, F. Gross, L. Jelsbak, J. Kalinowski, C. Kegler, T. Knauber, S. Konietzny, M. Kopp, L. Krause, D. Krug, B. Linke, T. Mahmud, R. Martinez-Arias, A. C. McHardy, M. Merai, F. Meyer, S. Mormann, J. Munoz-Dorado, J. Perez, S. Pradella, S. Rachid, G. Raddatz, F. Rosenau, C. Ruckert, F. Sasse, M. Scharfe, S. C. Schuster, G. Suen, A. Treuner-Lange, G. J. Velicer, F. J. Vorholter, K. J. Weissman, R. D. Welch, S. C. Wenzel, D. E. Whitworth, S. Wilhelm, C. Wittmann, H. Blöcker, A. Pühler and R. Müller, *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**, 1281–1289.
- 18 Y. Yamada, D. E. Cane and H. Ikeda, in *Methods in Enzymology*, ed. A. H. David, Academic Press, 2012, vol. 515, pp. 123–162.
- 19 P. Baer, P. Rabe, K. Fischer, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, M. Groll and J. S. Dickschat, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 7652–7656.
- 20 D. E. Cane and M. Tandon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 5602–5603.
- 21 P. Rabe, L. Barra, J. Rinkel, R. Riclea, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, A. Janusko and J. S. Dickschat, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 13448–13451.
- 22 P. Rabe, C. A. Citron and J. S. Dickschat, *ChemBioChem*, 2013, **14**, 2345–2354.
- 23 H. Harada, F. Yu, S. Okamoto, T. Kuzuyama, R. Utsumi and N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **81**, 915–925.
- 24 P. Rabe and J. S. Dickschat, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 1810–1812.
- 25 D. M. Hodgson, S. Salik and D. J. Fox, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 2157–2168.
- 26 D. Spiteller, A. Jux, J. Piel and W. Boland, *Phytochemistry*, 2002, **61**, 827–834.
- 27 D. E. Cane and R. M. Watt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 1547–1551.
- 28 D. E. Cane, X. He, S. Kobayashi, S. Omura and H. Ikeda, *J. Antibiot.*, 2006, **59**, 471–479.
- 29 J. Jiang, X. He and D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8128–8129.
- 30 J. Jiang, X. He and D. E. Cane, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, **3**, 711–715.
- 31 X. Xie, J. Kirby and J. D. Keasling, *Phytochemistry*, 2012, **78**, 20–28.
- 32 P. Schreier, F. Drawert and A. Junker, *Z. Lebensm. - Unters. Forsch.*, 1976, **160**, 271–274.
- 33 D. E. Cane, B. J. Rawlings and C. C. Yang, *J. Antibiot.*, 1987, **40**, 1331–1334.
- 34 Y. Hu, W. K. W. Chou, R. Hopson and D. E. Cane, *Chem. Biol.*, 2011, **18**, 32–37.
- 35 L. Zalkow, R. Howard, L. Gelbaum, M. Gordon, H. Deutsch and M. Blum, *J. Chem. Ecol.*, 1981, **7**, 717–731.
- 36 R. Bartelt, A. Cossé, B. Zilkowski, D. Weisleder and F. Momany, *J. Chem. Ecol.*, 2001, **27**, 2397–2423.
- 37 J.-J. Filippi, E. Belhassen, N. Baldovini, H. Brevard and U. J. Meierhenrich, *J. Chromatogr., A*, 2013, **1288**, 127–148.
- 38 T. Hieda, M. Tazaki, Y. Morishita, T. Aoki and S. Nagahama, *Phytochemistry*, 1996, **42**, 159–162.
- 39 F. Lopez-Gallego, S. A. Agger, D. Abate-Pella, M. D. Distefano and C. Schmidt-Dannert, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 1093–1106.
- 40 J. Degenhardt, T. G. Köllner and J. Gershenzon, *Phytochemistry*, 2009, **70**, 1621–1637.
- 41 K. Zhou and R. J. Peters, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 4074–4080.
- 42 K. M. Ewen, F. Hannemann, Y. Khatri, O. Perlova, R. Kappl, D. Krug, J. Hüttermann, R. Müller and R. Bernhardt, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 28590–28598.
- 43 Y. Khatri, F. Hannemann, K. M. Ewen, D. Pistorius, O. Perlova, N. Kagawa, A. O. Brachmann, R. Müller and R. Bernhardt, *Chem. Biol.*, 2010, **17**, 1295–1305.
- 44 A. Schiffrin, M. Litzenburger, M. Ringle, T. Ly Thi Bich and R. Bernhardt, *ChemBioChem*, 2015, **16**, 2624–2632.
- 45 T. B. Ly, Y. Khatri, J. Zapp, M. Hutter and R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **95**, 123–133.
- 46 M. Litzenburger, F. Kern, Y. Khatri and R. Bernhardt, *Drug Metab. Dispos.*, 2015, **43**, 392–399.
- 47 F. Kern, T. K. F. Dier, Y. Khatri, K. M. Ewen, J.-P. Jacquot, D. A. Volmer and R. Bernhardt, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 14881.
- 48 M. Litzenburger and R. Bernhardt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, DOI: 10.1007/s00253-015-7269-7.
- 49 M. W. Lodewyk, P. Gutta and D. J. Tantillo, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 6570–6579.
- 50 D. Arigoni, *Pure Appl. Chem.*, 1975, **41**, 219.
- 51 Y. Khatri, F. Hannemann, O. Perlova, R. Müller and R. Bernhardt, *FEBS Lett.*, 2011, **585**, 1506–1513.
- 52 S. C. Wenzel and R. Müller, *Nat. Prod. Rep.*, 2009, **26**, 1385–1407.
- 53 J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.*, 2016, **33**, 87–110.

- 54 J. S. Dickschat, K. A. K. Pahirulzaman, P. Rabe and T. A. Klapschinski, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 810–814.
- 55 C. Nakano, T. Tezuka, S. Horinouchi and Y. Ohnishi, *J. Antibiot.*, 2012, **65**, 551–558.
- 56 S. Schulz, J. Fuhlendorff and H. Reichenbach, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 3863–3872.
- 57 C. O. Schmidt, H. J. Bouwmeester, N. Bülow and W. A. König, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **364**, 167–177.
- 58 J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 4673–4680.
- 59 K. Tamura, J. Dudley, M. Nei and S. Kumar, *Mol. Biol. Evol.*, 2007, **24**, 1596–1599.

## 4. Weitere Ergebnisse

Neben den bereits publizierten und unter Kapitel 3 reproduzierten Daten wurden weitere Experimente durchgeführt, die eine Grundlage für aufbauende Forschungen und daraus resultierende Publikationen sind. Insbesondere wurden weitere Oxidationen von Sesquiterpenen durch CYP264B1 (Kap. 4.1) sowie Docking-Studien (Kap. 4.4) durchgeführt, um weitere Aussagen über Struktur-Funktions-Beziehungen bei CYP264B1-katalysierten Reaktionen treffen zu können. Alle neuen Sesquiterpene sowie oxidierten Sesquiterpenoide wurden olfaktorisch evaluiert, um den Einfluss der Stereochemie von Enantiomeren sowie selektiven Hydroxylierungen auf Geruch von Sesquiterpenen zu untersuchen (Kap. 4.2). Darüber hinaus wurden weitere P450s aus *S. cellulorum* So ce56 identifiziert, die das natürliche CYP264B1-Substrat (+)-Eremophilan ebenfalls umsetzen können (Kap. 4.3). Diese Analysedaten können in Zukunft bei der Suche von (+)-Eremophilenderivaten in *S. cellulorum* behilflich sein.

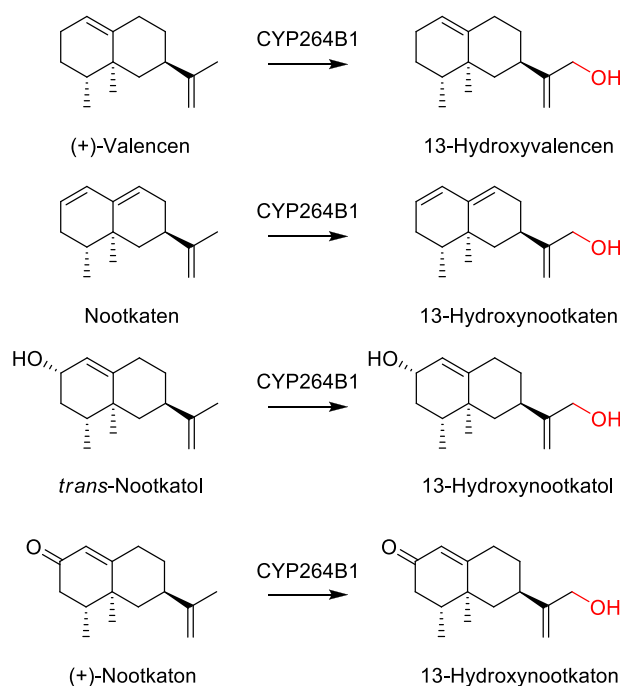
### 4.1 Umsätze von Sesquiterpenen mit CYP264B1

Die unter Kapitel 3.2 (Publikation „Novel Sesquiterpene Oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulorum* So ce56“) dargestellten Ergebnisse enthalten die Umsätze der Sesquiterpenklassen der Eremophilane ((+)-Valencen, (+)-Nootkaton), Humulane ( $\alpha$ -Humulen, Zerumbon), Caryophyllane ( $\beta$ -Caryophyllen) und Cedrane ( $\alpha$ -Cedren). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zusätzlich die Eremophilane (+)-Nootkaton und *trans*-Nootkatol mit CYP264B1 umgesetzt werden. Die Hauptprodukte wurden gereinigt und mit Hilfe von NMR und GC/MS als 13-Hydroxynootkaton und 13-Hydroxynootkatol identifiziert. Ungeachtet der Anzahl der Doppelbindungen im Decalin-Bicyclus (zwei Doppelbindungen bei Nootkaton, eine bei allen anderen) sowie der Oxidationsstufe des C-2-Atoms ( $\text{CH}_2$  bei (+)-Valencen, CH bei Nootkaton, C-OH bei *trans*-Nootkatol; C=O bei (+)-Nootkaton) wurden alle Eremophilane vorwiegend an Position C-13 hydroxyliert (Schema 10).

**13-Hydroxynootkaton:**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.86 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H ;H-15), 0.90 (s, 3H ;H-14), 1.21 (m, 1H ;H-6a), 1.52 (m, 1H; H-4), 1.75 (m, 1H; H-6b), 1.94-2.02 (m, 2H ;H-3), 2.33 (t,  $J$  = 7.5, 2H; H-8), 2.49, (m, 1H; H-7), 4.16 (s, 2H; H-13), 4.93 (s, 1H; H-12a), 5.07 (s, 1H; H-12b), 5.40 (m, 1H; H-9), 5.58 (m, 1H; H-2), 5.94 ppm (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H; H-1);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 14.7 (C-15), 17.3 (C-14), 32.2 (C-3), 33.3 (C-7), 33.4 (C-8), 36.4 (C-5), 38.8 (C-4), 40.6 (C-6), 65.2 (C-13), 108.1 (C-12), 122.3 (C-9), 125.9 (C-2), 128.6 (C-1) 141.9 (C-10), 153.9 ppm (C-11).

**13-Hydroxynootkatol:**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.86 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H ;H-15), 0.97 (s, 3H ;H-14), 1.21 (m, 1H ;H-8a), 1.30 – 1.53 (m, 3H; H-3a, H-4, H-6a), 1.73 – 1.90 (m, 4H; H-3b, H-6b, H-8b, H-9a), 2.10 (m, 1H ;H-9b), 2.31 (m, 2H; H-7, OH), 4.09 (s, 2H; H-13), 4.20-4.24 (m, 1H; H-2), 4.84 (s, 1H; H-12a), 5.00 (s, 1H; H-12b), 5.32 ppm (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H; H-1) ;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 15.5 (C-14), 18.3 (C-15), 32.5 (C-8), 33.5 (C-9), 36.7 (C-7), 37.3 (C-3), 38.4 (C-5), 39.3 (C-4), 45.2 (C-6), 65.3 (C-13), 68.1 (C-2), 108.4 (C-12), 124.6 (C-1), 145.8 (C-10), 153.7 ppm (C-11).

NMR Spektren von 13-Hydroxynootkaten und 13-Hydroxynootkatol sind im Anhang unter Abbildungen 56 – 67 zu finden.



**Schema 10:** Hydroxylierungen der Eremophilan-Sesquiterpene durch CYP264B1.

## 4.2 Olfaktorische Analysen neuer Sesquiterpene

Volatile Terpene pflanzlichen Ursprungs finden als Gemische in ätherischen Ölen oder in Reinstform als Riechstoffe in der Parfümerie Verwendung (Breitmaier 2008). Bis auf Geosmin (<https://etatlibredorange.com/shop/hermann-a-mes-cotes> (2016)(2016)) haben bakterielle Terpene in diesem Industriezweig noch keine Anwendung gefunden. Um ihre Eignung als Riechstoffe zu testen, wurden die neuen bakteriellen Sesquiterpenenantiomere (+)-Eremophilen und (–)- $\delta$ -Cadinen sowie die oxidierten Sesquiterpene 13-Hydroxyvalencen, 13-Hydroxynootkaten, 13-Hydroxynootkatol, 5-Hydroxyhumulen, 5-Hydroxycaryophyllen, 5-Hydroxyzerumbon, zwei Isomere von 6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbon und 5-Hydroxy-3(4)-cedren durch ein Team von drei Sensorikexperten unter der Leitung von Dr. Felix Flachsmann (Givaudan SA) per

GC/Olfaktometrie (GC/O) analysiert. Die Ergebnisse der olfaktorischen Studien der getesteten Terpene sind in Tabelle 3 dargestellt.

Für die Parfümerie interessante neue Duftnoten zeigen eine hohe Geruchsintensität bei einer effektiven Konzentration von maximal 10 ng/L Luft. Die verwendete Methode der GC/O stellt die Verdampfung der getesteten Substanzen sicher und hilft durch die chromatographische Trennung auch aus einem Gemisch die Gerüche reiner Substanzen zu erfassen. Alle getesteten Substanzen wurden im Sniffing Port auf effektive Konzentrationen von 500 ng/L Luft eingestellt und waren damit um den Faktor 50 über dem maximalen Grenzwert für Riechstoffanwendungen interessanter Substanzen. Alle untersuchten Sesquiterpene wurden – mit Ausnahme von 13-Hydroxynootkatol (Balsam, Styrax, Weihrauch, Ghee, Tab. 3, Zeile 5) und 5-Hydroxyzerumbon (Teer, fruchtig, fettig, Tab. 3, Zeile 8) – als geruchlos getestet. Keines der getesteten Moleküle weist Geruchsqualitäten auf, die als interessant für Anwendungen in der Parfümerie befunden wurden.

**Tabelle 3:** Übersicht über die sensorischen Analysen von Sesquiterpenen aus *S. cellulsum* So ce56, mit Cytochromen P450 oxidierten Sesquiterpenen und ihre Geruchsqualitäten.

\* Obwohl der Autor viele der beschriebenen Moleküle selbst sensorisch getestet hat, sind Geruchsbeschreibungen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Sensorikexperten überlassen.

|    | Sesquiterpene aus <i>S. cellulsum</i> So ce56 | Geruch*                         |
|----|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| 1  | (+)-Eremophilen                               | geruchlos                       |
| 2  | (-)- $\delta$ -Cadinen                        | geruchlos                       |
|    | Oxidationsprodukte von CYP264B1               |                                 |
| 3  | 13-Hydroxyvalencen                            | geruchlos                       |
| 4  | 13-Hydroxynootkaten                           | geruchlos                       |
| 5  | 13-Hydroxynootkatol                           | Balsam, Styrax, Weihrauch, Ghee |
| 6  | 5-Hydroxyhumulen                              | geruchlos                       |
| 7  | 5-Hydroxycaryophyllen                         | geruchlos                       |
| 8  | 5-Hydroxyzerumbon                             | Teer, fruchtig, fettig          |
| 9  | 6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbon       | geruchlos                       |
| 10 | 6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbon       | geruchlos                       |
| 11 | 5-Hydroxy-3(4)-cedren                         | Geruchlos                       |

### 4.3 Umsätze von (+)-Eremophilen mit Cytochromen P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56

In Kapitel 3.1 (Publikation „Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation”) wurde die postulierte Funktion von CYP264B1 als (+)-Eremophilenhydroxylase mit Hilfe von *in vitro* Experimenten und in *E. coli* Ganzzellsystemen bestätigt. Im Extrakt von *S. cellulosum* So ce56 wurden jedoch keine Derivatisierungsprodukte von (+)-Eremophilen nachgewiesen. Zur Kontrolle, ob CYP264B1 als einziges P450 aus *S. cellulosum* So ce56 (+)-Eremophilen oxidieren kann, wurden mit allen P450s, die in ausreichenden Konzentrationen exprimiert und gereinigt werden konnten (neun von insgesamt 21), *in vitro* Umsätze von (+)-Eremophilen durchgeführt und mit GC/MS analysiert. In der nachfolgenden Übersicht sind für jedes Enzym die verschiedenen Oxidationsprodukte von (+)-Eremophilen dargestellt (Tab. 4).

**Tabelle 4:** Übersicht der *in vitro* Umsätze von (+)-Eremophilen durch Cytochrome P450 aus *S. cellulosum* So ce56; ÜHP: Überhydroxylierungsprodukte, Produkte mit zwei oder mehr sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen; k. A.: keine Aussage über die genaue Masse des Produktes möglich

|   | Cytochrom P450 | Anzahl Produkte | Produkt (Masse [Da]/ Massenänderung im Vergleich zu (+)-Eremophilen [Da])                                                                                                                                                                   | Abbildungen der Gaschromatogramme im Anhang |
|---|----------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1 | CYP109C1       | 1               | 1 (220/+16)                                                                                                                                                                                                                                 | Abb. 2                                      |
| 2 | CYP109C2       | 1               | 1 (220/+16)                                                                                                                                                                                                                                 | Abb. 3                                      |
| 3 | CYP109D1       | 2               | 1 (220/+16); 2 (ÜHP / ÜHP)                                                                                                                                                                                                                  | Abb. 4                                      |
| 4 | CYP260A1       | 6               | 3 (k. A / k. A); 4 (ÜHP/ÜHP); 5 (ÜHP/ÜHP); 6 (ÜHP/ÜHP); 7 (ÜHP/ÜHP); 8 (ÜHP/ÜHP)                                                                                                                                                            | Abb. 5                                      |
| 5 | CYP260B1       | 17              | 9 (220/+16); 10 (ÜHP/ÜHP); 11 (ÜHP/ÜHP); 12 (ÜHP/ÜHP); 13 (ÜHP/ÜHP); 14 (ÜHP/ÜHP); 15 (ÜHP/ÜHP); 16 (ÜHP/ÜHP); 17 (ÜHP/ÜHP); 18 (ÜHP/ÜHP); 19 (ÜHP/ÜHP); 20 (ÜHP/ÜHP); 21 (ÜHP/ÜHP); 22 (ÜHP/ÜHP); 23 (ÜHP/ÜHP); 24 (ÜHP/ÜHP); 25 (ÜHP/ÜHP) | Abb. 6                                      |
| 6 | CYP264A1       | 4               | 26 (220/+16); 27 (220/+16); 28 (ÜHP/ÜHP); 29 (ÜHP/ÜHP)                                                                                                                                                                                      | Abb. 7                                      |
| 7 | CYP264B1       | 3               | 1 (220/+16); 30 (ÜHP/ÜHP); 31 (ÜHP/ÜHP)                                                                                                                                                                                                     | Abb. 8                                      |
| 8 | CYP267A1       | 14              | 26 (220/+16); 5 (ÜHP/ÜHP); 32 (ÜHP/ÜHP); 6 (ÜHP/ÜHP); 7 (ÜHP/ÜHP); 33 (ÜHP/ÜHP); 8 (ÜHP/ÜHP); 34 (ÜHP/ÜHP); 35 (ÜHP/ÜHP); 36 (ÜHP/ÜHP); 37 (ÜHP/ÜHP); 38 (ÜHP/ÜHP); 39 (ÜHP/ÜHP); 40 (ÜHP/ÜHP)                                              | Abb. 9                                      |
| 9 | CYP267B1       | 8               | 26 (220/+16); 1 (220/+16); 41 (ÜHP/ÜHP); 7 (ÜHP/ÜHP); 42 (ÜHP/ÜHP); 43 (ÜHP/ÜHP); 44 (ÜHP/ÜHP); 45 (ÜHP/ÜHP)                                                                                                                                | Abb. 10                                     |

Jedes der neun eingesetzten P450s kann (+)-Eremophilen umsetzen. Insgesamt lieferten die (+)-Eremophilenumsätze eine Vielfalt von 45 Produkten. Darunter befinden sich nur vier Substanzen mit einer Masse von 220 Da, die einfach hydroxylierten oder epoxidierten (+)-Eremophilenderivaten entsprechen (Tab. 4; **1, 9, 26** und **27**). Alle weiteren sind Überhydroxylierungsprodukte (ÜHP) mit mindestens zwei eingeführten funktionellen Gruppen. Neben CYP264B1 können die drei Enzyme der CYP109-Familie und CYP267B1

(+)-Eremophilen zum einfach oxidierten Produkt 1 (Tab. 4, Zeilen 1, 2, 3, 7 und 9) umsetzen. Darüber hinaus lassen sich für den Umsatz mit CYP264B1 bei verschiedenen Reaktionsbedingungen Unterschiede im Produktspektrum von (+)-Eremophilen beobachten. Während beim *in vitro* Umsatz neben dem einfach hydroxylierten/epoxidiereten Hauptprodukt (Kap. 3.1 Abb. 4D; **P<sub>1</sub>** und Tab. 4; **1**) zwei ÜHPs zu beobachten sind (Anhang Abb. 8 und Tab. 4, **30** und **31**), sind es beim *E. coli* Ganzzellumsatz fünf ÜHPs (Kap. 3.1 Abb. 4D; multihydroxylated products **P<sub>2</sub> – P<sub>6</sub>**). Vergleichbare Unterschiede zwischen Produktspektren von *in vitro* und *in vivo* Umsätzen mit P450s sind bereits beobachtet worden. Sie sind unter anderem in verschiedenen Aktivitäten des Enzyms, bedingt durch intrazelluläre Inhibitoren und Aktivatoren, unterschiedlichen Reaktionszeiten sowie Substratverfügbarkeiten begründet (Girhard et al. 2009; Ringle et al. 2013).

#### 4.4 Docking: Computergestützte Modellierung von CYP264B1-Sesquiterpen-Komplexen

Auf Basis der Kristallstruktur von CYP107A1 wurde von Dr. Michael Hutter ein dreidimensionales Modell von CYP264B1 erstellt (Ly et al. 2012). Zur Untersuchung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von CYP264B1 bei der Oxidation von Sesquiterpenen wurden Docking-Studien durchgeführt. Dabei wurden mit Methoden der Energieminimierung die wahrscheinlichsten Konformationen der CYP264B1-Sesquiterpen-Komplexe berechnet. Eine Übersicht über die Konformationen der Komplexe ist in Tabelle 5 für die Substrate (+)-Eremophilen; (+)-Valencen; (+)-Nootkaton;  $\alpha$ -Humulen; Zerumbon;  $\beta$ -Caryophyllen;  $\alpha$ -Cedren (Kap. 3.2) sowie Nootkaten und *trans*-Nootkatol (Kap 4.1) angegeben. Die C-Atome, die in der Nähe des zentralen Eisens im Häm-Cofaktor liegen, gelten als die wahrscheinlichsten Oxidationspositionen. Die C-Atome in einer Entfernung von bis zu 4,5 Å (etwa drei C-O-Bindungslängen) zum Eisen-Atom sind in Tabelle 5 (Spalten 2 und 3) nach Entfernung geordnet. Experimentell wurden von CYP264B1 bisher ausschließlich  $sp^3$ -hybridisierte C-Atome in Allylposition hydroxyliert (Kap. 3.2 und 4.1). Solche Positionen sind daher in Tabelle 5 fett,  $sp^2$ -hybridisierte C-Atome aus Doppelbindungen unterstrichen gekennzeichnet.

Unter allen Substraten waren die Eremophilane (+)-Nootkaton und *trans*-Nootkatol die einzigen, für die jeweils zwei mögliche Bindungskonformationen errechnet wurden. In allen Konformationen liegen die Substrate axial über dem Häm. In jeweils einer Konformation für (+)-Nootkaton (Konformation B, Anhang Abb. 74) und *trans*-Nootkatol (Konformation A, Anhang Abb. 71) zeigt die Isopropyliden-Gruppe zum Häm. Das experimentell hydroxylierte C-13 befindet sich in der Nähe des Häm-Eisens und somit in einer für Hydroxylierung wahrscheinlichen Position (Tab. 5, Zeile 5B) (Ly et al. 2012).

(+)-Eremophilen und (+)-Valencen liegen in ihrer einzigen errechneten Konformation ebenfalls axial über dem Häm (Anhang Abb. 68 und 69). Dabei liegt – ähnlich wie bei (+)-Nootkaton in Konformation A (Anhang Abb. 73) und *trans*-Nootkatol in Konformation B (Anhang Abb. 72) – der erste Ring des Transdecalingerüsts nah am Häm. Die zum Häm nächsten Positionen sind C-3 und C-2, beides jedoch keine allylischen  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatome (Tab. 5, Zeilen 1, 2, 4 und 5). Die errechnete Position von Nootkaton im aktiven Zentrum ist mit keinem anderen Sesquiterpen vergleichbar (Anhang Abb. 70). Die zum Häm-Eisen nächsten Atome C-1, C-9 und C-10 sind alle  $sp^2$ -hybridisiert (Tab. 5, Zeile 3).

Neben Eremophilanen werden Humulane und die verwandten Caryophyllane sowie Cedrane von CYP264B1 umgesetzt (Kap. 3.2, Schema 2). Die Hydroxylierung der Humulane  $\alpha$ -Humulen und Zerumbon sowie des Caryophyllans  $\beta$ -Caryophyllen findet selektiv an C-5 statt (Kap. 3.2, Schema 2). Docking-Studien zeigen, dass  $\alpha$ -Humulen und  $\beta$ -Caryophyllen in ähnlichen Konformationen im aktiven Zentrum liegen. Dabei zeigt die Doppelbindung zwischen C-6 und C-7 zum Häm. Das zum zentralen Eisen nächste Atom ist C-5 (Tab. 5, Zeilen 6 und 7). In der errechneten Konformation von Zerumbon liegt C-15 (2,729Å) mit großem Abstand am nächsten zum Häm-Eisen. Daneben liegen C-5, C-6, C-7 und C-8 in Entfernungen, bei denen Oxidationen möglich wären. Dabei sind C-15 und C-5 allylische Positionen. Zwischen C-6 und C-7 liegt eine Doppelbindung und an C-8 ein Carbonylgruppe (Tab. 5, Zeile 8).  $\alpha$ -Cedren aus der Cedran-Strukturklasse wird experimentell vorwiegend an C-15 hydroxyliert (Kap. 3.2, Schema 2). In der errechneten Docking-Konformation liegt die C-15-Methylgruppe am nächsten zum Häm-Eisen, gefolgt von C-3 und C-4 und C-2, von denen jedoch nur das letzte ein allylisches  $sp^3$ -C-Atom ist (Tab. 5, Zeile 9).

**Tabelle 5:** Übersicht über die Dockingstudien von Sesquiterpenen im aktiven Zentrum von CYP264B1, allylische  $sp^3$ -hybridisierte C-Atome sind fett,  $sp^2$ -hybridisierte C-Atome sind unterstrichen dargestellt.

|   | Substrat                | Konformationen/<br>Bindungsenergie<br>[kJ/mol] | Nächste C-Atome des<br>Substrats zum Häm-Fe<br>von CYP264B1  | Entfernung des C-Atoms des<br>Substrats zum Häm-Fe von<br>CYP264B1 [Å] | Oxidiertes C-Atom des<br>Hauptproduktes der <i>in vivo</i><br>Studien (Kap 3.2 und 4.1)/<br>Funktionelle Gruppe |
|---|-------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | (+)-Eremophilen         | -6,45                                          | C-3<br><b>C-2</b><br><u>C-1</u><br>C-4                       | 2,681<br><b>3,156</b><br><u>4,069</u><br>4,116                         | Unbekannt                                                                                                       |
| 2 | (+)-Valencen            | -6,35                                          | C-3<br><b>C-2</b><br><u>C-1</u>                              | 2,911<br><b>3,265</b><br><u>4,106</u>                                  | C-13 / Allylalkohol                                                                                             |
| 3 | Nootkaten               | -6,15                                          | <u>C-9</u><br><u>C-1</u><br><u>C-10</u>                      | <u>3,234</u><br><u>3,661</u>                                           | C-13 / Allylalkohol                                                                                             |
| 4 | <i>trans</i> -Nootkatol | A: -6,16                                       | <b>C-13</b><br><u>C-11</u>                                   | <b>3,086</b><br><u>4,188</u>                                           | C-13 / Allylalkohol                                                                                             |
|   |                         | B: -6,05                                       | C-3<br>C-2                                                   | 3,197<br>3,326                                                         |                                                                                                                 |
| 5 | (+) -Nootkaton          | A: -6,24                                       | C-2<br>C-3<br>C-4                                            | 2,906<br>2,914<br>4,382                                                | C-13 / Allylalkohol                                                                                             |
|   |                         | B: -6,14                                       | <b>C-13</b><br><u>C-11</u>                                   | <b>2,935</b><br><u>4,110</u>                                           |                                                                                                                 |
| 6 | $\beta$ -Caryophyllen   | -6,15                                          | <b>C-5</b><br><u>C-6</u><br><u>C-7</u>                       | <b>3,379</b><br><u>3,327</u><br><u>4,153</u>                           | C-5 / Allylalkohol                                                                                              |
| 7 | $\alpha$ -Humulen       | -6,0                                           | <b>C-5</b><br><u>C-6</u>                                     | <b>3,542</b><br><u>4,029</u>                                           | C-5 / Allylalkohol                                                                                              |
| 8 | Zerumbon                | -6,3                                           | <b>C-15</b><br><u>C-7</u><br><u>C-6</u><br><b>C-5</b><br>C-8 | <b>2,729</b><br><u>3,374</u><br><u>3,713</u><br><b>4,003</b><br>4,298  | C-5 / Allylalkohol                                                                                              |
| 9 | $\alpha$ -Cedren        | -6,9                                           | <b>C-15</b><br><u>C-3</u><br><u>C-4</u>                      | <b>2,821</b><br><u>3,271</u><br><u>3,642</u><br><b>4,210</b>           | C-15 / Allylalkohol                                                                                             |

## 5. Diskussion

Neben Pflanzen, die traditionell die Quelle für die meisten Terpene darstellen, haben sich Bakterien vor verhältnismäßig kurzer Zeit als interessante Organismen für die Biosynthese von Terpenen erwiesen (Cane and Ikeda 2012; Dickschat 2016). Im Zentrum dieser Arbeit steht die Untersuchung des Myxobakteriums *S. cellulosum* So ce56 als Terpenproduzent. Einerseits wurden neue volatile Terpene in dem Myxobakterium beschrieben. Andererseits wurden kommerziell erhältliche Sesquiterpene pflanzlichen Ursprungs durch CYP264B1 selektiv oxidiert. Die etablierten Methoden sind höchst vielversprechend bei der Suche nach neuen Riechstoffen und die oxidierten Terpene interessant für Untersuchungen von humanen Riechrezeptoren.

### 5.1 *Sorangium cellulosum* So ce56 synthetisiert selektiv und unselektiv neue einzigartige Sesquiterpene

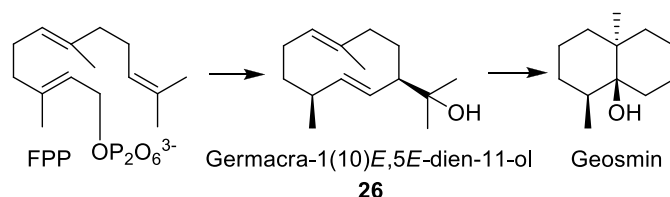
Die vier im Genom enthaltenen Terpensynthasen (TSn) (sce1440, sce4636, sce6369 und sce8552) wurden auf ihre Funktion hin untersucht sowie ihre zugehörigen Terpenprodukte strukturell charakterisiert (Kap. 3.1 und 3.3).

Studien der isolierten Typ I-TSn zeigten, dass das Substrat Farnesyldiphosphat (FPP) von sce1440 spezifisch zum Geosmin-Vorläufermolekül Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (Kap. 3.3 Tab. 1; **26**) und von sce8552 zu (+)-Eremophilen (Kap. 3.1 Abb. 4A) umgesetzt wird. Die dritte TS sce6369 bildet aus FPP eine große Vielfalt verschiedener Cubebane und der strukturell eng verwandten Cadinane. Obwohl sich Anzahl und Strukturen der entsprechenden von sce6369 synthetisierten Terpene bei verschiedenen Bedingungen unterscheiden (Kap. 3.3 Schema 2), bleiben die Hauptprodukte der TS immer 10-*epi*-Cubebol und (–)- $\delta$ -Cadinen (Kap. 3.3 Abb. 1B und Tab. 1; **17** und **19**).

Die Zusammensetzung des Volatilenextraktes von *S. cellulosum* So ce56 mit einem Satz von 17 Sesquiterpenen bestätigt diese Ergebnisse. Darunter zeigen (+)-Eremophilen, (–)- $\delta$ -Cadinen, 10-*epi*-Cubebol und Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol die höchsten Vorkommen (Kap. 3.3 Abb. 1A und Tab. 1; **11**, **17**, **19** und **26**). Unter den bisher untersuchten Myxobakterien (*M. xanthus*, *C. crocatus*, *S. aurantiaca*) besitzt *S. cellulosum* So ce56 den komplexesten Satz an volatilen Terpenen (Dickschat et al. 2004; Schulz et al. 2004; Dickschat et al. 2005), vergleichbar mit Streptomyceten (Citron et al. 2012).

Geosmin-/Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-olsynthasen wie sce1440 kommen in einer Vielzahl von bakteriellen Genera, einschließlich Actinomyceten, Streptomyceten und Cyanobakterien, vor (Yamada et al. 2012). Das zugehörige Gen ist über alle bakteriellen Stämme hochkonserviert und etwa doppelt so lang wie andere TS-Gene (Cane and Watt 2003). Die Biosynthese von Geosmin über die Zwischenstufe Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (Kap. 3.3 Tab. 1; **26**) wurde bereits

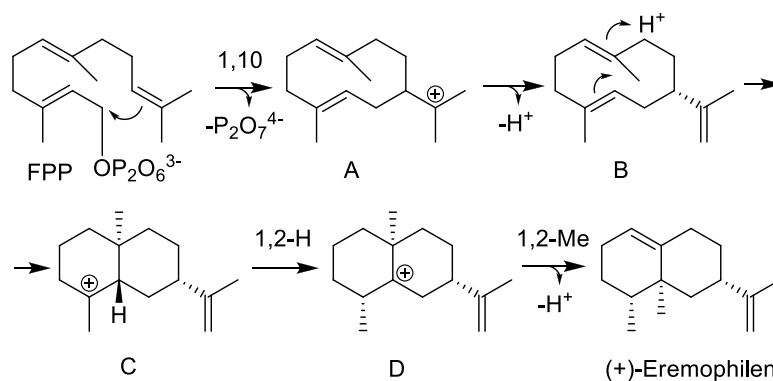
mehrfach untersucht (Schema 11) (Spiteller et al. 2002; Cane and Watt 2003; Dickschat et al. 2005; Cane et al. 2006; Jiang et al. 2006; Jiang et al. 2007).



**Schema 11:** Biosynthese von Geosmin über das Zwischenprodukt Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (**26**), modifiziert aus (Cane and Watt 2003); FPP: Farnesylpyrophosphat

Dass das heterolog exprimierte Enzym kein Geosmin synthetisiert, liegt möglicherweise an der fehlenden Aktivität der C-terminalen Domäne, die für die Reaktion von **26** zu Geosmin verantwortlich ist. Studien mit der Geosminsynthase aus *Streptomyces coelicolor* zeigten, dass **26** nicht akkumuliert, sondern direkt zu Geosmin umgesetzt wird (Cane and Watt 2003). Der Nachweis von **26** neben Geosmin im volatilen Extrakt von *S. cellulosum* So ce56 suggeriert eine geringere Geosminsynthaseaktivität von sce1440. Auf Basis von Sequenzvergleichen mit funktionalen Geosmin-/Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-olsynthasen lässt sich kein Hinweis für die gänzlich fehlende Aktivität des zweiten Schrittes der Geosminsynthase im *E. coli*-Ganzzellsystem finden. Intrazelluläre Parameter wie pH und Art der Ionen haben aber Einfluss auf die Aktivität von TS<sub>n</sub> (Steele et al. 1998; Cane et al. 2006).

Die Biosynthese des (+)-Enantiomers von Eremophilen und die zugehörige TS sce8552 aus *S. cellulosum* So ce56 wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben (Kap. 3.1). Dickschat schlug einen Mechanismus der sce8552-katalysierten Reaktion von FPP zu (+)-Eremophilen auf Basis der für TS<sub>n</sub> geltenden Prinzipien (Kap. 1.3) vor (Dickschat 2016). Dabei cyclisiert FPP über ein Germacradienylkation (Schema 12, **A**) nach Protonenabspaltung zu Germacren A (Schema 12, **B**). Reprotonierung und intramolekularer 1,6-Ringschluss führen zu einem *trans*-Decalinintermediat (Schema 12, **C**). Letzteres lagert sich über aufeinander folgende 1,2-Hydrid- und 1,2-Methylshifts zu (+)-Eremophilen um (Schema 12).



**Schema 12:** Mechanismus der sce8552-katalysierten Biosynthese von (+)-Eremophilen, modifiziert aus (Dickschat 2016); FPP: Farnesylpyrophosphat, 1,10: 1,10-Cyclisierung; 1,2-H: 1,2-Hydridumlagerung nach Wagner-Meerwein; 1,2-Me: 1,2-Methylumlagerung nach Wagner-Meerwein.

Das bereits seit den 1960er Jahren bekannte (–)-Eremophilen entstammt verschiedenen Pestwurz (*Petasites*)-Spezies (Hochmannova and Herout 1964; Křepinský et al. 1968; Piers and Keziere 1968; Piers and Keziere 1969). So bildet das Paar ein weiteres Beispiel für die Enantiokomplementarität von Terpenen aus verschiedenen Organismen. In Kapitel 1.2.2 wurde das Carvon-Enantiomerenpaar vorgestellt, dessen Vertreter alternativ in verschiedenen Minzarten ((–)-(4*R*)-Carvon) oder in Kümmel und Dill ((+)-(4*S*)-Carvon) zu finden sind (Tab. 1 Zeilen 12 und 13). Die Enantiomere von Eremophilen zeigen, dass enantiokomplementäre Terpenbiosynthesen in Pflanzen und Bakterien möglich sind. Ob eine zu sce8552 enantiokomplementäre TS in *Petasites*-Spezies vorhanden ist, wäre eine interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen.

Der Gencluster aus TS (sce8552) und CYP264B1 (sce8551) ist funktional und das P450 setzt (+)-Eremophilen zum monohydroxylierten/epoxidierten Hauptprodukt um (Anhang Abb. 8, **1** bzw. Kap. 3.1 Abb. 4D, **P<sub>1</sub>**). *In vitro* entstehen bei der Reaktion zwei (Anhang Abb. 8), bei der Reaktion im *E. coli* Ganzzellsystem fünf (Kap. 3.1 Abb. 4D) weitere Produkte. *In vitro* können insgesamt mindestens neun P450s aus *S. cellulosum* So ce56 den Kohlenwasserstoff zu mindestens 45 verschiedenen Produkten umsetzen. Darunter befinden sich 41 Überhydroxylierungsprodukte, also (+)-Eremophilenderivate mit mehr als einer O-haltigen funktionellen Gruppe (Tab. 4). Die Vertreter der CYP109-Familie (CYP109C1, CYP109C2 und CYP109D1) und CYP267B1 produzieren aus (+)-Eremophilen dasselbe Hauptprodukt **1** (bzw. **P<sub>1</sub>**) wie CYP264B1. Die Umsätze sind dabei noch selektiver und im Fall von CYP109D1 auch effizienter (Anhang Abb. 2 – 4 und 8).

Die 10-*epi*-Cubebol-Synthase Sce6369 ist nicht spezifisch. Sie stellt mindestens zwölf der 17 Sesquiterpene in *S. cellulosum* So ce56 her und trägt damit maßgeblich zur Substanzvielfalt im volatilen Extrakt des Bakteriums bei (Kap. 3.3 Abb. 1A und Tab. 1). Im *E. coli*-Ganzzellsystem sind es sogar 21 Terpene und vier Terpene im *S. avermitilis* SUKA22-Ganzzellsystem (Kap. 3.3 Tab. 1 und Schema 2). Im Allgemeinen sind Strukturen von Terpenen von der Form des aktiven Zentrums der entsprechenden TS abhängig (Aaron et al. 2010). Unspezifische Terpensynthasen haben aktive Zentren, deren Form für die Reaktionsintermediate verschiedene Folgeverläufe und Produkte zulassen (Steele et al. 1998; Lopez-Gallego et al. 2010). Alle Produkte der TS sce6369 gehören zum Cubeban- oder strukturell eng verwandten Cadinan (Cadalan)-Strukturtyp (Kap. 3.3 Schema 1B). Das lässt den Rückschluss zu, dass sie über dieselben Intermediate hergestellt werden. Die unterschiedlichen Terpene entstehen aus den Carbokation-Intermediaten durch Abspaltungen verschiedener Protonen und nukleophile Angriffe von Wasser (Kap. 3.3 Schema 2). Die Unterschiede der Produktmuster in den verschiedenen Expressionssystemen sind durch die unterschiedlichen Aktivitäten von TSn erklärbar. Wie bereits im Zusammenhang mit der Geosmin-/ Germacra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-olsynthase erwähnt, haben Reaktionsparameter wie pH und Art der Ionen im Cytosol Einfluss auf die TS-Aktivität (Steele et al. 1998; Cane et al. 2006). Dabei wirken sich die Ladungen von cytosolischen Protonen und Ionen auf die intramolekularen

Wechselwirkungen von Enzymen aus. Aber auch intermolekulare Wechselwirkungen beeinflussen die Tertiärstruktur und somit auch die des aktiven Zentrums von TS<sub>n</sub> (Aaron et al. 2010).

Das *E.coli*-System ist den nativen Bedingungen im Myxobakterium ähnlicher als das *S. avermitilis*-System: Die Hauptprodukte von sce6369 10-*epi*-Cubebol (Kap. 3.3 Tab. 1, 19) und (-)- $\delta$ -Cadinen (Kap. 3.3 Tab. 1, 17) sowie mindestens neun Nebenprodukte werden sowohl in *S. cellulosum* So ce56 als auch im *E.coli*-System gebildet, im *S. avermitilis*-System jedoch nicht (Kap. 3.3 Tab. 1 und Schema 2).

Die physiologischen Funktionen der analysierten Terpene sind bisher ungeklärt. Ihre Volatilität und ihre Löslichkeit sowohl in wässrigen als auch hydrophoben Medien machen sie zu aussichtsreichen Mediatoren für die chemische Kommunikation von *S. cellulosum* So ce56. Eine Quorum Sensing-Rolle bei der Fruchtkörperbildung der Myxobakterien wäre denkbar. Die Identifizierung und Synthese der Terpene macht experimentelle Untersuchungen ihres Einflusses auf Zellphysiologie, -morphologie und Bewegung von *S. cellulosum* So ce56 in Zukunft möglich.

## **5.2 Docking-Studien und Produktstrukturen liefern Einblick in den Mechanismus der Sesquiterpenoxidationen durch CYP264B1**

Über die Charakterisierung der TS<sub>n</sub> hinaus wurden aus dem großen Satz der 21 endogenen P450s die Terpenoxidasen bestimmt sowie insbesondere das Potential der natürlichen Terpenhydroxylase CYP264B1 für selektive Funktionalisierung verschiedener Terpenkohlenwasserstoffe evaluiert. Die Ergebnisse der *in vivo* Umsätze von Sesquiterpenen mit CYP264B1 (Kap. 3.2) und Dockingstudien der Terpene ins Homologiemodell von CYP264B1 (Kap. 4.1) wurden gegenüber gestellt. Aus den Ergebnissen konnten Aussagen über die Struktur-Funktions-Beziehungen bei der Oxidation der Terpene durch CYP264B1 getroffen werden.

Aus der Eremophilan-Strukturklasse werden neben dem natürlichen CYP264B1-Substrat (+)-Eremophilen die vier weiteren Vertreter (+)-Valencen, Nootkaten, Nootkatol und (+)-Nootkaton umgesetzt. Die primäre Oxidationsposition für (+)-Eremophilen konnte bisher nicht identifiziert werden, für alle anderen Eremophilane ist sie C-13 (Kap. 3.2 und 4.1). Die Humulane  $\alpha$ -Humulen und Zerumbon sowie Caryophyllen werden selektiv an der Position C-5 hydroxyliert.  $\alpha$ -Cedren aus der Cedran-Strukturklasse wird an verschiedenen Positionen, primär jedoch an der C-15-Methylposition hydroxyliert (Kap. 3.2).

Beim tieferen Einblick in den enzymatischen Mechanismus der CYP264B1-katalysierten Reaktionen halfen Docking-Studien der Enzym-Substrat-Komplexe. Dazu sind in Tabelle 5 die Ergebnisse der Docking-Simulationen und der *in vivo* Umsätze der verschiedenen Sesquiterpene mit CYP264B1 gegenüber gestellt. Bei der Bindung der Substrate im aktiven Zentrum von

CYP264B1 spielen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Ile80, Leu231, Ala235, Thr239, Val282 und Thr285 eine Rolle (Anhang Abb. 68 – 78). Wechselwirkungen des Substrats mit dem Enzym über H-Brücken konnten nur für (+)-Nootkaton festgestellt werden (Ly et al. 2012). Für *trans*-Nootkatol (Konformation A), (+)-Nootkaton (Konformation B),  $\beta$ -Caryophyllen,  $\alpha$ -Humulen und  $\alpha$ -Cedren stimmen die experimentell ermittelten allylischen Hydroxylierungspositionen der Hauptprodukte mit dem jeweils zum Häm nächsten C-Atom des Substrates im Komplex überein (Tab. 5, Zeilen 4 – 7 und 9). Die Konformation des Zerumbons in der Docking-Simulation ist derlei, dass sich die Positionen C-15, C-6, C-7, C-5 und C-8 in der Nähe des Häm-Eisens befinden (Tab. 5, Zeile 8 und Anhang Abb. 77). Obwohl C-5 weiter vom Häm-Eisen entfernt liegt als C-15, C-6 und C-7, stellt 5-Hydroxyzerumbon das Hauptprodukt der *in vivo* Hydroxylierung dar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die absolute Distanz eines C-Atoms zum Häm-Eisen nicht das einzige Kriterium für die CYP264B1-katalysierte Hydroxylierung darstellt. Darüber hinaus spielt unter anderem der allylische Charakter des C-Atoms eine Rolle. Neben 5-Hydroxyzerumbon, dem Hauptprodukt der Zerumbon-Oxidation (96%), wurde ein Nebenprodukt (4%) ermittelt, das an C-15 hydroxyliert sein könnte (Kap. 3.2, Schema 2). Daneben liegt die experimentell bevorzugt hydroxylierte C-13 Position der Eremophilane (+)-Valencen und Nootkaten in den Docking-Studien nicht in der Nähe des Häms. Während bei (+)-Valencen die allylische C-2-Position für eine Hydroxylierung günstig zu liegen scheint, sind alle C-Atome von Nootkaten, die in der Nähe des Häm-Eisens liegen, in Doppelbindungen und damit  $sp^2$ -hybridisiert (Tab. 5, Zeilen 2 und 3 und Anhang Abb. 69). Obwohl die in den Docking-Studien errechneten Konformationen nicht für alle Sesquiterpene zu den experimentell ermittelten Hauptprodukten führen, könnten sie möglicherweise Oxidationspositionen für einige der zahlreichen Nebenprodukte erklären (Kap. 3.2 Schema 2). Die Strukturen der Nebenprodukte der CYP264B1-katalysierten Hydroxylierungen sollen in weiterführenden Studien experimentell ermittelt werden.

### **5.3 Neue Sesquiterpene aus *Sorangium cellulosum* und durch CYP264B1 oxidierte Terpenderivate sind zumeist geruchlos**

Vor dem Gesichtspunkt, dass volatile Sesquiterpene als Riechstoffe verwendet werden und Komponenten in der Parfümerie verbreiteter ätherischer Öle darstellen, lag die Vermutung nahe, dass die neuen Terpene aus *S. cellulosum* So ce56 interessante Duftnoten darstellen könnten. Wie in Kapitel 1.2.2 dargestellt, gibt es in der Natur vorkommende enantiomere Terpene, die unterschiedliche olfaktorische Eigenschaften aufweisen (Tab. 1 Zeilen 8 – 13). Darüber hinaus können Terpene und terpenähnliche Volatile ihre olfaktorischen Eigenschaften durch selektive Funktionalisierungen verändern (Tab. 1 Zeilen 4 – 7 und Schema 4). Die neuen Sesquiterpene (+)-Eremophilene und (–)- $\delta$ -Cadinene sowie die oxidierten Derivate von (+)-Valencen, Nootkaten, *trans*-Nootkatol,  $\alpha$ -Humulen,  $\beta$ -Caryophyllen, Zerumbon und  $\alpha$ -Cedren wurden per GC/O

sensorisch getestet und mit den Gerüchen ihrer Enantiomere beziehungsweise ihrer Substrate verglichen (Tab. 6). Die sensorischen Studien sollten insbesondere zwei Fragen beantworten:

- 1.) Besitzen die vormalig unbeschriebenen Enantiomere (+)-Eremophilen und (-)- $\delta$ -Cadinen interessante und sich von ihren Isomeren unterscheidende Geruchsnoten?
- 2.) Wirken sich enzymatische Oxidationen von Sesquiterpenen auf ihre Geruchsqualität und/oder -intensität aus?

Ob die Enantiomere von Eremophilen unterschiedliche Geruchseindrücke hervorrufen, lässt sich nicht eindeutig feststellen. (+)-Eremophilen konnte in ausreichender Reinheit und Menge synthetisiert werden, um sensorische Studien durchzuführen. Es rief bei den Testpersonen keinen Sinneseindruck hervor. Über den Geruch von (-)-Eremophilen konnten weder in den ersten Studien seiner Strukturidentifikation (Hochmannova and Herout 1964; Křepinský et al. 1968; Piers and Keziere 1968; Piers and Keziere 1969) noch weiteren Literaturquellen oder in der proprietären Datenbank von Givaudan Informationen gefunden werden (Tab. 6 Zeile 1).  $\delta$ -Cadinen fällt in die Klasse der Terpene, deren Enantiomere sich in ihren Geruchsqualitäten unterscheiden. Das von *S. cellulorum* So ce56 aber auch verschiedenen Pflanzen synthetisierte (-)-Isomer ist geruchlos, während das bisher ausschließlich aus Pflanzenextrakten bekannte (+)-Isomer als holzig, teerig und nach Gewürzen wie Kümmel und Thymian riechend beschrieben wird (Tab. 6 Zeile 2) (Arctander 1969; Finefield et al. 2012).

Alle als Substrate verwendeten Sesquiterpene sind in ätherischen Ölen enthalten, von denen die meisten charakteristische Geruchsnoten tragen (Tab. 6 Spalten 5 und 6, Zeilen 3 - 11). Die Eremophilane (+)-Valencen und *trans*-Nootkatol sind Zitrusaromen mit Noten von Orange und Grapefruit (Tab. 6 Zeilen 3 und 5). Das erstmals aus Hopfen gewonnene, aber in vielen verschiedenen Pflanzen enthaltene,  $\alpha$ -Humulen riecht holzig, erdig und staubig (Tab. 6 Zeile 6) und das damit strukturell eng verwandte  $\beta$ -Caryophyllen holzig, würzig und nach Nelke (Tab. 6 Zeile 7).  $\alpha$ -Cedren ist ein charakteristisches Sesquiterpen aus Zedernholz. Es riecht aromatisch warm, trocken, nach Campher und Zedernholz (Tab. 6 Zeile 11). Darüber hinaus wird es als Ausgangsprodukt für Synthesen von weiteren Molekülen holziger Noten verwendet (Panten et al. 2005). Nootkaten und Zerumbon sind die einzigen beiden Substrate, deren olfaktorische Qualitäten nicht beschrieben sind (Tab. 6 Zeilen 4 und 8), obwohl beide Substanzen charakteristische Geruchsnoten besitzen. Nootkaten weist strukturell eine hohe Ähnlichkeit mit den Zitrus-Riechstoffen (+)-Valencen, *trans*-Nootkatol und (+)-Nootkaton auf (Schema 10). Zerumbon ist ein Oxidationsprodukt von  $\alpha$ -Humulen. Weitere  $\alpha$ -Humulenepoxide und ihre Hydrolyseprodukte sind in Hopfen vorkommende Geruchsträger. Ihre Noten sind als zitrusartig, tropisch fruchtig, holzig, würzig und blumig beschrieben worden (Yang et al. 1993). Tetrahydrozerumbon hingegen riecht balsamartig (Kitayama et al. 2010). Die durchgeführten enzymatischen allylischen Hydroxylierungen führten bei (+)-Valencen,  $\alpha$ -Humulen,  $\beta$ -Caryophyllen und  $\alpha$ -Cedren zum kompletten Verlust der Geruchsqualität (Tab. 6 Zeilen 3, 6, 7).

und 11). Auch das 13-Hydroxyderivat von Nootkaten ist geruchlos (Tab. 6 Zeile 4). Das an C-5 allylisch hydroxylierte Derivat von Zerumbon riecht fruchtig, fettig und nach Teer (Tab. 6 Zeile 8), die mehrfach oxidierten 6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbone sind hingegen ebenfalls geruchlos (Tab. 6 Zeilen 9 und 10). Die Hydroxylierung von *trans*-Nootkatol an C-13 ändert den Geruch von süßlichen Noten von Grapefruit zu Noten von Balsam, Styrax, Weihrauch und Ghee (Tab. 6 Zeile 5).

**Tabelle 6:** Übersicht über die sensorischen Analysen von Sesquiterpenen aus *S. cellulorum* So ce56, mit Cytochromen P450 oxidierten Sesquiterpenen und ihre Geruchsqualitäten.

|   | Substanz               | Geruch*   | Enantiomer             | Geruch*                                                                                             | Vorkommen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Referenz                                                                                                             |
|---|------------------------|-----------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | (+)-Eremophilen        | geruchlos | (-)-Eremophilen        | Nicht dokumentiert                                                                                  | Versch.<br>Pestwurzarten<br>( <i>Petasites officinalis</i> ,<br><i>Petasites kablikianus</i> ,<br><i>Petasites albus</i> )                                                                                                                                                                                                 | (Hochmannova and Herout 1964;<br>Křepinský et al. 1968)                                                              |
| 2 | (-)- $\delta$ -Cadinen | geruchlos | (+)- $\delta$ -Cadinen | mild, trocken holzig,<br>leicht teerig,<br>Ähnlichkeit mit<br>Gewürzen wie<br>Kümmel und<br>Thymian | Westindische<br>Zedrele ( <i>Cedrela odorata</i> ),<br>Stech-<br>Wacholder<br>( <i>Juniperus oxycedrus</i> ),<br>Queensland-<br>Araukarie<br>( <i>Araucaria bidwillii</i> ),<br>Kümmel ( <i>Carum carvi</i> ),<br>Baumwollstrauch ( <i>Gossypium arboreum</i> ),<br>Hochland<br>Baumwolle<br>( <i>Gossypium hirsutum</i> ) | (Arctander 1969; Barrero et al. 1991;<br>Joulain and König 1998;<br>Finefield et al. 2012)                           |
|   |                        |           | Substrat               |                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                      |
| 3 | 13-Hydroxy-valencen    | geruchlos | (+)-Valencen           | Orange,<br>zitrusartig,<br>holzig,<br>ölig                                                          | Versch.<br>Zitrusarten,<br>Valencia-Orange<br>( <i>Citrus sinensis</i> ),<br>Sellerie ( <i>Apium graveolens</i> ),<br>Mango<br>( <i>Mangifera indica</i> ),<br>Olive ( <i>Olea europea</i> )                                                                                                                               | (Hunter and Brogden 1965;<br>Sharon-Asa et al. 2003;<br>Kaspera 2004;<br>Burdock 2010;<br>Leonhardt and Berger 2015) |

|   |                        |                                 |                         |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                         |
|---|------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4 | 13-Hydroxy-nootkaten   | geruchlos                       | Nootkaten               | Nicht dokumentiert                                      | Valencia-Orange ( <i>Citrus sinensis</i> ), Nootka-Scheinzypresse ( <i>Chamaecyparis nootkatensis</i> ), Vietnamesische Goldzypresse ( <i>Xanthocyparis vietnamiensis</i> )                                                                           | (Kelsey et al. 2005; Khasawneh et al. 2011; Bazzali et al. 2016)                                                                        |
| 5 | 13-Hydroxy-nootkatol   | Balsam, Styrax, Weihrauch, Ghee | <i>trans</i> -Nootkatol | Grapefruit, süßlich, weniger intensiv als (+)-Nootkaton | Nootka-Scheinzypresse ( <i>Chamaecyparis nootkatensis</i> )                                                                                                                                                                                           | (Kelsey et al. 2005; Khasawneh et al. 2011; Leonhardt and Berger 2015)                                                                  |
| 6 | 5-Hydroxy-humulen      | geruchlos                       | $\alpha$ -Humulen       | Mild Holzig, leicht erdig, staubig                      | Echter Hopfen ( <i>Humulus lupulus</i> )<br>Tabak ( <i>Nicotiana tabacum</i> ),<br>Salbei ( <i>Salvia officinalis</i> ),<br>Grüne Minze ( <i>Mentha spicata</i> ),<br>versch. Ingwerarten ( <i>Zingiberaceae</i> )<br>Hanf ( <i>Cannabis sativa</i> ) | (De Moraes et al. 2001; Wang et al. 2008; Chauhan et al. 2011; Suthisut et al. 2011; Bouajaj et al. 2013; Rice and Koziel 2015)         |
| 7 | 5-Hydroxy-caryophyllen | geruchlos                       | $\beta$ -Caryophyllen   | Nelke, Würzig, Holzig                                   | Nelke ( <i>Syzygium aromaticum</i> ),<br>Hanf ( <i>Cannabis sativa</i> ),<br>Echter Hopfen ( <i>Humulus lupulus</i> ),<br>Schwarzer Pfeffer ( <i>Piper nigrum</i> ),<br>Aschantipfeffer ( <i>Piper guineense</i> )                                    | (Arctander 1969; Ghelardini et al. 2001; Jirovetz et al. 2002; Gertsch et al. 2008; Ormeño et al. 2008; Wang et al. 2008; Burdock 2010) |

|    |                                         |                        |                  |                                                              |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                          |
|----|-----------------------------------------|------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  | 5-Hydroxy-zerumbon                      | Teer, fruchtig, fettig | Zerumbon         | Nicht dokumentiert                                           | versch. Ingwerarten ( <i>Zingiber aromaticum</i> , <i>Zingiber zerumbet</i> )                                                                                            | (Usia et al. 2004; Usia et al. 2005)                                                                                     |
| 9  | 6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbon | geruchlos              |                  |                                                              |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                          |
| 10 | 6,7-Dihydro-2,3-epoxy-5-hydroxyzerumbon | geruchlos              |                  |                                                              |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                          |
| 11 | 5-Hydroxy-3(4)-cedren                   | geruchlos              | $\alpha$ -Cedren | Warm, holzig, Campher-artig, trocken, erinnert an Zedernholz | Virginischer Wacholder oder Virginische Zeder ( <i>Juniperus virginiana</i> ) Ostafrikanischer Wacholder ( <i>Juniperus procera</i> ) Tabak ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) | (Walter 1841; Walter 1843; Stork and Clarke 1955; Stork and Clarke 1961; Akeng'a and Chhabra 1997; Faraldos et al. 2010) |

\* In der wissenschaftlichen Literatur existiert kein Konsens über die qualitative Beschreibung von olfaktorischen Reizen (Sell 2005). Geruchsbeschreibungen in der vorliegenden Arbeit sind nach bestem Wissen Literaturquellen entnommen worden, die sich als Referenzen auf ihrem Gebiet erwiesen haben.

\*\* Die Literaturquellen liefern keine Angaben über die olfaktorische Reinheit der Substanzen.

Ein eindeutiges Muster in Bezug auf die Änderung von Geruchsqualitäten durch enzymatische Oxidation der Sesquiterpene lässt sich nicht erkennen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten allylischen Hydroxylierungen von Sesquiterpenen ändern den sensorischen Eindruck des Moleküls dergestalt, dass sie die Geruchsqualität zumeist auslöschen. Ein Geruchseindruck ist auf eine Gesamtheit von aktivierten Geruchsrezeptoren zurückzuführen. Eine Substanz kann entweder einen spezifischen Rezeptor oder einen Satz verschiedener Rezeptoren aktivieren (Buck and Axel 1991; Chatelain et al. 2014). Die Begründung der Veränderung des Geruchs liegt in der veränderten Struktur der Terpene und ihrer veränderten Affinität für Riechrezeptoren. Ist der Geruch durch die Hydroxylierung verändert, so wird eine andere Kombination aus Rezeptoren aktiviert. Durch die von CYP264B1 eingebrachten funktionellen Gruppen werden die Substanzen scheinbar derart verändert, dass sie nicht mehr an humane Rezeptoren binden können, um diese zu aktivieren. Auf diese Weise kann kein Geruchseindruck vermittelt werden. Die unterschiedliche Affinität für olfaktorische Rezeptoren kann bereits von geringen strukturellen Unterschieden der Riechstoffe abhängen. Aliphatische Säuren und Alkohole verschiedener Kettenlängen (Abb. 7 vgl. Hexansäure mit Heptansäure; Heptanol mit Octanol) als auch Säuren und Alkohole gleicher Kettenlänge (Abb. 7 vgl. Hexansäure mit Hexanol; Heptansäure mit Heptanol) haben verschiedene Aktivierungsprofile und damit

verbundene Geruchseigenschaften (Malnic et al. 1999). Aktuell wurden von den putativ 400 aktiven humanen Rezeptoren etwas über 100 charakterisiert (Chatelain et al. 2014). Analoge Aktivitätsuntersuchungen mit den humanen Riechrezeptoren und den in dieser Arbeit verwendeten Sesquiterpenen würden die Frage beantworten, welche Rezeptoren durch eine bestimmte Substanz angeregt werden können.

| ORs<br>odorants     | S 1 | S 3 | S 6             | S 18 | S 19 | S 25 | S 41           | S 46 | S 50 | S 51 | S 79 | S 83 | S 85           | S 86 |
|---------------------|-----|-----|-----------------|------|------|------|----------------|------|------|------|------|------|----------------|------|
| butanoic acid       |     |     |                 |      |      |      |                |      |      |      |      |      |                |      |
| pentanoic acid      |     |     |                 |      |      |      |                |      |      |      |      |      |                |      |
| hexanoic acid       |     |     |                 |      | ●    |      |                |      |      |      |      |      |                |      |
| heptanoic acid      | ●   |     |                 | ●    | 10   |      | ● <sub>c</sub> |      |      | ●    | ●    |      |                |      |
| octanoic acid       | ●   |     |                 | ●    | 10   |      | ● <sub>c</sub> | ●    |      | 10   | ●    | 10   |                |      |
| nonanoic acid       | 10  |     |                 | 10   | 1    |      | ● <sub>c</sub> | 10   |      | 10   |      | 1    |                | 10   |
| pentanol            | a   | ●   | a               |      |      |      |                | b    |      |      |      |      |                |      |
| hexanol             | b   | ●   | a               |      |      | ●    |                | b    |      |      |      |      |                |      |
| heptanol            | b   | ●   |                 |      | ●    | ●    |                | b    |      |      |      |      |                |      |
| octanol             | b   |     |                 | ●    | 10   |      | ● <sub>c</sub> | b    |      | ●    |      |      |                |      |
| nonanol             | b   |     |                 | ●    | 1    |      | ● <sub>c</sub> | b    |      | 10   |      | 1    |                |      |
| bromobutanoic acid  |     |     |                 |      |      |      |                |      |      |      |      |      | ● <sub>c</sub> |      |
| bromopentanoic acid |     |     |                 |      |      |      |                |      |      |      |      |      | ● <sub>c</sub> |      |
| bromohexanoic acid  |     |     |                 |      | ●    |      | ● <sub>c</sub> |      |      |      |      |      | 1              |      |
| bromooctanoic acid  | 10  |     |                 | ●    | 1    |      | ● <sub>c</sub> | ●    |      | 10   |      | 10   | 1              |      |
| hexanedioic acid    |     |     |                 |      |      |      |                |      |      |      |      |      | ● <sub>c</sub> |      |
| heptanedioic acid   |     |     |                 |      |      |      |                |      |      |      |      |      | ● <sub>c</sub> |      |
| octanedioic acid    |     |     | ●               |      |      |      |                |      |      |      | ●    |      | ● <sub>c</sub> |      |
| nonanedioic acid    |     |     | 10 <sub>d</sub> |      |      |      |                |      | 10   |      | 1    |      | ● <sub>c</sub> |      |

**Abbildung 7:** Aktivierungsprofile von 14 Riechrezeptoren gemessen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Verfahren. Testriechstoffe (odorants) sind in Zeilen, Riechrezeptoren S1 – S86 (ORs, olfactory receptors) sind in Spalten dargestellt. Große Kreise entsprechen einer starken Aktivierung durch den entsprechenden Riechstoff (100  $\mu\text{M}$ ), kleine Kreise entsprechen einer schwachen Aktivierung mit maximal halber Signalstärke. Aktivierung, die bereits bei Riechstoffkonzentrationen von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  festgestellt wurde, ist mit einer entsprechenden Zahl innerhalb des Kreises versehen; a: nicht getestet; b: mit 10  $\mu\text{M}$ , aber nicht mit 100  $\mu\text{M}$  getestet; c: weder mit 10  $\mu\text{M}$  noch mit 1  $\mu\text{M}$  getestet; d: nicht mit 1  $\mu\text{M}$  getestet; aus (Malnic et al. 1999).

## 6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Biosynthese von Sesquiterpenen und ihre synthetisierenden Enzyme des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56 untersucht. Im volatilen Extrakt von *S. cellulosum* So ce56 konnten 17 Terpene mit Hilfe von GC/MS-Analysen identifiziert und ihren entsprechenden Terpensynthasen (TSn) zugeordnet werden. Neue Terpenstrukturen wurden zudem mit NMR-, Röntgenbeugungs- und polarimetrischen Methoden aufgeklärt. Darunter befinden sich die zum ersten Mal beschriebenen Enantiomere (+)-Eremophilen und (-)- $\delta$ -Cadinen (Kap. 3.1 und 3.3). Dabei erwiesen sich die vier TSn als vollkommen unterschiedlich. Die einzige Typ II-TS sce4636 kann den universellen Sesquiterpenvorläufer Farnesylpyrophosphat (FPP) nicht umsetzen. sce1440 ist eine klassische Germacra-1(10)E,5E-dien-11-ol-/Geosminsynthase, deren Analoga in einer Vielzahl von Prokaryoten, einschließlich Streptomyceten und Cyanobakterien, vorkommen (Kap. 3.3). Die 10-*epi*-Cubebolsynthase sce6369 ist höchst unselektiv und produziert neben dem Hauptprodukt mindestens zwölf weitere Sesquiterpene in *S. cellulosum* So ce56, darunter auch (-)- $\delta$ -Cadinen. Damit ist sie für den größten Anteil der Terpene im volatilen Extrakt des Myxobakteriums verantwortlich (Kap. 3.3 Tab. 1). Die hochspezifische (+)-Eremophilensynthase sce8552 liegt in einem Cluster mit dem Cytochrom P450 CYP264B1 (sce8551) vor. Der Gencluster setzt FPP selektiv zu (+)-Eremophilen um und oxidiert das Sesquiterpen zu weiteren Derivaten, deren Strukturen bisher nicht bestimmt werden konnten (Kap. 3.1). *In vivo* und *in vitro* Umsätze von (+)-Eremophilen mit CYP264B1 haben gezeigt, dass die Reaktion unselektiv sechs (Kap 3.1 Abb. 3D) beziehungsweise drei (Anhang Abb. 8) Produkte liefert. In beiden Fällen hat das Hauptprodukt **1** (in Kap. 3.1 **P<sub>1</sub>**) eine Masse von 220 Da, also einen Unterschied von +16 Da zum Substrat (+)-Eremophilen (Kap 2.1 Abb. 3E). Dieser Massenunterschied lässt den Schluss zu, dass **1** entweder ein hydroxyliertes oder epoxidiertes Derivat von (+)-Eremophilen darstellt.

Versuche der Reinigung von **1** (in Kap. 3.1 **P<sub>1</sub>**) für weitere Analysen waren bisher nicht erfolgreich. Das Produkt zerfällt oder derivatisiert während des Reinigungsprozesses sowohl in wässrigen Lösungsmitteln über einer apolaren Phase als auch in organischen Lösungsmitteln über einer polaren Phase. Alternative Ansätze zur Analyse von **1** könnten über Umsätze mit CYP109D1 stattfinden. Die *in vitro* Reaktion liefert bei einem höheren Umsatz dasselbe Hauptprodukt **1** wie die Reaktion mit CYP264B1. Ein einziges Nebenprodukt (**2**) tritt auf, was die Reinigung und Strukturanalyse von **1** erheblich erleichtern sollte (Anhang Abb. 4 und 8). Die Synthese von **1** könnte auf kostengünstige, zeit- und ressourcenschonende Art über *E. coli* Ganzzellumsätze mit CYP109D1 stattfinden (Ringle 2013). Hierzu müsste gezeigt werden, dass der Umsatz zum Produkt **1** im *E. coli* Ganzzellsystem mit CYP109D1 mit der *in vitro* Reaktion bezüglich Selektivität und Ausbeute vergleichbar ist. Sollte das – wie für CYP264B1 – nicht der Fall sein, könnte der Rohextrakt eines vergrößerten *in vitro* Ansatzes für eine NMR Charakterisierung des Produktes **1** ausreichen (Ly et al. 2012).

Ein weiterer Ansatz, um die Herausforderung der Reinigung von **1** (in Kap. 3.1 **P**<sub>1</sub>) zu umgehen, wäre der Umsatz von einem <sup>13</sup>C-isotopenmarkierten (+)-Eremophilen. Aufgrund des hohen Anteils von <sup>13</sup>C bei Substrat und Produkt entstehen selbst durch eine komplexe Matrix von Ganzzellumsätzen keine nennenswerten Störsignale bei NMR-Analysen. Dickschat und Mitarbeiter haben <sup>13</sup>C-isotopenmarkiertes FPP dazu genutzt, Mechanismen von TS<sub>n</sub> und Strukturen der Sesquiterpene per NMR zu untersuchen (Rabe et al. 2015). Auf analoge Art und Weise könnten die Positionen und Arten der durch P450s eingeführten funktionellen Gruppen identifiziert werden. Für NMR-Analysen sollten jedoch die Umsätze möglichst selektiv und quantitativ sein, da sonst die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden <sup>13</sup>C-isotopenmarkierten Produkten zu komplex wird. Solche Umsätze von (+)-Eremophilen lassen sich am wahrscheinlichsten mit CYP109D1 erzielen. Indizien für Oxidationspositionen könnten sich jedoch auch ohne präparative Trennung im Fragmentmuster von Massenspektren isotopenmarkierter Substanzen feststellen lassen (Rabe et al. 2015).

Im volatilen Extrakt von *S. cellulorum* So ce56 ist (+)-Eremophilen zwar unter den Substanzen mit dem höchsten Vorkommen, es wurden aber weder das Hauptoxidationsprodukt **1** noch andere oxidierte Derivate von (+)-Eremophilen (**2** - **45**) darin gefunden. Daher ist es möglich, dass weitere Derivatisierungen – ähnlich dem Sorangadenosin (Ahn et al. 2008) – stattgefunden haben und wahrscheinlich, dass sich die (+)-Eremophilenderivate innerhalb der Zellen befinden. Zur Identifizierung dieser Terpene aus einem komplexen Zellextrakt und ihrer Strukturanalyse sind LC/MS-basierte Metabolomics-Ansätze die Methode der Wahl (Krug and Müller 2014). Die bereits identifizierten Massen und Fragmentspektren von (+)-Eremophilen und seinen Oxidationsprodukten aus den *in vitro* (Tab. 4 und Anhang Abb. 11 – 55) und *in vivo* Umsätzen (Kap 3.1) stellen dabei authentische Referenzstandards dar.

Als Folge seiner natürlichen Funktion als (+)-Eremophilenhydroxylase, lag die Vermutung nahe, CYP264B1 sei in der Lage, auch weitere Sesquiterpene zu oxidieren. Um das Substratspektrum von CYP264B1 zu testen, wurden Eremophilane, Humulane, Caryophyllane und Cedrane umgesetzt. Das Enzym erwies sich als selektive allylische Hydroxylase für alle vier Strukturklassen der Sesquiterpene. Strukturanalysen der Hauptprodukte zeigten, dass die Eremophilane (+)-Valencen, Nootkaten, *trans*-Nootkatol und (+)-Nootkaton primär an der allylischen Position C-13 hydroxyliert werden (Kap. 3.2 Schema 2 und Kap. 4.1 Schema 10). Dies lässt vermuten, dass die verschiedenen Eremophilane trotz der Unterschiede ihrer funktionellen Gruppen (Anzahl der Doppelbindungen im Decalin-Bicyclus und Oxidationsstufe des C-2-Atoms) ähnliche Bindungskonformationen im aktiven Zentrum von CYP264B1 einnehmen. Dies gilt ebenfalls für Caryophyllane und Humulane. Sowohl eine zusätzliche intramolekulare C-C-Bindung ( $\beta$ -Caryophyllen im Vergleich zu  $\alpha$ -Humulen) als auch eine Ketogruppe an C-8 (Zerumbon im Vergleich zu  $\alpha$ -Humulen) haben keinen Einfluss auf die primäre Hydroxylierungsposition C-5 (Kap. 3.2 Schema 2).

Um die möglichen Bindungskonformationen der Sesquiterpene im aktiven Zentrum von CYP264B1 zu beleuchten, wurden Dockingstudien durchgeführt (Kap. 4.4). Unter Einbeziehung der These, dass nur allylische Positionen oxidierbar sind, konnten für die Umsätze von *trans*-Nootkatol, (+)-Nootkaton,  $\beta$ -Caryophyllen,  $\alpha$ -Humulen, Zerumbon und  $\alpha$ -Cedren gute Übereinstimmungen zwischen den Produktstrukturen und den C-Atomen der Sesquiterpene in der Nähe des Häm-Eisens beobachtet werden (Tab. 5, Zeilen 4 – 9). Basierend darauf und auf den strukturellen Analysen der hydroxylierten Eremophilane sind bei der Oxidation von (+)-Eremophilen ebenfalls ein an C-13 hydroxyliertes Derivat als Hauptprodukt zu erwarten. Docking von (+)-Eremophilen ins Homologiemodell von CYP264B1 suggeriert jedoch eine Konformation, bei der die Atome C-3, C-2, C-1 und C-4 in einer Entfernung zum Häm-Eisen liegen, die eine Oxidation möglich macht (Tab. 5 Zeile 1, Anhang Abb. 68). Von den vier Positionen ist C-2 die einzige allylische und damit auch wahrscheinlichste Oxidationsposition in dieser Bindungskonformation. Zudem können die Dockingstudien für die nichtoxidierten Eremophilane (+)-Valencen und Nootkaten keine Erklärung der C-13-Hydroxylierung liefern, da in der jeweils einzigen Konformation C-13 zu weit vom Häm-Eisen entfernt ist (Tab. 5, Zeilen 2 und 3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder die auf der Basis eines Homologiemodells errechnete Struktur von CYP264B1 (Ly et al. 2012) noch das Docking der Enzym-Substrat-Komplexe eine umfassende Erklärung der Oxidationsprodukte von allen umgesetzten Sesquiterpenen liefern können. Somit ist Docking auf Basis der vorliegenden Daten zur Vorhersage einer wahrscheinlichen Oxidationsposition für (+)-Eremophilen (Tab. 5, Zeile 1) nicht geeignet. Ob die errechneten Strukturen von CYP264B1 sowie der Enzym-Substrat-Komplexe mit der Tertiärstruktur des Enzyms übereinstimmen, würde durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalysen deutlich. Ähnliche Studien wurden im AK Bernhardt bereits mit CYP106A2 aus *B. megaterium* (Janocha et al. 2016) sowie der Terpenoxidase CYP260A1 aus *S. cellulorum* So ce56 (Khatri et al. 2016) erfolgreich durchgeführt.

Da volatile Terpene häufig als Riechstoffe verwendet werden, sind neue Vertreter dieser Substanzklasse immer Kandidaten für sensorische Analysen. Die neuen bakteriellen Enantiomere (+)-Eremophilen und (–)- $\delta$ -Cadinen erwiesen sich als geruchlos. Alle durch CYP264B1 eingeführten Hydroxylierungen verändern den Geruch der Sesquiterpene. Bis auf 13-Hydroxynootkatol und 5-Hydroxyzerumbon sind alle der Produkte geruchlos (Tab. 6) und damit derart verändert, dass sie humane Geruchsrezeptoren nicht mehr aktivieren. Aktuell sind die humanen Geruchsrezeptoren noch kaum charakterisiert. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass kleinste strukturelle Veränderungen von Riechstoffen (Kettenlänge von Aliphaten, Oxidationsstufe zwischen Alkohol und organischer Säure) über die Affinität zu Rezeptoren und damit auch über die Geruchsqualität entscheiden (Malnic et al. 1999). Der Geruch neuer Stoffe kann nicht vorhergesagt und muss für jede Substanz neu evaluiert werden (Rossiter 1996). In

diesem Zusammenhang sind die hydroxylierten Sesquiterpene trotz fehlenden Geruchs für zwei Arten von Anwendungen interessant:

Einerseits können die eingeführten Hydroxylgruppen chemisch oder enzymatisch zu Aldehyden, Ketonen und organischen Säuren weiteroxidiert werden. Die neuen Derivate könnten selbst interessante Riechstoffe darstellen und müssten sensorisch getestet werden. Systematische Derivatisierungen von bekannten Riechstoffen sind ein üblicher und erfolgversprechender Ansatz bei der Suche nach neuen Riechstoffen (Panten et al. 2005). Andererseits könnten die hydroxylierten Sesquiterpene gemeinsam mit ihren Substraten bei der Charakterisierung weiterer Geruchsrezeptoren behilflich sein (Chatelain et al. 2014). Dabei würden die riechenden Sesquiterpene Rezeptoren aktivieren und die olfaktorisch inaktiven hydroxylierten Sesquiterpene könnten als Negativkontrollen aus derselben Strukturfamilie dienen.

Diese Arbeit stellt *S. cellulorum* So ce56 als Produzenten der neuen volatilen Terpene (+)-Eremophilen, (-)- $\delta$ -Cadinen und 10-*epi*-Cubebol heraus. Damit zeigt sie auf, welche Vielfalt an Terpenstrukturen von Bakterien produziert wird. Neue bakterielle Terpene werden in naher Zukunft durch Naturstoffforscher beschrieben werden. Die Möglichkeit, volatile Terpene mit Cytochromen P450 wie CYP264B1 selektiv zu derivatisieren, eröffnet Zugang zu größeren Familien von Riechstoffmolekülen und der potentiellen Entdeckung neuer Duftnoten. Zudem werden solche Familien von Riechstoffen essentiell bei der Charakterisierung von Geruchsrezeptoren werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- (2016). "Hermann A Mes Cotes Me Paraissait Une Ombre." from <https://etatlibredorange.com/shop/hermann-a-mes-cotes/>.
- Aaron, J. A., et al. (2010). "Structure of Epi-Isozizaene Synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), a Platform for New Terpenoid Cyclization Templates." Biochemistry **49**(8): 1787-1797.
- Ahn, J.-W., et al. (2008). "Sorangiadenosine, a New Sesquiterpene Adenoside from the *Myxobacterium Sorangium cellulosum*." Organic Letters **10**(6): 1167-1169.
- Akeng'a, T. A. and S. C. Chhabra (1997). "Analysis of the essential oil of *Juniperus procera* Endl. growing in Kenya." Afr J Med Med Sci. **26**(1-2): 79-81.
- Ambike, S. H. and R. M. Baxter (1970). "Cytochrome P-450 and b5 in *Claviceps purpurea*: Interconversion of P-450 and P-420." Phytochemistry **9**(9): 1959-1962.
- Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherová (2001). "Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **58**(5): 737-747.
- Arctander, S. (1969). Perfume and Flavour Chemicals. Montclair N. J., USA.
- Arigoni, D. (1968). "Some studies in the biosynthesis of terpenes and related compounds." Pure Appl Chem. **17**(3): 331-348.
- Arigoni, D. (1975). "Stereochemical aspects of sesquiterpene biosynthesis." Pure and Applied Chemistry **41**(1 - 2): 219 - 245.
- Baer, P., et al. (2014). "Induced-Fit Mechanism in Class I Terpene Cyclases." Angewandte Chemie International Edition **53**(29): 7652-7656.
- Barrero, A. F., et al. (1991). "Oxygenated sesquiterpenes from the wood of *Juniperus oxycedrus*." Phytochemistry **30**(5): 1551-1554.
- Baumann, S., et al. (2014). "Cystobactamids: Myxobacterial Topoisomerase Inhibitors Exhibiting Potent Antibacterial Activity." Angewandte Chemie International Edition **53**(52): 14605-14609.
- Bazemore, R., et al. (1999). "Volatiles from Unpasteurized and Excessively Heated Orange Juice Analyzed with Solid Phase Microextraction and GC-Olfactometry." Journal of Food Science **64**(5): 800-803.
- Bazzali, O., et al. (2016). "Integrated Analysis of the Wood Oil from *Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & Hiep. by Chromatographic and Spectroscopic Techniques." Molecules **21**(7): 840.
- Bear, I. J. and R. G. Thomas (1964). "Nature of Argillaceous Odour." Nature **201**(4923): 993-995.
- Beekwilder, J., et al. (2014). "Valencene synthase from the heartwood of *Nootka cypress* (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene." Plant Biotechnology Journal **12**(2): 174-182.
- Bernhardt, R. and V. Urlacher (2014). "Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations." Appl. Microbiol. Biotechnol. **98**(14): 6185-6203.
- Bertea, C. M., et al. (2005). "Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*." Planta Med. **71**(1): 40-47.
- Berthelot, M. and G. André (1891). "Sur l'odeur propre de la terre." Comptes Rendus de l'Académie des Sciences **112**: 598-599.
- Bouajaj, S., et al. (2013). "Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco." Natural Product Research **27**(18): 1673-1676.
- Boutanaev, A. M., et al. (2015). "Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(1): E81-E88.
- Breitmaier, E. (2006). Hemi- and Monoterpenes. Terpenes, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 10-23.
- Breitmaier, E. (2008). Sesquiterpene. Terpene. Weinheim, Wiley: 23-50.
- Breitmaier, E. (2008). Terpene, Bedeutung, Bauprinzip, Biosynthese. Terpene. Weinheim, Wiley: 1-9.

- Brock, N. L., et al. (2013). "A Detailed View of 2-Methylisoborneol Biosynthesis." Angewandte Chemie International Edition **52**(7): 2100-2104.
- Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.
- Burdock, G. A. (2010). Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients CRC Press.
- Cane, D. E., et al. (2006). "Geosmin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular Cloning, Expression, and Mechanistic Study of the Germacradienol/Geosmin Synthase." J Antibiot **59**(8): 471-479.
- Cane, D. E. and H. Ikeda (2012). "Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome." Acc. Chem. Res. **45**(3): 463-472.
- Cane, D. E. and C. Pargellis (1987). "Partial purification and characterization of pentalenene synthase." Archives of Biochemistry and Biophysics **254**(2): 421-429.
- Cane, D. E., et al. (1981). "Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis. Biosynthesis of pentalenolactone from [U-13C6]glucose and [6-2H2]glucose." Journal of the American Chemical Society **103**(7): 1838-1843.
- Cane, D. E. and R. M. Watt (2003). "Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(4): 1547-1551.
- Cankar, K., et al. (2013). "Valencene oxidase CYP706M1 from Alaska cedar (*Callitropsis nootkatensis*)." FEBS Letters(0).
- Chang, M. C., et al. (2007). "Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s." Nat. Chem. Biol. **3**(5): 274-277.
- Chatelain, P., et al. (2014). "Deorphanization and Characterization of Human Olfactory Receptors in Heterologous Cells." Chemistry & Biodiversity **11**(11): 1764-1781.
- Chauhan, S. S., et al. (2011). "Chemical diversity in *Mentha spicata*: antioxidant and potato sprout inhibition activity of its essential oils." Nat Prod Commun. **6**(9): 1373-1378.
- Christianson, D. W. (2006). "Structural Biology and Chemistry of the Terpenoid Cyclases." Chemical Reviews **106**(8): 3412-3442.
- Christianson, D. W. (2008). "Unearthing the Roots of the Terpenome." Current opinion in chemical biology **12**(2): 141-150.
- Citron, C. A., et al. (2012). "Terpenoids are Widespread in Actinomycetes: A Correlation of Secondary Metabolism and Genome Data." ChemBioChem **13**(2): 202-214.
- Clavijo McCormick, A., et al. (2014). "Herbivore-induced volatile emission in black poplar - regulation and role in attracting herbivore enemies." Plant, Cell & Environment: n/a-n/a.
- Connor, D. T., et al. (1977). "W-7783, a unique antifungal antibiotic." The Journal of Organic Chemistry **42**(23): 3664-3669.
- Croteau, R. B., et al. (1985). "Mechanism of the pyrophosphate migration in the enzymic cyclization of geranyl and linalyl pyrophosphates to (+)- and (-)-bornyl pyrophosphates." Biochemistry **24**(25): 7077-7085.
- Davey, S. (2015). "2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Punishing parasites." Nat Chem **7**(12): 949-949.
- De Moraes, C. M., et al. (2001). "Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females." Nature **410**(6828): 577-580.
- Denisov, I. G., et al. (2005). "Structure and chemistry of cytochrome P450." Chem. Rev. **105**(6): 2253-2277.
- Dickschat, J. S. (2016). "Bacterial terpene cyclases." Natural Product Reports.
- Dickschat, J. S., et al. (2005). "A Novel Type of Geosmin Biosynthesis in Myxobacteria." The Journal of Organic Chemistry **70**(13): 5174-5182.
- Dickschat, J. S., et al. (2005). "Biosynthesis and Identification of Volatiles Released by the Myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*." ChemBioChem **6**(11): 2023-2033.
- Dickschat, J. S., et al. (2007). "Biosynthesis of the Off-Flavor 2-Methylisoborneol by the Myxobacterium *Nannocystis exedens*." Angewandte Chemie International Edition **46**(43): 8287-8290.
- Dickschat, J. S., et al. (2014). "An Improved Technique for the Rapid Chemical Characterisation of Bacterial Terpene Cyclases." ChemBioChem **15**(6): 810-814.
- Dickschat, J. S., et al. (2004). "Biosynthesis of Volatiles by the Myxobacterium *Myxococcus xanthus*." ChemBioChem **5**(6): 778-787.

- Diestel, R., et al. (2009). "Chivosazoles A and F, cytostatic macrolides from myxobacteria, interfere with actin." Chembiochem **10**(18): 2900-2903.
- Estabrook, R. W. (2003). "A Passion for P450s (Remembrances of the Early History of Research on Cytochrome P450)." Drug Metabolism and Disposition **31**(12): 1461-1473.
- Estabrook, R. W., et al. (1963). "The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition of the Steroid C21-Hydroxylase System of the Adrenal Cortex." Biochem Z. **19**(338): 741-755.
- Ewen, K. (2010). In vitro Untersuchung potentieller Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen des Myxobakteriums Sorangium cellulosum So ce56.
- Ewen, K. M., et al. (2009). "Genome mining in *Sorangium cellulosum* So ce56 - identification and characterization of the homologous electron transfer proteins of a myxobacterial cytochrome P450." J. Biol. Chem. **284**(42): 28590-28598.
- Faraldos, J. A., et al. (2010). "Bisabolyl-Derived Sesquiterpenes from Tobacco 5-Epi-aristolochene Synthase-Catalyzed Cyclization of (2Z,6E)-Farnesyl Diphosphate." Journal of the American Chemical Society **132**(12): 4281-4289.
- Fehr, C. and J. Galindo (1991). Use of cycloaliphatic ketones as perfuming and flavoring ingredients. USA, Firmenich & Cie.
- Finefield, J. M., et al. (2012). "Enantiomere Naturstoffe: Vorkommen und Biogenese." Angewandte Chemie **124**(20): 4886-4920.
- Finkelstein, R. (2013). "Absciscic Acid Synthesis and Response." The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists **11**: e0166.
- Forli, S. (2014). "Epothilones: from discovery to clinical trials." Current topics in medicinal chemistry **14**(20): 2312-2321.
- Fraatz, M., et al. (2009). "Nootkatone—a biotechnological challenge." Applied Microbiology and Biotechnology **83**(1): 35-41.
- Franke, J., et al. (2015). "Total and Semi-Syntheses of Antimicrobial Thuggacin Derivatives." Chemistry – A European Journal **21**(11): 4272-4284.
- Gao, Y., et al. (2012). "Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis." Nat. Prod. Rep. **29**(10): 1153-1175.
- Garfinkel, D. (1958). "Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions." Archives of Biochemistry and Biophysics **77**(2): 493-509.
- Gerber, N. N. (1967). "Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes." Biotechnology and Bioengineering **9**(3): 321-327.
- Gerber, N. N. (1971). "Sesquiterpenoids from actinomycetes: Cadin-4-ene-1-ol." Phytochemistry **10**(1): 185-189.
- Gerber, N. N. (1973). "Volatile lactones from Streptomyces." Tetrahedron Letters **14**(10): 771-774.
- Gerber, N. N. and H. A. Lechevalier (1965). "Geosmin, an Earthy-Smelling Substance Isolated from Actinomycetes." Applied Microbiology **13**(6): 935-938.
- Gershenzon, J. and N. Dudareva (2007). "The function of terpene natural products in the natural world." Nat. Chem. Biol. **3**(7): 408-414.
- Gerth, K., et al. (1996). "Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties." J Antibiot (Tokyo) **49**(6): 560-563.
- Gerth, K., et al. (2003). "Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*." J. Biotechnol. **106**(2-3): 233-253.
- Gertsch, J., et al. (2008). "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(26): 9099-9104.
- Ghalib, R. M., et al. (2011). "Phytochemical analysis, cytotoxic activity and constituents—activity relationships of the leaves of *Cinnamomum iners* (Reinw. ex Blume-Lauraceae)." Natural Product Research **26**(22): 2155-2158.
- Ghelardini, C., et al. (2001). "Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene." Il Farmaco **56**(5–7): 387-389.
- Girhard, M., et al. (2009). "Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system." Microb. Cell Fact. **8**(1): 36.

- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**(6257): 425-430.
- Goodin, S., et al. (2004). "Epothilones: mechanism of action and biologic activity." J. Clin. Oncol. **22**(10): 2015-2025.
- Guengerich, F. P. (2001). "Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity." Chemical Research in Toxicology **14**(6): 611-650.
- Guengerich, F. P. (2007). "Cytochrome P450 and Chemical Toxicology." Chemical Research in Toxicology **21**(1): 70-83.
- Hall, J. B. and J. M. Sanders (1975). Perfume Compositions and Perfume Articles Containing One Isomer of an Octahydrotetramethylacetone. USA.
- Han, K., et al. (2013). "Extraordinary expansion of a *Sorangium cellulosum* genome from an alkaline milieu." Sci. Rep. **3**.
- Hannemann, F., et al. (2007). "Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains." Biochim. Biophys. Acta. **1770**(3): 330-344.
- Harada, H. and N. Misawa (2009). "Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **84**(6): 1021-1031.
- Harada, H., et al. (2011). "Efficient functional analysis system for cyanobacterial or plant cytochromes P450 involved in sesquiterpene biosynthesis." Appl. Microbiol. Biotechnol. **90**(2): 467-476.
- Hochmannova, J. and V. Herout (1964). "Terpenes. CLXIX. Structure of eremophilene." Collect. Czech. Chem. Commun. **29**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2369-2376.
- Hunter, G. L. K. and W. B. Brogden (1965). "Terpenes and Sesquiterpenes in Cold-pressed Orange Oil." Journal of Food Science **30**(1): 1-4.
- Hyatt, D. C., et al. (2007). "Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(13): 5360-5365.
- Isin, E. and F. Guengerich (2007). "Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes." Biochim Biophys Acta **1770**: 314 - 329.
- Janocha, S., et al. (2016). "Crystal Structure of CYP106A2 in Substrate-Free and Substrate-Bound Form." ChemBioChem **17**(9): 852-860.
- Jeleń, H. H., et al. (2003). "Determination of Geosmin, 2-Methylisoborneol, and a Musty-Earthy Odor in Wheat Grain by SPME-GC-MS, Profiling Volatiles, and Sensory Analysis." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(24): 7079-7085.
- Jiang, J., et al. (2006). "Geosmin Biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* Germacradienol/Germacrene D Synthase Converts Farnesyl Diphosphate to Geosmin." Journal of the American Chemical Society **128**(25): 8128-8129.
- Jiang, J., et al. (2007). "Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme." Nat Chem Biol **3**(11): 711-715.
- Jirovetz, L., et al. (2002). "Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry." Journal of Chromatography A **976**(1–2): 265-275.
- Joulain, D. and W. A. König (1998). The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E.B.-Verlag, Hamburg.
- Karmann, L., et al. (2015). "Total Syntheses and Biological Evaluation of Miuraenamides." Angewandte Chemie International Edition **54**(15): 4502-4507.
- Kaspera, R. (2004). Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse, Leibniz Universität.
- Kaspera, R. and R. Croteau (2006). "Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis." Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe **5**(2-3): 433-444.
- Kato, H. (1955). "Notes on myxobacteria. I. The myxobacterial population in alpine soils." Ecol. Rev. Sendai **14**: 25–28.
- Keasling, J. D. and H. Chou (2008). "Metabolic engineering delivers next-generation biofuels." Nat Biotech **26**(3): 298-299.

- Keller, L., et al. (2015). "Macyranones: Structure, Biosynthesis, and Binding Mode of an Unprecedented Epoxyketone that Targets the 20S Proteasome." Journal of the American Chemical Society **137**(25): 8121-8130.
- Kelsey, R. G., et al. (2005). "Changes in Heartwood Chemistry of Dead Yellow-Cedar Trees that Remain Standing for 80 Years or More in Southeast Alaska." Journal of Chemical Ecology **31**(11): 2653-2670.
- Kern, F., et al. (2015). "Highly Efficient CYP167A1 (EpoK) dependent Epothilone B Formation and Production of 7-Ketone Epothilone D as a New Epothilone Derivative." Scientific Reports **5**: 14881.
- Kern, F., et al. (2016). "CYP267A1 and CYP267B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56 are Highly Versatile Drug Metabolizers." Drug Metabolism and Disposition **44**(4): 495-504.
- Khasawneh, M. A., et al. (2011). "Biologically important eremophilane sesquiterpenes from alaska cedar heartwood essential oil and their semi-synthetic derivatives." Molecules **16**(6): 4775-4785. doi: 4710.3390/molecules16064775.
- Khatri, Y. (2009). The Cytochrome P450 complement of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 and characterization of two members, CYP109D1 and CYP260A1 Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Khatri, Y., et al. (2016). "Structural characterization of CYP260A1 from *Sorangium cellulosum* to investigate the 1 $\alpha$ -hydroxylation of a mineralocorticoid." FEBS Letters: n/a-n/a.
- Khatri, Y., et al. (2010). "Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56." Applied Microbiology and Biotechnology **88**(2): 485-495.
- Khatri, Y., et al. (2010). "The CYPome of *Sorangium cellulosum* So ce56 and Identification of CYP109D1 as a New Fatty Acid Hydroxylase." Chem. Biol. **17**(12): 1295-1305.
- Khatri, Y., et al. (2011). "Investigation of cytochromes P450 in myxobacteria: Excavation of cytochromes P450 from the genome of *Sorangium cellulosum* So ce56." FEBS Letters **585**(11): 1506-1513.
- Khatri, Y., et al. (2016). "Substrate Hunting for the Myxobacterial CYP260A1 Revealed New 1 $\alpha$ -Hydroxylated Products from C-19 Steroids." ChemBioChem **17**(1): 90-101.
- Kitayama, T., et al. (2010). "Synthesis of optically active tetrahydrozerumbone." Tetrahedron: Asymmetry **21**(1): 11-15.
- Kling, A., et al. (2015). "Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins." Science **348**(6239): 1106-1112.
- Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat liver microsomes." Arch. Biochem. Biophys. **75**(2): 376-386.
- Křepinský, J., et al. (1968). "The Structure of Eremophilene, the Sesquiterpenic Hydrocarbon from *Petasites* genus." Tetrahedron Letters **9**(29): 3315-3318.
- Krug, D. and R. Müller (2014). "Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products." Natural Product Reports **31**(6): 768-783.
- Leonhardt, R.-H. and R. G. Berger (2015). Nootkatone. Biotechnology of Isoprenoids. J. Schrader and J. Bohlmann. Cham, Springer International Publishing: 391-404.
- Ligon, J., et al. (2002). "Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26." Gene **285**(1-2): 257-267.
- Lin, H.-C., et al. (2014). "Generation of Complexity in Fungal Terpene Biosynthesis: Discovery of a Multifunctional Cytochrome P450 in the Fumagillin Pathway." Journal of the American Chemical Society **136**(11): 4426-4436.
- Litzenburger, M. and R. Bernhardt (2016). "Selective oxidation of carotenoid-derived aroma compounds by CYP260B1 and CYP267B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56." Appl. Biochem. Biotechnol. **in press**.
- Litzenburger, M., et al. (2014). "Conversions of Tricyclic Antidepressants and Antipsychotics with Selected P450s from *Sorangium cellulosum* So ce56." Drug Metab. Dispos.
- Lopez-Gallego, F., et al. (2010). "Sesquiterpene Synthases Cop4 and Cop6 from *Coprinus cinereus*: Catalytic Promiscuity and Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate Geometric Isomers." ChemBioChem **11**(8): 1093-1106.
- Lund, E. D., et al. (1970). "Nootkatene from *Citrus sinensis*." Phytochemistry **9**(11): 2419-2422.

- Luo, P., et al. (2001). "Molecular cloning and functional identification of (+)- $\delta$ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis." The Plant Journal **28**(1): 95-104.
- Ly, T. B., et al. (2012). "CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56: a fascinating norisoprenoid and sesquiterpene hydroxylase." Appl. Microbiol. Biotechnol. **95**(1): 123-133.
- Malnic, B., et al. (1999). "Combinatorial Receptor Codes for Odors." Cell **96**(5): 713-723.
- Markham, A., et al. (1972). "Spectral evidence for the presence of cytochrome P-450 in microsomal fractions obtained from some higher plants." Biochemical Journal **130**(2): 90P.
- Martin, V. J. J., et al. (2003). "Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids." Nat Biotech **21**(7): 796-802.
- Martin, V. J. J., et al. (2001). "The in vivo synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli*." Biotechnology and Bioengineering **75**(5): 497-503.
- Melan, M. A., et al. (1993). "An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate." Plant Physiology **101**(2): 441-450.
- Miyanaga, S., et al. (2009). "Synthesis and evaluation of myxochelin analogues as antimetastatic agents." Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**(7): 2724-2732.
- Moody, S. C., et al. (2012). "Investigating conservation of the albaflavenone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in streptomycetes." FEBS J. **279**(9): 1640-1649.
- Nakano, C., et al. (2011). "Characterization of a Novel Sesquiterpene Cyclase Involved in (+)-Caryolan-1-ol Biosynthesis in *Streptomyces griseus*." Journal of Biological Chemistry **286**(32): 27980-27987.
- Nebert, D. W., et al. (1987). "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." DNA **6**(1): 1-11.
- Nebert, D. W., et al. (2013). "Human cytochromes P450 in health and disease." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **368**(1612): 20120431.
- Nelson, D. R. (2011). "Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450." Biochim. Biophys. Acta **1814**(1): 14-18.
- Nelson, D. R. (2013). "A world of cytochrome P450s." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **368**(1612): 20120430.
- Nelson, D. R., et al. (2004). "Comparative Genomics of Rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 Cytochrome P450 Genes and Pseudogenes from a Monocot and a Dicot." Plant Physiology **135**(2): 756-772.
- Norén, B. and K. B. Raper (1962). "Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity." J. Bacteriol. **84**: 157-162.
- Ogura, H., et al. (2004). "EpoK, a cytochrome P450 involved in biosynthesis of the anticancer agents epothilones A and B. Substrate-mediated rescue of a P450 enzyme." Biochemistry **43**(46): 14712-14721.
- Ohloff, G. and E. Demole (1987). "Importance of the odoriferous principle of Bulgarian rose oil in flavour and fragrance chemistry." Journal of Chromatography A **406**: 181-183.
- Ohloff, G., et al. (2011). Scent and Chemistry. Zürich, Wiley VCH.
- Oldfield, E. and F.-Y. Lin (2012). "Terpene Biosynthesis: Modularity Rules." Angewandte Chemie International Edition **51**(5): 1124-1137.
- Omura, T. (2013). "Contribution of cytochrome P450 to the diversification of eukaryotic organisms." Biotechnology and Applied Biochemistry **60**(1): 4-8.
- Omura, T. and R. Sato (1962). "A new cytochrome in liver microsomes." J. Biol. Chem. **237**: 1375-1376.
- Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature." J Biol Chem **239**: 2370 - 2378.
- Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties." J Biol Chem **239**: 2379 - 2385.
- Ormeño, E., et al. (2008). "Production and Diversity of Volatile Terpenes from Plants on Calcareous and Siliceous Soils: Effect of Soil Nutrients." Journal of Chemical Ecology **34**(9): 1219-1229.

- Oxford, A. E. (1947). "Observations Concerning the Growth and Metabolic Activities of Myxococci in a Simple Protein-free Liquid Medium." Journal of Bacteriology 53(2): 129-138.
- Paddon, C. J., et al. (2013). "High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin." Nature 496(7446): 528-532.
- Panten, J., et al. (2005). New Woody and Ambery Notes from Cedarwood and Turpentine Oil. Perspectives in Flavor and Fragrance Research. P. Kraft and K. A. D. Swift. Zürich, Verlag Helvetica Chimica Acta: 105-117.
- Pateraki, I., et al. (2015). Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. Biotechnology of Isoprenoids. J. Schrader and J. Bohlmann. Berlin Heidelberg, Springer. 148: 107-139.
- Petersen, M. A., et al. (2011). "Chemical and Sensory Quantification of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Recirculated Aquacultures in Relation to Concentrations in Basin Water." Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(23): 12561-12568.
- Peterson, J. E. (1969). "The fruiting myxobacteria: their properties, distribution and isolation." J Appl Bacteriol. 32(1): 5-12.
- Piers, E. and R. J. Keziere (1968). "Stereoselective synthesis of ( $\pm$ )-eremophil-3,11-diene and related compounds. Comments on the proposed structure of eremophilene." Tetrahedron Letters 9(5): 583-586.
- Piers, E. and R. J. Keziere (1969). "Stereoselective synthesis of ( $\pm$ )-eremophil-3,11-diene and related compounds. Concerning the structure of eremophilene." Canadian Journal of Chemistry 47(1): 137-144.
- Rabe, P., et al. (2015). "Conformational Analysis, Thermal Rearrangement, and EI-MS Fragmentation Mechanism of (1(10)E,4E,6S,7R)-Germacradien-6-ol by  $^{13}\text{C}$ -Labeling Experiments." Angewandte Chemie International Edition: n/a-n/a.
- Rabe, P. and J. S. Dickschat (2013). "Rapid Chemical Characterization of Bacterial Terpene Synthases." Angewandte Chemie International Edition 52(6): 1810-1812.
- Rabe, P., et al. (2015). "Structures and Biosynthesis of Corvol Ethers—Sesquiterpenes from the Actinomycete *Kitasatospora setae*." Angewandte Chemie International Edition: n/a-n/a.
- Reichenbach, H. (1999). "The ecology of the myxobacteria." Environmental Microbiology 1(1): 15-21.
- Reichenbach, H. and G. Höfle (1993). "Biologically active secondary metabolites from myxobacteria." Biotechnol. Adv. 11(2): 219-277.
- Reichenbach, H. and G. Höfle (2012). "Discovery and Development of the Epothilones." Drugs in R & D 9(1): 1-10.
- Renold, W., et al. (1974). "An Investigation of the Tea Aroma. Part I. New volatile black tea constituents." Helvetica Chimica Acta 57(5): 1301-1308.
- Rice, S. and J. A. Koziel (2015). "Characterizing the Smell of Marijuana by Odor Impact of Volatile Compounds: An Application of Simultaneous Chemical and Sensory Analysis." PLoS One 10(12): e0144160.
- Ringel, S. M., et al. (1977). "Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic." J Antibiot (Tokyo). 30(5): 371-375.
- Ringle, M. (2013). Charakterisierung ausgewählter Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 Neue potentielle Biokatalysatoren Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Ringle, M., et al. (2013). "Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based *Escherichia coli* whole-cell bioconversions." Appl. Microbiol. Biotechnol. 97(17): 7741-7754.
- Ro, D.-K., et al. (2006). "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast." Nature 440(7086): 940-943.
- Roach, M. P., et al. (1999). "The Role of the Distal and Proximal Protein Environments in Controlling the Ferric Spin State and in Stabilizing Thiolate Ligation in Heme Systems: Thiolate Adducts of the Myoglobin H93G Cavity Mutant." Journal of the American Chemical Society 121(51): 12088-12093.
- Rohmer, M. (1998). Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? Progress in Drug Research. E. Jucker. Basel, Birkhäuser Basel: 135-154.

- Rossiter, K. J. (1996). "Structure–Odor Relationships." Chemical Reviews **96**(8): 3201-3240.
- Ruzicka, L. (1953). "The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds." Experientia **9**(10): 357-367.
- Ruzicka, L. and M. Stoll (1922). "Höhere Terpenverbindungen VII. Konstitution des Eudalins, des Selinens und des  $\alpha$ -Santalens. Das Kohlenstoffgerüst der Sesquiterpene." Helvetica Chimica Acta **5**(6): 923-936.
- Schaberle, T. F., et al. (2014). "Antibiotics from myxobacteria." Natural Product Reports **31**(7): 953-972.
- Schieferdecker, S., et al. (2015). "Myxochelins Target Human 5-Lipoxygenase." Journal of Natural Products **78**(2): 335-338.
- Schiffer, L., et al. (2015). "The CYP11B subfamily." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **151**: 38-51.
- Schiffrin, A., et al. (2015). "Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation." ChemBioChem **16**(2): 337-344.
- Schilling, B., et al. (2010). "Investigation of odors in the fragrance industry." Chemoecology **20**(2): 135-147.
- Schneiker, S., et al. (2007). "Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*." Nat. Biotechnol. **25**(11): 1281-1289.
- Schrepfer, P., et al. (2016). "Identification of amino acid networks governing catalysis in the closed complex of class I terpene synthases." Proc Natl Acad Sci U S A. **113**(8): E958-967. doi: 10.1073/pnas.1519680113. Epub 1519682016 Feb 1519680113.
- Schulz, S., et al. (2004). "Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*." Tetrahedron **60**(17): 3863-3872.
- Sell, C. S. (2005). Scent through the Looking Glass. Perspectives in Flavour and Fragrance Research. P. Kraft and K. A. D. Swift. Zürich, Verlag Helvetica Chimica Acta: 67-88.
- Sell, C. S., Ed. (2006). The Chemistry of Fragrances. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- Sharon-Asa, L., et al. (2003). "Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene." Plant Journal **36**: 664 - 674.
- Spiteller, D., et al. (2002). "Feeding of [5,5-2H<sub>2</sub>]-1-desoxy-d-xylulose and [4,4,6,6,6-2H<sub>5</sub>]-mevalolactone to a geosmin-producing *Streptomyces* sp. and *Fossombronia pusilla*." Phytochemistry **61**(7): 827-834.
- Steele, C. L., et al. (1998). "Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (*Abies grandis*)." Journal of Biological Chemistry **273**(4): 2078-2089.
- Steinmetz, H., et al. (2007). "Thuggacins, macrolide antibiotics active against *Mycobacterium tuberculosis*: isolation from myxobacteria, structure elucidation, conformation analysis and biosynthesis." Chemistry **13**(20): 5822-5832.
- Stork, G. and F. H. Clarke (1955). "The Total Synthesis of Cedrol and Cedrene." Journal of the American Chemical Society **77**(4): 1072-1073.
- Stork, G. and F. H. Clarke (1961). "Cedrol: Stereochemistry and Total Synthesis." Journal of the American Chemical Society **83**(14): 3114-3125.
- Sucipto, H., et al. (2015). "In vitro reconstitution of [small alpha]-pyrone ring formation in myxopyronin biosynthesis." Chemical Science **6**(8): 5076-5085.
- Suthisut, D., et al. (2011). "Contact toxicity, feeding reduction, and repellency of essential oils from three plants from the ginger family (Zingiberaceae) and their major components against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*." J Econ Entomol. **104**(4): 1445-1454.
- Täubner, M. (2014). "Der Marathon-Mann." Brand Eins(04).
- Thaxter, R. (1892). "Contributions from the cryptogamic laboratory of Harvard University. XVIII. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes." Bot. Gaz. **14**: 389 - 406.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. Biotechnology of Isoprenoids. J. Schrader and J. Bohlmann, Springer International Publishing. **148**: 63-106.
- Tillman, A. M. and D. E. Cane (1983). "Pentalenolactone F, a new metabolite isolated from streptomyces. Isolation and structure elucidation." J Antibiot (Tokyo). **36**(2): 170-172.

- Trowitzsch, W., et al. (1981). "Geosmin from earthy smelling cultures of *Nannocystis exedens* (Myxobacterales)." FEMS Microbiology Letters **12**(3): 257-260.
- Tu, Y. (2011). "The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine." Nat Med **17**(10): 1217-1220.
- Tyson, C. A., et al. (1972). "The role of putidaredoxin and P450 cam in methylene hydroxylation." J. Biol. Chem. **247**(18): 5777-5784.
- Usia, T., et al. (2004). "Sesquiterpenes and Flavonol Glycosides from *Zingiber aromaticum* and Their CYP3A4 and CYP2D6 Inhibitory Activities." Journal of Natural Products **67**(7): 1079-1083.
- Usia, T., et al. (2005). "Mechanism-based inhibition of CYP3A4 by constituents of *Zingiber aromaticum*." **28**(3): 495-499.
- Vickers, C. E., et al. (2009). "A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress." Nat Chem Biol **5**(5): 283-291.
- Vickers, C. E. and S. Sabri (2015). Isoprene. Biotechnology of Isoprenoids. J. Schrader and J. Bohlmann. Cham, Springer International Publishing: 289-317.
- Waldmann, H., et al. (2008). "Total Synthesis of Chondramide C and Its Binding Mode to F-Actin." Angewandte Chemie International Edition **47**(34): 6473-6477.
- Walter, P. (1841). "Über das feste und flüssige Cedernöl." Annalen der Chemie und Pharmazie **39**: 247-252.
- Walter, P. (1843). "Über das krystallisirte und über das flüssige Cedernöl." Annalen der Chemie und Pharmazie **48**: 35-38.
- Wang, G., et al. (2008). "Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop." Plant Physiology **148**(3): 1254-1266.
- Wani, M. C., et al. (1971). "Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*." Journal of the American Chemical Society **93**(9): 2325-2327.
- Wenzel, S. C. and R. Müller (2007). "Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry." Nat. Prod. Rep. **24**(6): 1211-1224.
- Wenzel, S. C. and R. Müller (2009). "The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact in drug discovery." Curr. Opin. Drug Discov. Devel. **12**(2): 220-230.
- Wenzel, S. C. and R. Müller (2009). "The impact of genomics on the exploitation of the myxobacterial secondary metabolome." Nat. Prod. Rep. **26**(11): 1385-1407.
- Wenzel, S. C. and R. Müller (2009). "Myxobacteria - 'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites." Mol. Biosyst. **5**(6): 567-574.
- Yamada, Y., et al. (2015). "Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host." J Antibiot.
- Yamada, Y., et al. (2012). Chapter Seven - Diversity and Analysis of Bacterial Terpene Synthases. Methods in Enzymology. A. H. David, Academic Press. **Volume 515**: 123-162.
- Yamamoto, T., et al. (2009). Method for Producing Optically Active Alpha-Ionone. USA, Takasago International Corporation.
- Yang, X., et al. (1993). "Chemical analysis and sensory evaluation of hydrolysis products of humulene epoxides II and III." Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(8): 1300-1304.
- Zhao, B., et al. (2008). "Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J. Biol. Chem. **283**(13): 8183-8189.

## 8. Anhang

Der Anhang enthält

- Supporting Information zu „Characterization of the Gene Cluster CYP264B1-geoA from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-Eremophilene and Its Hydroxylation“
- Supporting Information zu „New Sesquiterpene Oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* Soce56“
- Supplementary Material zu „A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in *Sorangium cellulosum* Soce56“
- Experimentelle Durchführung
- Abb. 1 – 10: Gaschromatogramme der Umsätze von (+)-Eremophilen mit Cytochromen P450 aus *S. cellulosum* So ce56
- Abb. 11 – 55: Massenspektren der Oxidationsprodukte von (+)-Eremophilen
- Abb. 56 – 67: Kernspinresonanz (NMR)-Spektren
- Abb. 68 – 78: Docking: Computergestützte Modellierung von CYP264B1-Sesquiterpen-Komplexen

und ist vollständig auf dem dieser Arbeit beigelegten Datenträger enthalten.