



**Cytochrom-P450-Biokatalyse:
Selektive Oxidation von
14-gliedrigen
Makrozyklen und Diterpenoiden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Priska Le-Huu

aus Niefern-Öschelbronn

Düsseldorf, Oktober 2015

aus dem Institut für Biochemie, Lehrstuhl II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher
Korreferentin: Apl. Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.01.2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den _____

Priska Le-Huu

Danksagung

Während meiner Promotion habe ich vielfältige Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Prof. Dr. Vlada B. Urlacher danke ich für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens und insbesondere für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Martina Pohl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Sabine Laschat und ihren Mitarbeitern vom Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart möchte ich für die Kooperation und die interdisziplinäre Zusammenarbeit danken. Während Tanja Heidt und Sebastian Schaubach die makrozyklischen Substanzen synthetisiert und mir zur Verfügung gestellt haben, haben Tanja Heidt und Dr. Birgit Claasen einige der NMR-Spektren gelöst. Tanja Heidt war stets bereit mir Fragen zur 2D-NMR-Spektroskopie zu beantworten, sodass ich mir mit ihrer Hilfe die Fähigkeit, komplexe NMR-Spektren zu lösen, aneignen konnte.

Den Mitarbeitern des Analytik-Zentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA) danke ich für die Durchführung der Analysen und Melanie Wachtmeister für ihre Assistenz bei der Erstellung der Mutantenkollektion.

Allen ehemaligen und jetzigen Kollegen des Instituts für Biochemie II möchte ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Im Einzelnen danke ich Dr. Clemens von Bühler für das Lektorat meiner Dissertation, für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und für die Hilfe bei den alltäglichen technischen und analytischen Problemen. Bei Dr. Sebastian Schulz möchte ich mich für das kritische Lektorat meiner Dissertation sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen bedanken, die wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben. Die Studien- und Promotionszeit würde ich nicht in so guter Erinnerung behalten ohne die gegenseitige Unterstützung und die gemeinsam verbrachten Stunden mit Esther Ricklefs und Florian Tieves.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Originalartikel

Teile dieser Dissertation, die bereits veröffentlicht wurden:

Le-Huu, P., Heidt, T., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Chemo-, regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid β -cembrenediol by P450 BM3. *ACS Catal.* **5**, 1772-1780 (2015).

Der eigene Beitrag zum vorliegenden Originalartikel beinhaltet alle experimentellen Arbeiten sowie das Schreiben des Manuskriptes. Die Auswertung der NMR-Analysen erfolgte durch Tanja Heidt und Birgit Claasen.

Teile dieses Originalartikels wurden in die vorliegende Dissertation übernommen (Kapitel 3 und 7). Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Teile dieser Dissertation, die veröffentlicht werden sollen:

Le-Huu, P. & Urlacher, V. B. P450-P450 cascade reaction for a two-step hydroxylation of the macrocyclic diterpenoid β -cembrenediol. In Vorbereitung.

Das Manuskript basiert auf den Inhalten aus Kapitel 4 und aus Teilen des Kapitels 7.

Weitere Veröffentlichungen:

von Bühler, C., **Le-Huu, P.** & Urlacher, V. B. Cluster screening: an effective approach for probing the substrate space of uncharacterized cytochrome P450s. *ChemBioChem* **14**, 2189-2198 (2013).

Poster

Le-Huu, P., Heidt, T., Schaubach, S., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Substrate engineering enables cytochrome P450-catalyzed oxyfunctionalization of 14-membered macrocycles. *18th International Conference on Cytochrome P450. Biochemistry, Biophysics and Biotechnology.* Seattle, Washington, USA, 18.-22. Juni (2013).

Le-Huu, P., Heidt, T., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Chemo-, regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid β -cembrenediol by P450 BM3. *Biotrans 2015.* Wien, Österreich, 26.-30. Juli (2015).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	12
1.1 Biokatalyse	12
1.2 Cytochrom-P450-Monooxygenasen	12
1.2.1 P450-Elektronentransfersysteme	13
1.2.2 Katalytischer Mechanismus	14
1.2.3 P450-Strukturen	16
1.2.4 P450-BM3 aus <i>Bacillus megaterium</i>	18
1.3 Cembranoide: diterpenoide Naturstoffe	19
1.3.1 Vorkommen und biologische Aktivität	19
1.3.2 Biosynthese	20
1.3.3 Chemische Synthese	21
1.4 Ziel der Arbeit	23
2 Oxidation verschiedener 14-gliedriger Makrozyklen	24
2.1 Einleitung	24
2.2 Ergebnisse	27
2.2.1 Zusammenstellung der Substratreihe aus 14-gliedrigen Makrozyklen.....	27
2.2.2 Vergleich von P450-BM3-katalysierten Oxidationen verschiedener 14-gliedriger Makrozyklen	28
2.3 Diskussion	35
3 Chemo-, regio- und stereoselektive Oxidation von β-Cembreniol	38
3.1 Einleitung	38
3.2 Ergebnisse	41
3.2.1 P450-BM3-katalysierte β -Cembreniol-Oxidation	41
3.2.2 Generierung einer Kollektion von P450-BM3-Varianten	42
3.2.3 Screening nach chemo-, regio- und stereoselektiven P450-BM3-Varianten.....	43
3.2.4 Untersuchung der Stereoselektivität	46
3.2.5 Isolierung und Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte	47
3.2.6 Charakterisierung der P450-BM3-Biokatalysatoren	50
3.3 Diskussion	51
4 P450-P450-Kaskadenreaktion zur zweifachen Hydroxylierung von β-Cembreniol	56
4.1 Einleitung	56

4.2	Ergebnisse	60
4.2.1	Design einer P450-P450-Kaskadenreaktion	60
4.2.2	Screening von P450-BM3-Mutanten hinsichtlich einer selektiven Oxidation von 9-OH- β -Cembrentriol	60
4.2.3	Zweifache Hydroxylierung von β -Cembrentriol	63
4.2.4	Isolierung und Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte	66
4.3	Diskussion	68
5	Chemo- und regioselektive Oxidation eines synthetischen makrozyklischen Diterpenoids.....	71
5.1	Einleitung	71
5.2	Ergebnisse	72
5.2.1	Screening nach selektiven P450-BM3-Varianten	72
5.2.2	Isolierung und Strukturaufklärung des Oxidationsproduktes	74
5.3	Diskussion	75
6	Schlussfolgerung und Ausblick	77
7	Material und Methoden	80
7.1	Materialien	80
7.1.1	Chemikalien, Enzyme, Puffer	80
7.1.2	Stämme, Plasmide, Oligonukleotide	81
7.2	Molekular- und mikrobiologische Methoden	83
7.2.1	Agarosegelelektrophorese und Bestimmung der DNA-Konzentration	83
7.2.2	Ortsspezifische Mutagenese	84
7.2.3	Kultivierung von <i>E.-coli</i> -Zellen	85
7.2.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen	85
7.2.5	Transformation von <i>E.-coli</i> -Zellen	85
7.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA	85
7.2.7	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	85
7.2.8	Zellernte und Zellaufschluss	86
7.3	Biochemische Methoden	86
7.3.1	Proteinreinigung	86
7.3.2	Bestimmung der P450-Konzentration	87
7.3.3	Bestimmung der volumetrischen GDH-Aktivität	87
7.3.4	Bestimmung der Kopplungseffizienz und der Substratoxidationsrate	87
7.4	P450-katalysierte Reaktionen	88
7.4.1	Reaktionen im analytischen Maßstab	88
7.4.2	Reaktionen im präparativen Maßstab zur Produktisolierung	90
7.5	Chemisch-analytische Methoden	91
7.5.1	LC/PDA-Analyse	91

7.5.2	LC/MS-Analyse.....	92
7.5.3	GC/MS-Analyse	93
7.5.4	NMR-Spektroskopie.....	94
7.5.5	Bestimmung der optischen Rotation.....	94
7.6	Strukturaufklärung.....	94
7.6.1	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (5)	94
7.6.2	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6a).....	95
7.6.3	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6b).....	95
7.6.4	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (8a).....	95
7.6.5	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (8b).....	96
7.6.6	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,11 <i>E</i>)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (9)	96
7.6.7	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10a)	96
7.6.8	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10b)	97
7.6.9	(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäure-dimethyl-ester (11).....	97
8	Literatur	98
9	Anhang	112
9.1	Abkürzungen	112
9.2	Formelregister.....	115
9.3	Zweifache Hydroxylierung von β -Cembrendiol.....	116
9.4	MS-Spektren.....	118
9.4.1	14-Gliedrige Makrozyklen (1-5) und ihre Oxidationsprodukte.....	118
9.5	1D- und 2D-NMR-Spektren	125
9.5.1	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (5)	125
9.5.2	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6a).....	130
9.5.3	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6b).....	135
9.5.4	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (8a).....	140
9.5.5	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (8b).....	145
9.5.6	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,11 <i>E</i>)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (9)	150
9.5.7	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10a)	155
9.5.8	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10b)	160
9.5.9	(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (11).....	165

Zusammenfassung

Cembranoide bilden eine diverse Naturstoffklasse der Diterpenoide, deren Vertreter hauptsächlich aus marinen Invertebraten und Pflanzen isoliert wurden. Sie weisen unterschiedliche biologische Aktivitäten auf, die u.a. für pharmazeutische Anwendungen interessant sind. Strukturell bestehen Cembranoide aus einem 14-gliedrigen zyklischen Kohlenwasserstoffgerüst und zusätzlichen Sauerstoff enthaltenden Gruppen. In der Biosynthese von Cembranoiden wird zunächst ein terpenoides Gerüst erstellt, in das anschließend mit Hilfe von Cytochrom-P450-Monooxygenasen Sauerstoffunktionalitäten eingeführt werden. Auch in der organischen Synthese sind Oxyfunktionalisierungen in späten Synthesestufen als ein effizientes Konzept beschrieben worden, um hohe Diversitäten chemischer Verbindung zu generieren. Die Herausforderung dieser späten Funktionalisierung stellt dabei die geforderte hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität dar. In der vorliegenden Arbeit sollte das biokatalytische Potential der Cytochrom-P450-Monooxygenase P450-BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* für die späte Oxyfunktionalisierung verschiedener Cembranoide und Cembranoid-ähnlicher Substrate untersucht werden.

Um den Effekt der Struktur des Substrates auf die enzymatische Aktivität und Selektivität zu untersuchen, wurde eine Reihe aus neun verschiedenen 14-gliedrigen Makrozyklen hinsichtlich einer P450-BM3-katalysierten Oxidation getestet. Es wurden sowohl synthetische Verbindungen als auch Naturstoffe analysiert, die jeweils eine unterschiedliche Polarität und eine unterschiedliche Anzahl an Doppelbindungen aufweisen. Unter Verwendung der P450-BM3-Mutante F87G konnte mit allen Makrozyklen eine Oxidation nachgewiesen werden. Je nach Substrat wurden fünf bis über sechzehn verschiedene Produkte detektiert, die jeweils ein bis vier neu eingeführte Sauerstoffatome besaßen. Von zwei der untersuchten Makrozyklen konnte in weiterführenden Studien die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität der Reaktion über semirationales Proteindesign verbessert und die Anzahl der Produkte auf ein bis drei reduziert werden. Nach Oxidationen im präparativen Maßstab konnten die Produkte in isolierten Ausbeuten von bis zu 57 % erhalten werden und deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

Um eine chemo- und regioselektive Oxidation cembranoider oder Cembranoid-ähnlicher Verbindungen zu erreichen wurde eine Kollektion aus P450-BM3-Varianten generiert, die Aminosäuresubstitutionen an verschiedenen Positionen nahe des katalytischen Hämzentrums enthielten. Die P450-BM3-Varianten wurden hinsichtlich einer selektiven Oxidation des 14-gliedrigen Makrozyklus (3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester und des Cembranoids β -Cembrendiol getestet. Beide Makrozyklen enthalten als kaum funktionalisierte diterpenoide Gerüste zahlreiche chemisch äquivalente Oxidationspositionen. Für (3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester konnte die P450-BM3-Mutante V78G/F87A identifiziert werden, die unter dreizehn möglichen Oxidationspositionen das Diterpenoid an der Position C-5 mit einer Chemo- und Regioselektivität von 90 % hydroxylierte. Für β -Cembrendiol, das neben drei potentiellen Epoxidierungspositionen sieben potentielle allylische und sechs nicht-allylische Hydroxylierungspositionen besitzt, wurden P450-BM3-Mutanten zur selektiven Hydroxylierung der

benachbarten allylischen Positionen C-9 und C-10 oder zur Epoxidierung der C-7/C-8-Doppelbindung gefunden. Die P450-BM3-Mutante F87A/I263L wies eine 100 %ige Regioselektivität für C-9 auf und produzierte die epimeren 9-OH- β -Cembrentriolen in einem Diastereomerenverhältnis von 89:11. Eine 97 %ige Regioselektivität für C-10 konnte mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G erzielt werden, die die epimeren 10-OH- β -Cembrentriolen sowie das korrespondierende Enon herstellte. Die 10-OH- β -Cembrentriolen wurden bestenfalls in einem Diastereomerenverhältnis von 74:26 gebildet. Mit der P450-BM3-Mutante V78A/F87A konnte das (7*S*,8*S*)-Epoxy- β -cembrenndiol mit exzellenter Diastereoselektivität ($d_r > 99:1$) produziert werden. Weiterhin konnte eine sequentielle P450-P450-Kaskadenreaktion für die zweifache Hydroxylierung des β -Cembrenndiols an den Positionen C-9 und C-10 als Eintopfprozess etabliert werden. Um einen geeigneten Biokatalysator für den zweiten Schritt zu finden, wurde eine Kollektion an P450-BM3-Mutanten durchmustert. Dabei konnten Mutanten identifiziert werden, die das 9-OH- β -Cembrentriolen an Position C-10 hydroxylieren. Während die P450-BM3-Mutante V78A/F87G die 9,10-OH- β -Cembrentetraole in einem Diastereomerenverhältnis von 50:50 herstellte, konnte mit der Dreifachmutante L75A/V78A/F87G das Diastereomerenverhältnis optimiert werden (11:89).

Abstract

Cembranoids represent a diverse class of diterpene natural products, whose members are mainly found in marine invertebrates and plants. They show diverse biological activities that are of interest for pharmaceutical applications. Cembranoids consist of a 14-membered hydrocarbon cycle with additional oxygen-bearing groups. The biosynthesis of cembranoids begins with the formation of a terpene cycle and proceeds with the insertion of oxyfunctionalities catalyzed by cytochrome P450 monooxygenases. Such late-stage oxidations have also been described as an efficient concept in organic synthesis for diversifying chemical substances. High chemo-, regio-, and stereoselectivity remain the main challenge of late-stage oxidations. In this thesis, the biocatalytic potential of the monooxygenase P450 BM3 (CYP102A1) from *Bacillus megaterium* for late-stage oxidations of cembranoids and cembranoid-like substances was demonstrated.

To investigate effects of the substrate structure on enzyme activity and selectivity, a substrate series of nine different 14-membered macrocycles was tested for a P450 BM3 catalyzed oxidation. Synthetic compounds as well as natural products with varying polarity and a different number of double bonds were analyzed. Using the P450 BM3 mutant F87G, oxidations of all tested macrocycles were observed. Depending on the substrate, five to more than sixteen products each with one to four inserted oxygen atoms were detected. Further protein engineering enabled an optimization of the enzyme's chemo-, regio-, and stereoselectivity and thereby a decrease in the number of products for two 14-membered macrocycles. After preparative scale oxidations the products were isolated with a yield of up to 57%, allowing structure elucidation by NMR spectroscopy.

To achieve chemo- and regioselective oxidation of cembranoids or cembranoid-like substances, a collection of P450 BM3 mutants with amino acid substitutions at different positions close to the catalytic heme center was constructed. P450 BM3 mutants were tested for selective oxidation of the 14-membered macrocycle (3*E*,7*E*,11*E*)-dimethyl-9-hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-triene-1,1-dicarboxylate and the cembranoid β -cembrenediol. Both diterpene scaffolds are rarely functionalized and hence contain numerous chemically equivalent oxidation positions. Although the diterpenoid (3*E*,7*E*,11*E*)-dimethyl-9-hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-triene-1,1-dicarboxylate features thirteen possible oxidation positions, the P450 BM3 mutant V78G/F87A was identified to hydroxylate the diterpenoid preferably at position C-5 with a chemo- and regioselectivity of 90%. β -Cembrenediol features three potential epoxidation sites as well as seven potential allylic and six non-allylic hydroxylation sites. Nevertheless, several mutants could be identified, which selectively hydroxylated the neighbouring allylic positions C-9 and C-10 or epoxidized the C-7/C-8 double bond. P450 BM3 mutant F87A/I263L was 100% regioselective for C-9 and produced the epimeric 9-OH- β -cembrenetriols in a diastereomeric ratio of 89:11. P450 BM3 mutant L75A/V78A/F87G was 97% regioselective for C-10 and produced the epimeric 10-OH- β -cembrenetriols in a diastereomeric ratio of 74:26 next to the corresponding enone. P450 BM3 mutant V78A/F87A produced the (7*S*,8*S*)-epoxy- β -cembrenediol with excellent diastereoselectivity (dr > 99:1).

Finally, a sequential P450-P450 cascade reaction for the two-step hydroxylation of β -cembrenediol at positions C-9 and C-10 was established as a one-pot process. To find a biocatalyst for the second step, a selection of P450 BM3 mutants was screened for the selective hydroxylation of 9-OH- β -cembrenetriol at position C-10. Whereas P450 BM3 mutant V78A/F87G produced the 9,10-OH- β -cembrenetetraols in a diastereomeric ratio of 50:50, P450 BM3 mutant L75A/V78A/F87G showed an optimized diastereomeric ratio of 11:89.

1 Einleitung

1.1 Biokatalyse

Unter Biokatalyse wird der Einsatz von Enzymen für die Synthese organischer Verbindungen verstanden. Im Vergleich zu chemischen Katalysatoren weisen Biokatalysatoren einige Vorteile auf. Hierzu zählen eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität, eine hohe Effizienz, die den Einsatz des Katalysators in geringen Mengen (10^{-3} bis 10^{-4} mol %) ermöglicht und eine hohe Umweltverträglichkeit, die auf milde Reaktionsbedingungen ohne Verwendung von organischen Lösungsmitteln sowie die biologische Abbaubarkeit des Katalysators selbst zurückzuführen ist.¹ Ein weiterer Vorteil von Biokatalysatoren stellt ihr Potential dar, auch nicht-physiologische Substrate umzusetzen oder hinsichtlich dessen optimiert zu werden.¹ Bornscheuer *et al.* haben die Biokatalysatorforschung in drei Entwicklungsstufen unterteilt.² Während in der ersten Stufe Mikroorganismen für Biotransformationen eingesetzt wurden, konnten in der zweiten Stufe bereits erste Optimierungen durchgeführt werden, um das Substratspektrum von Enzymen zu erweitern.² In der dritten und gegenwärtigen Entwicklungsstufe werden Enzyme dagegen für einen gewünschten Reaktionsschritt entwickelt und hinsichtlich ihrer Stabilität, Substratspezifität oder Selektivität optimiert.²

Ein zukünftiges Potential von Biokatalysatoren sehen Turner und O'Reilly in ihrer vielfältigen Einsetzbarkeit für die Synthese komplexer organischer Verbindungen.³ Wenngleich zahlreiche komplexe Naturstoffe über organisch-chemische Totalsynthesen hergestellt werden können, sind wenige Beispiele bekannt, in denen Biokatalysatoren für deren Synthese eingesetzt werden. Dennoch impliziert die Existenz von in der Natur vorkommenden komplexen organischen Molekülen das Vorhandensein von Biosynthesewegen und damit die natürliche Verwendung von Enzymen für die Synthese organischer Verbindungen. Folglich fordern Turner und O'Reilly beim Entwurf neuer Syntheserouten, zukünftig sowohl organische als auch biokatalytische Methoden zu berücksichtigen und neben den bereits etablierten Strategien zur organischen Retrosynthese auch Strategien zur biokatalytischen Retrosynthese zu entwickeln.³ Eine Kombination aus Chemo- und Biokatalyse soll dazu beitragen möglichst effiziente Synthesewege für komplexe Moleküle zu erhalten.

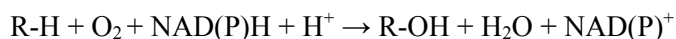
In der Biosynthese von Naturstoffen werden Sauerstoffunktionalitäten häufig über Cytochrom-P450-Monooxygenasen eingeführt.⁴ Die Verwendung dieser Enzymklasse für die organische Synthese komplexer Moleküle ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet.⁵

1.2 Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP) gehören zu der Enzymklasse der Oxidoreduktasen (E.C.1.14.-.-), die in allen Domänen des Lebens vorkommen. In ihrem aktiven Zentrum befindet sich als prosthetische Gruppe ein Eisen-Protoporphyrin-IX-Komplex. Dieses sogenannte Häm b, das über eine axiale Bindung zwischen dem Hämeisen und dem Thiolatrest eines Cysteins mit dem Protein verbunden ist, ist für die namensgebende spektroskopische Eigenschaft von Cytochrom-P450-Monooxygenasen verantwortlich. Hierbei bindet ein Kohlenstoffmonoxid-Molekül als sechster

Ligand axial an das reduzierte Hämeisen, sodass im CO-Differenzspektrum ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm beobachtet werden kann.^{6,7}

Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysieren Oxidationsreaktionen, bei denen (nicht-)aktivierte Kohlenwasserstoff-Verbindungen oxidiert werden und molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Schema 1). Die dabei erforderlichen Reduktionsäquivalente werden vom Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat) (NAD(P)H) zur Verfügung gestellt.



Schema 1. Allgemeine Formel von Reaktionen, die durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert werden.

Die gängigsten Reaktionen, die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert werden, stellen Hydroxylierungen und Epoxidierungen dar. Es sind jedoch auch eine Vielzahl weiterer Reaktionen wie z.B. *N*-, *O*-, *S*-Dealkylierung, oxidative Deaminierung, oxidativer C-C-Bindungsbruch, Cyclopropanierung über Carbentransfer oder intramolekulare C-H-Aminierung bekannt.⁸⁻¹⁰

1.2.1 P450-Elektronentransfersysteme

In P450-katalysierten Reaktionen werden die Reduktionsäquivalente des Kofaktors NAD(P)H mit Hilfe von Elektronentransferpartner-Proteinen zum (Oxo-)Hämeisen-Komplex im aktiven Zentrum der P450-Monooxygenase transportiert.¹¹ In Abhängigkeit der Organisation der P450-Elektronentransfersysteme sind die Cytochrom-P450-Monooxygenasen in verschiedene Klassen eingeteilt worden. Die ausführlichste Klassifizierung in zehn verschiedene P450-Elektronentransfersysteme ist von Hannemann *et al.* vorgenommen worden.¹² Im Weiteren sollen jedoch nur drei der Klassen erläutert werden.

Die erste Klasse der P450-Elektronentransfersysteme beinhaltet ein System aus drei Komponenten, das aus einer NAD(P)H-abhängigen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) enthaltenden Reduktase, einem Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Ferredoxin oder einem Flavinmononukleotid (FMN) enthaltenden Flavodoxin und einer P450-Monooxygenase besteht (Abbildung 1A). Ein bekannter Vertreter der ersten Klasse, die ein Ferredoxin als zweite Komponente besitzt, ist die Campher-Hydroxylase P450cam (CYP101A1) aus *Pseudomonas putida* mit der Putidaredoxin-Reduktase (PdR) und dem Ferredoxin Putidaredoxin (Pdx).¹³ Ein Vertreter des Dreikomponentensystems, das ein Flavodoxin als zweite Komponente enthält, stellt die Cineol-Hydroxylase P450cin (CYP176A1) aus *Citrobacter braakii* dar.¹⁴

Die zweite Klasse der P450-Elektronentransfersysteme besteht aus zwei Komponenten, einer NAD(P)H-abhängigen Diflavin enthaltenden Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) und einer P450-Monooxygenase (Abbildung 1B). Die CPR besitzt die beiden Kofaktoren FAD und FMN und wird auch als P450-Oxidoreduktase (POR) bezeichnet. Vertreter der zweiten P450-Elektronentransfersystem-Klasse sind meist unter eukaryotischen Organismen zu finden, so auch die CPR aus Rattenleber.¹⁵ Die CPR- sowie die P450-Monooxygenase-Domäne sind membrangebundene Proteine, die meist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind.

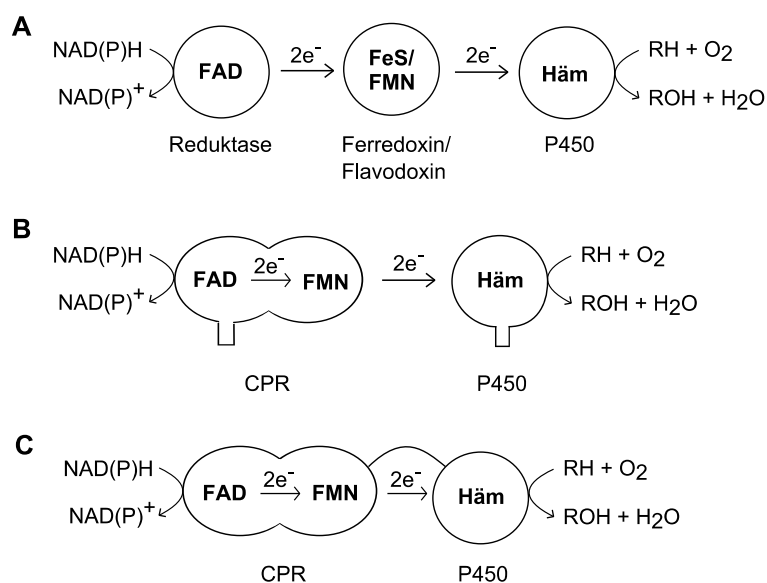


Abbildung 1. Schematische Darstellung verschiedener P450-Elektronentransfersysteme. (A) Dreikomponentensystem aus einer Reduktase, einem Ferredoxin oder Flavodoxin sowie der P450-Monooxygenase. (B) Zweikomponentensystem aus einer Diflavin-Reduktase und einer P450-Monooxygenase. (C) Einkomponentensystem fusioniert aus einer Diflavin-Reduktase und einer P450-Monooxygenase. FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid; FeS: Eisen-Schwefel-Cluster; FMN: Flavinmononukleotid; CPR: Cytochrome-P450-Reduktase. RH: Substrat; ROH: Oxidationsprodukt. Verändert nach Urlacher und Girhard.¹⁶

Die dritte Klasse der P450-Elektronentransfersysteme wird als ein Einkomponentensystem beschrieben und kommt deutlich seltener vor (Abbildung 1C). Es setzt sich aus einer NAD(P)H-abhängigen Diflavin enthaltenden Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) und einer P450-Monooxygenase zusammen, die im Vergleich zur zweiten Klasse jedoch fusioniert vorliegen. Die CPR-Domäne ist dabei über einen Linker an das C-terminale Ende der Hämdomäne geknüpft. Zusammen bilden sie als Fusionsprotein ein katalytisch eigenständiges Enzym. Das bekannteste Beispiel dieser Klasse ist die Fettsäure-Hydroxylase P450-BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium*.^{17,18}

1.2.2 Katalytischer Mechanismus

Der katalytische Zyklus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen beginnt mit der Bindung des Substrates im aktiven Zentrum (**1-2**) (Schema 2A). Hierbei können strukturelle Veränderungen das am Hämeisen axial koordinierte Wassermolekül verdrängen und einen Wechsel des Eisen-III-Spin-Zustandes vom *low-spin*- zum *high-spin*-Zustand hervorrufen.¹⁹ Die damit einhergehende Änderung des Redoxpotentials kann die folgende Reduktion des Hämeisens zum Eisen-II (**3**) erleichtern.¹⁹ Das dazu notwendige Reduktionsäquivalent wird von den Elektronentransferpartnern zur Verfügung gestellt. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung von molekularem Sauerstoff, die zur Ausbildung des Eisen-III-Superoxid-Komplexes führt (**4**). Ein zweites von den Elektronentransferpartnern bereitgestelltes Elektron reduziert den Komplex zu einem Eisen-III-Peroxid-Dianion (**5**).

Es folgt eine Protonierung zum Eisen-III-Hydroperoxo-Komplex (**6**), der auch *compound 0* genannt wird. Eine weitere Protonierung führt zur heterolytischen Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung unter Freisetzung eines Wassermoleküls. Es kommt zur Ausbildung eines reaktiven Intermediates, das einen Komplex aus einer Eisen-IV-Oxo-Spezies und einem Porphyrinradikal (**7**) darstellt und als *compound I* bezeichnet wird.²¹ In den nächsten beiden Schritten findet die eigentliche Substratoxidation unter Beibehaltung der Kohlenstoff-Konfiguration über den sogenannten *rebound*-Mechanismus statt.^{22,23} Bei einer Substrathydroxylierung entzieht der Eisen-IV-Oxo-Komplex einer C-H-Bindung des Substrates ein Wasserstoffradikal und lässt das Substrat als Kohlenstoffradikal zurück. Gleichzeitig bildet sich eine Eisen-IV-Hydroxid-Spezies (**8a**) aus, die auch als *compound II* bezeichnet wird.²⁴ Über eine radikalische Rekombination wird anschließend das hydroxylierte Produkt gebildet. Der Eisen-Protoporphyrin-Komplex liegt wieder als Eisen-III-Komplex vor (**9**), an das ein Wassermolekül binden kann.^{20,25,26}

Wenngleich für Epoxidierungen auch ein möglicher Mechanismus ausgehend von *compound 0* diskutiert wurde,²⁷ verlaufen Epoxidierungen meist über *compound I*.²⁸ Hierbei bricht das Radikalintermediat *compound I* die Doppelbindung des Substrates auf, wobei das eine Kohlenstoffatom kovalent an den Eisen-IV-Oxo-Komplex bindet und das zweite Kohlenstoffatom als Radikal vorliegt (**8b**) (Schema 2B). Eine Radikalreaktion führt anschließend zur Ausbildung des Epoxids, wobei der Eisen-Protoporphyrin-Komplex als Eisen-III-Komplex (**9b**) zurückbleibt.^{26,29,30}

Bei der P450-katalysierten Bildung von Carbonylverbindungen handelt es sich um zwei konsekutive Hydroxylierungen an demselben Kohlenstoffatom (Schema 2C). Nach der ersten Hydroxylierungsreaktion entzieht im nächsten Katalysezyklus das Radikalintermediat *compound I* dem bereits hydroxylierten Kohlenstoffatom erneut ein Wasserstoffradikal. Während sich ein weiteres Mal *compound II* (**8c**) ausbildet, bleibt das Substrat als Radikal zurück und reagiert anschließend zu einem geminalem Diol-Intermediat (**9c**). Eine anschließende Wasserabspaltung führt im Folgenden zur Bildung einer Carbonylverbindung. Mit Hilfe der ersten und beschriebenen zweiten Oxidationsreaktion, die auch als Überoxidationsreaktion bezeichnet wird, können so u.a. aus allylischen Alkoholen Enone gebildet werden.^{31,32}

P450-katalysierte Reaktionen können auch unproduktiv ablaufen, indem die Reduktionsäquivalente des NAD(P)Hs nicht zur Bildung des gewünschten Produktes sondern zur Bildung von Superoxiden (**4**) → (**2**), Peroxiden (**6**) → (**2**) oder Wasser (**7**) → (**2**) genutzt werden (Schema 2A).^{33,34} Man spricht bei diesen Nebenreaktionen auch von Entkopplungsreaktionen.²⁵

1.2.3 P450-Strukturen

Cytochrom-P450-Enzyme haben eine gemeinsame Topologie von Sekundärstrukturelementen, die sich aus mindestens zwölf α -Helices (A-L) und mindestens vier β -Faltblättern ($\beta 1$ - $\beta 4$) zusammensetzt (Abbildung 2).³⁵ Trotz des vergleichbaren Aufbaus sind nur drei streng konservierte Aminosäuren vorhanden (Abbildung 2), die zusammen für die Ausbildung der charakteristischen Hämthiolat-Tertiärstruktur von Cytochrom-P450-Enzymen verantwortlich sind.^{36,37} Eine konservierte Aminosäure stellt das Cystein dar, das kovalent an das Hämeisen gebunden ist und in der sogenannten Cysteintasche vor dem C-terminalen Ende der L-Helix lokalisiert ist. Des Weiteren

befinden sich in der K-Helix zwei konservierte Aminosäuren (Glutaminsäure und Arginin), die in einem ExxR-Motiv angeordnet sind. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Motiv über Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen den sogenannten Meanderloop stabilisiert, der sich wiederum zwischen der K-Helix und der Cysteintasche befindet und für die Hämbindung von Bedeutung ist.³⁵

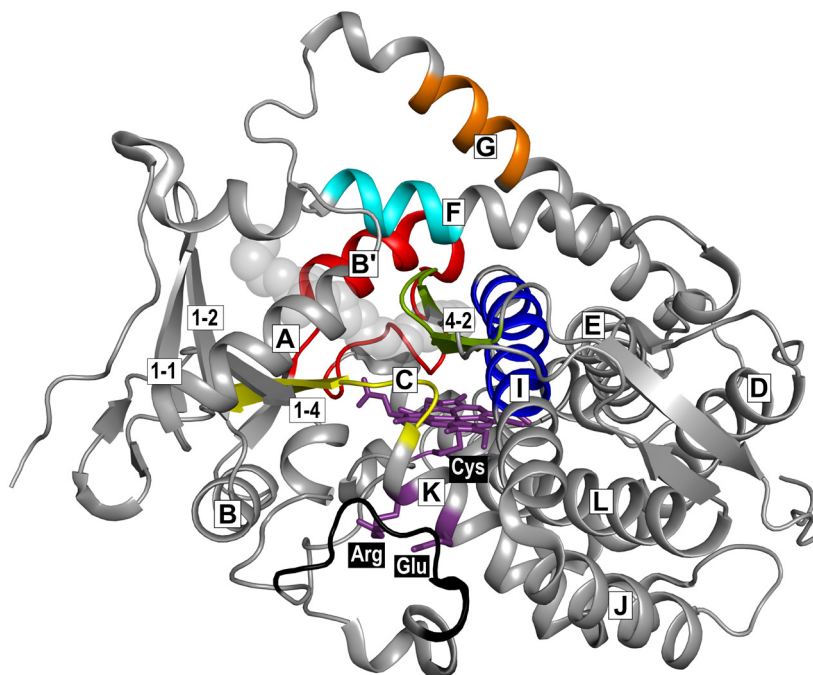


Abbildung 2. Struktur von P450-BM3 aus *Bacillus megaterium* (PDB-Code: 1ZO9).³⁸ Die sekundären Strukturelemente (α -Helices A-L und β -Faltblätter 1.x-4.x) sind nach Hasemann *et al.*³⁵ benannt worden. Das Häm sowie die konservierten Aminosäuren Cystein, Arginin und Glutamin sind als Stäbe in violett, der Meanderloop in schwarz und das Substrat *N*-Palmitoylmethionin als transparente graue Kugeln dargestellt. Die Substraterkennungsstellen (SRS) sind farblich markiert: SRS1 (rot), SRS2 (türkis), SRS3 (orange), SRS4 (blau), SRS5 (gelb), SRS6 (grün). Die Positionierung der SRS basieren auf den Angaben für P450cam von Gotoh³⁹ sowie dem Sequenzvergleich von Hasemann *et al.*³⁵

Unter den variablen Sequenzen von Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind sechs Regionen (SRS, *substrate recognition sites*) bestimmt worden, die für die Substraterkennung verantwortlich sind (Abbildung 2).³⁹ Ihre Variabilität soll dabei die hohe Diversität an Substraten erklären, die von Cytochrom-450-Monooxygenasen oxidiert werden. Die variablen Bereiche liegen im Bereich der B'-Helix (SRS1), am C-terminalen Ende der F-Helix (SRS2), am N-terminalen Ende der G-Helix (SRS3), am N-terminalen Ende der langen, oberhalb des Häms liegenden I-Helix (SRS 4), im β 1-4- (SRS5) und im β 4-1/2-Faltblatt (SRS6).³⁹ Unter den genannten Regionen befinden sich auch die Sekundärstrukturen, die die Substratbindetasche formen – namentlich die I-Helix, der B-C-Loop sowie das β 1-4-Faltblatt. Der langgezogene Substrateingangskanal wird hingegen mehrheitlich durch die B', F-, G-Helix und den β 1-Faltblättern geformt.^{37,40}

1.2.4 P450-BM3 aus *Bacillus megaterium*

Die katalytisch eigenständige Cytochrom-P450-Monooxygenase P450-BM3 aus *Bacillus megaterium* (CYP102A1), die natürlicherweise Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 10-20 Kohlenstoffatomen hydroxyliert,⁴¹ ist eines der am besten untersuchten P450-Enzyme.⁴² Aufgrund ihrer katalytischen Eigenständigkeit, ihrer einfachen rekombinanten Expression in *E. coli* und ihrer hohen Aktivität ($k_{cat} = 17.000 \text{ min}^{-1}$ für P450-BM3-Wildtyp und Arachidonsäure)⁴³ gilt sie als ein attraktives Enzym für biotechnologische Anwendungen.⁴⁴ Die erstmalige Strukturaufklärung der P450-BM3-Hämdomäne gelang im Jahre 1993 ohne⁴⁵ bzw. 1997 mit⁴⁶ Substrat. Es folgten zahlreiche Mutagenesestudien an P450-BM3 für dessen Optimierung hinsichtlich einer selektiven Oxidation verschiedener nicht-physiologischer Substrate. Das Substratspektrum von P450-BM3 konnte erheblich erweitert werden und reicht inzwischen von Cycloalkanen,^{47,48} acyclischen und cyclischen Monoterpenen⁴⁹⁻⁵¹ und Sesquiterpenen,^{50,52,53} bis hin zu polyzyklischen Aromaten,^{54,55} Alkaloiden⁵⁶ und Steroiden⁵⁵⁻⁵⁹ (Abbildung 3).

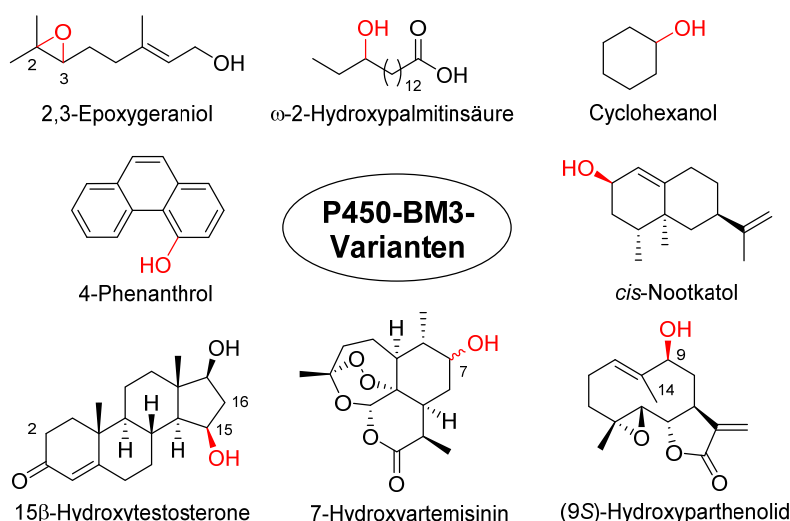


Abbildung 3. P450-BM3-katalysierte Oxyfunktionalisierungen ausgewählter Substanzen.^{41,47,49,50,52-54}

Das größte Potential für synthetische Applikationen von Cytochrom-P450-Monooxygenasen beruht auf ihrer Fähigkeit, Kohlenwasserstoffverbindungen chemo-, regio- und stereoselektiv zu oxidieren. Auch die Einsetzbarkeit von P450-BM3 für die selektive Oxidation von großen Molekülen konnte anhand mehrerer Beispiele gezeigt werden.

So gelang es Commandeur und Mitarbeitern unter Verwendung von P450-BM3-Mutanten, Testosteron regio- und stereoselektiv an der Position C-16 zum 16 β -Hydroxytestosteron (84 %) und an der entgegengesetzten Position C-2 zum 2 β -Hydroxytestosteron (100 %) zu hydroxylieren.⁵⁵ Für die Hydroxylierung an Position C-16 und C-2 wurden achtfache P450-BM3-Mutanten (R47L/E64G/F81I/F87*/E143G/L188Q/E267V/G415S) verwendet, die sich nur durch Aminosäuresubstitutionen an der Position 87 (F87I/N) unterscheiden. Reetz und Mitarbeitern gelang es kurze Zeit später eine P450-BM3-Mutante (R47Y/T49F/V78L/A82M/F87A) für die Hydroxylierung von Testosteron u.a. regio- und stereoselektiv an Position C-15 zum

15 β -Hydroxytestosteron (96 %) zu entwickeln.⁵⁸ Neben den Steroiden als P450-Substrate konnten auch zwei Sesquiterpenlactone selektiv oxidiert werden. Fasan und Mitarbeitern konnten 14- bzw. 15-fache P450-BM3-Mutanten entwickeln, die Parthenolid regio- und stereoselektiv an Position C-9 (68 %) und regioselektiv an Position C-14 (53 %) hydroxylieren. Die P450-BM3-Mutanten ungleicher Regioselektivität unterschieden sich nur durch Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 78 (V78T/N) und 81 (F81I/F).⁵³ Für das trizyklische Sesquiterpenlacton Artemisinin konnten 14- bzw. 16-fache P450-BM3-Mutanten gefunden werden, die dieselbe Regioselektivität für die Position C-7 mit exzellenten entgegengesetzten Stereoselektivität aufwiesen (C-7, (R): 100 %; C-7, (S): 100 %). Die mehrfachen P450-BM3-Mutanten unterschieden sich dabei durch Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 78 (V78S/N), 81 (F81I/F), 82 (A82A/T), 87 (F87A/F), 181 (L181L/F) und 184 (A184V/T).⁵²

1.3 Cembranoide: diterpenoide Naturstoffe

1.3.1 Vorkommen und biologische Aktivität

Cembranoide stellen eine strukturell diverse Klasse von diterpenoiden Naturstoffen dar, deren Grundgerüst ein 14-gliedriger Kohlenwasserstoffzyklus ist. Während einfach aufgebaute Cembranoide sich durch einen Isopropylrest an Position C-1 und jeweils einer Methylgruppe an Position C-4, C-8 und C-12 auszeichnen,^{60,61} weisen komplexere Cembranoide zusätzliche Sauerstoff enthaltende Gruppen vor (Abbildung 4).

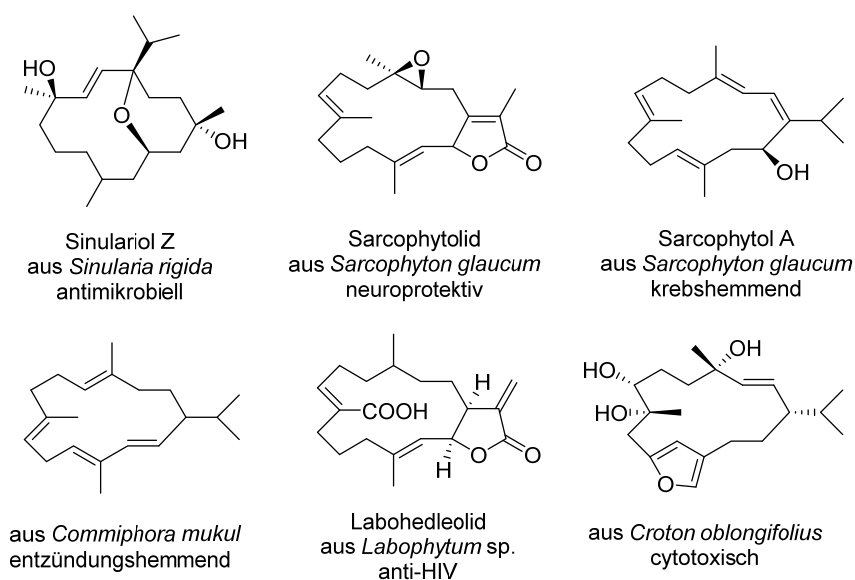


Abbildung 4. Struktur, natürliche Quelle und biologische Aktivität ausgewählter Cembranoide.⁶²⁻⁶⁷

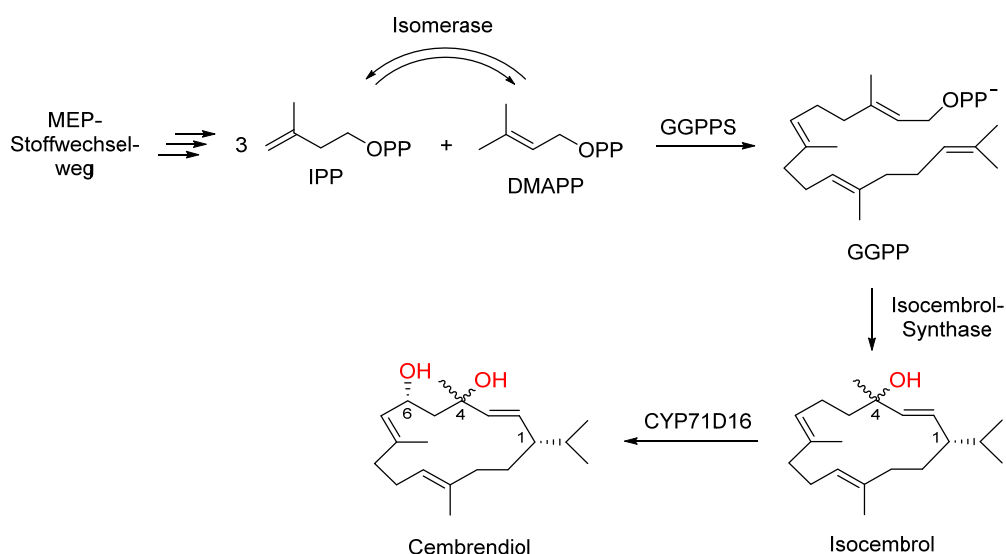
Cembranoide, die einen zusätzlichen Sauerstoff enthaltenden Ring besitzen, werden im Fall einer zusätzlichen Furan-Funktionalität als Furanocembranoide und im Fall eines zusätzlichen fünf bis acht gliedrigen Laktorings als Cembranolide bezeichnet.⁶⁸ Die ersten cembranoiden Strukturen

wurden im Jahr 1962 beschrieben und wurden aus dem Kiefernharz des *Pinus albicaulis* (Cembren)^{69,70} bzw. aus *Nicotiana tabacum* (Cembrendiol)⁷¹ isoliert. Ein Großteil der pflanzlichen Cembranoide stammt aus Tabak und kann aus dem Exsudat der Blätter sowie den Blüten gewonnen werden.⁷² Auch das Gummiharz der Myrrhe (*Commiphora mukul*) konnte als Quelle für Cembranoide identifiziert werden.⁷³ Im Tierreich sind Cembranoide vereinzelt in Insekten wie z.B. den Termiten *Trinervitermes bettonianus* gefunden worden, wo sie als Pheromon fungieren.⁷⁴ Hauptsächlich sind Cembranoide jedoch aus marinen Invertebraten, wie den Fächer- und Peitschenkorallen der Ordnung *Gorgonacea* sowie den Weichkorallen der Ordnung *Alcyonacea* isoliert worden, wo sie als chemische Abwehrstoffe gegen Feinde eingesetzt werden.^{60,68,75,76} In einer Vielzahl von Studien konnten diverse biologische Aktivitäten von Cembranoiden nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderem entzündungshemmende,^{63,77} cytotoxische,⁷⁸ krebshemmende,^{65,79,80} und neuroprotektive Wirkungen,^{62,81–83} die mögliche pharmakologische Anwendungen dieser Naturstoffe aufzeigen. Ebenfalls wurde ein potentieller Einsatz gegen HIV,^{67,84} Diabetes Typ 2,⁸⁵ zur Verhinderung von mikrobiellem Bewuchs^{64,86} oder zur Minimierung von Läusebefall auf Pflanzen^{87,88} beschrieben.

1.3.2 Biosynthese

Cembranoide werden als zyklische Diterpenoide über den Terpenbiosyntheseweg hergestellt, der über sequentielle Kondensationsreaktionen von Isopreneinheiten verläuft. Zunächst wird die C5-Verbindung Isopentenylidiphosphat (IPP) über den Mevalonat- oder Methylerythritolphosphat-Stoffwechselweg (MEV/MEP) synthetisiert und mit Hilfe einer Isomerase zu dem reaktiveren Dimethylallyldiphosphat (DMAP) umgelagert. Die Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase (GGPPS) katalysiert im Anschluss eine dreistufige Kondensationsreaktion, in der Isopentenylidiphosphat in *trans*-Geometrie zunächst an Dimethylallyldiphosphat und nachfolgend an die aus zehn bzw. fünfzehn Kohlenstoffatomen bestehenden Terpene Geranyl-diphosphat und Farnesyl-diphosphat addiert wird.⁸⁹ Es entsteht das aus zwanzig Kohlenstoffatomen bestehende Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP) (Schema 3), das mit Hilfe von Zyklasen und Synthasen zu einem cembranoiden Grundgerüst zyklisiert.⁹⁰ Im Anschluss wird das Grundgerüst über verschiedenste Reaktionen wie Oxidationen oder Umlagerungen modifiziert.⁹¹ Die hohe strukturelle Diversität in der Biosynthese von Cembranoiden erfolgt demnach erst während bzw. nach dem Zyklisierungsschritt.

Während über die cembranoide Biosynthese in marinen Invertebraten wenig bekannt ist, konnten Wagner und Mitarbeiter zeigen, dass in Tabakpflanzen Geranylgeranyl-diphosphat zu dem epimeren Monoalkohol Isocembrol zyklisiert.⁹² Während die Konfiguration an dem am Ringschluss beteiligten tertiären Kohlenstoffatom C-1 definiert ist (1*S*), bildet sich das Stereozentrum an dem zur Alkoholgruppe benachbarten Kohlenstoffatom C-4 in beiden Konfigurationen aus. CYP71D16 aus *Nicotiana tabacum* konnte anschließend als ein Enzym identifiziert werden, das die Hydroxylierung von Isocembrol (**4**) an Position C-6 zum Cembrendiol chemo-, regio- und stereoselektiv katalysiert (Schema 3).⁸⁷



Schema 3. Biosyntheseweg von Cembrendiol in Tabakpflanzen. Über den Methylerythritolphosphat- Stoffwechselweg (MEP) wird Isopentenylidiphosphat (IPP) generiert, das über eine Isomerase in Dimethylallyldiphosphat (DMAP) umgewandelt wird. Die Geranylgeranylidiphosphat Synthase (GGPPS) synthetisiert aus den Isoprenoid-Vorstufen Geranylgeranylidiphosphat (GGPP).⁸⁹ Anschließend katalysiert die Isocembrol-Synthase die Zyklisierung zum Isocembrol, das von CYP71D16 aus *Nicotiana tabacum* zum Cembrendiol hydroxyliert wird.^{87,90,92}

1.3.3 Chemische Synthese

In der organischen Chemie werden Naturstoffe über Totalsynthesen hergestellt. Während im Allgemeinen organische Verbindungen über eine mehrstufige lineare Abfolge von Reaktionen synthetisiert werden, werden komplexere Moleküle über konvergente Synthesen dargestellt, bei denen mehrere Fragmente zum gewünschten größeren Molekül zusammengeführt werden.⁹³ Funktionelle Gruppen werden dabei häufig über bereits funktionalisierte Vorläufermoleküle in einem frühen Stadium der Synthese eingebaut, wofür die Verwendung von Schutzgruppen notwendig ist. Stellvertretend für bereits beschriebene Totalsynthesen von Cembranoiden⁹⁴⁻⁹⁷ wird nachfolgend die Totalsynthese eines polyoxygenierten Cembranoides beschrieben, das aus griechischem Tabak isoliert werden konnte.⁹⁸ Tietze *et al.* gelang die Totalsynthese in 24 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 2,7 %.⁹⁹ Das Cembranoid konnte über ein Dithian- und ein Epoxidbaustein aufgebaut werden, die sich über eine nukleophile Epoxidöffnung sowie Ringschlussmetathese zum Makrozyklus verknüpfen ließen (Abbildung 5). Der Epoxidbaustein konnte über eine Domino-Mehrkomponenten-Allylierung synthetisiert werden, dessen Ausgangsbausteine hochfunktionalisierte Moleküle waren. Induziert durch das Substrat verlief die Mehrkomponenten-Allylierung stereoselektiv, sodass das spätere Stereozentrum an C-1 definiert werden konnte. Die Epoxidierung an C-11/C-12 mit anschließender intramolekularer Epoxidöffnung erfolgte dagegen nur mit mäßiger Diastereoselektivität (Diastereomerenverhältnis (dr) = 40:60). Ebenso gelang die Methylierung und Reduktion der Ketogruppe an C-5 zum Alkohol nur mit mäßiger Diastereoselektivität (dr = 60:40).⁹⁹

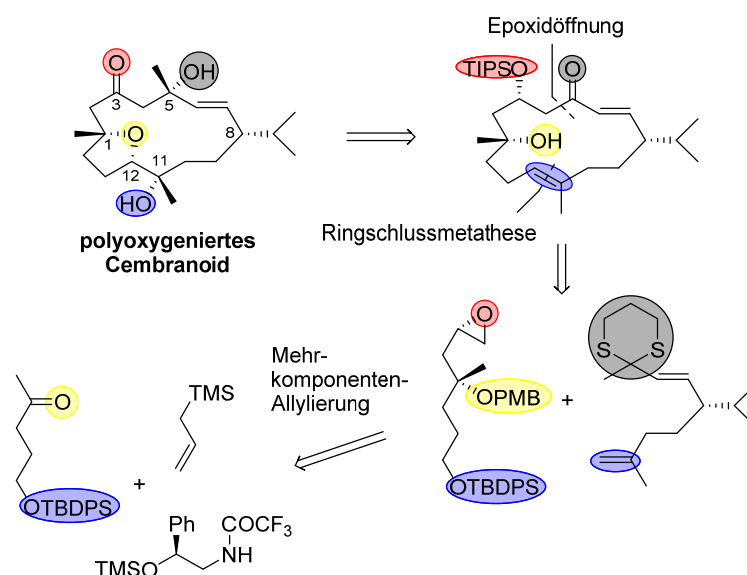


Abbildung 5. Retrosynthetische Analyse eines polyoxygenierten Cembrans. Verändert nach Tietze *et al.*⁹⁹

Eine neuere Herangehensweise der organischen Chemie stellen biomimetische Reaktionen dar.¹⁰⁰ Inspiriert von der Biosynthese der Terpene haben Baran und Mitarbeiter ein Zweiphasen-Prinzip für die Totalsynthese von Terpenen entwickelt.¹⁰¹ In der ersten Zyklisierungsphase soll ein wenig funktionalisiertes terpenoides Grundgerüst erstellt werden, während in der zweiten Oxidationsphase die Sauerstofffunktionalitäten eingeführt werden.¹⁰² Obgleich das Zweiphasenprinzip bisher nicht für die Synthese von Cembranoiden angewendet wurde, konnte es unter anderem für die Synthese der Taxolvorstufe (-)-Taxuyunnanine D^{103,104} und des Diterpenoids (+)-Ingenol¹⁰⁵ erfolgreich eingesetzt werden. Dieses biomimetische Prinzip, bei dem die funktionellen Gruppen erst in einem späten Stadium der Synthese eingeführt werden, bietet im Vergleich zur klassischen Herangehensweise einige Vorteile. Zum einen werden weniger Schutzgruppen benötigt, zum anderen erleichtert der Syntheseaufbau die Generierung von Molekülanaloga und stellt damit ein diversitätsorientiertes Syntheseprinzip dar.^{101,106} Die Herausforderung der späten Oxyfunktionalisierung liegt jedoch in der Notwendigkeit diese regio- und stereoselektiv durchzuführen.¹⁰⁷

1.4 Ziel der Arbeit

Cembranoide stellen eine Substanzklasse von diterpenoiden Naturstoffen dar, die aus einem 14-gliedrigen Kohlenstoffzyklus aufgebaut sind und aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivitäten pharmakologisch von Interesse sind. Da Cembranoide häufig zahlreiche zusätzliche funktionelle Sauerstoff enthaltende Gruppen tragen, stellen sie komplexe Verbindungen dar, deren Synthese herausfordernd ist. In einem neuen biomimetischen Syntheseverfahren wird versucht, den Aufbau der Terpenoidbiosynthese nachzustellen, um ähnlich effiziente Routen zu erhalten. Dabei sollen im Anschluss an die Synthese eines zyklischen Gerüsts stufenweise verschiedene Sauerstoff-funktionalitäten eingeführt werden, um ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufermolekül, verschiedene Zielprodukte zu synthetisieren. Ziel ist es, die Oxidationen möglichst chemo-, regio- und stereoselektiv durchführen zu können. Im Idealfall soll dabei ein breites Spektrum an Biokatalysatoren für die Synthese verschiedener Zielprodukte zur Verfügung stehen, die für mehrfache Oxidationen miteinander kombiniert werden können. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Anforderungen an oxidierende Katalysatoren durch die Verwendung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen erfüllt werden. Hierbei sollte die Cytochrom-P450-Monooxygenase P450-BM3 aus *Bacillus megaterium* eingesetzt werden, um am Beispiel ausgewählter cembranoider oder Cembranoid-ähnlicher Verbindungen (Abbildung 6), den Nutzen dieser Biokatalysatoren für die Oxidation komplexer Substrate zu demonstrieren.

Zunächst sollten verschiedene 14-gliedrige Makrozyklen und Diterpenoide als Modellsubstrate hinsichtlich einer P450-BM3-katalysierten Oxidation vergleichend untersucht werden (**Kapitel 2**). Dabei sollte validiert werden, ob verschiedene Substrateigenschaften die Selektivität der P450-BM3-katalysierten Oxidation beeinflussen.

Im Weiteren sollten über semirationales Proteindesign P450-BM3-Biokatalysatoren entwickelt werden, die eine chemo-, regio- und stereoselektive Oxidation des Cembranoids β -Cembrendiol (**5**) ermöglichen und verschiedene oxidative β -Cembrendiol-Analoga synthetisieren (**Kapitel 3**).

In einer weiterführenden Studie zum β -Cembrendiol (**5**) sollte über die Etablierung einer P450-P450-Kaskadenreaktion eine zweifache Hydroxylierung des β -Cembrendiols (**5**) realisiert werden (**Kapitel 4**).

In einem weiteren Beispiel sollten für das chemisch synthetisierte Diterpenoid (3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (**3d**) chemo-, regio- und stereoselektive P450-BM3-Biokatalysatoren entwickelt werden, um einen chemoenzymatischen Syntheseweg zu ermöglichen (**Kapitel 5**).

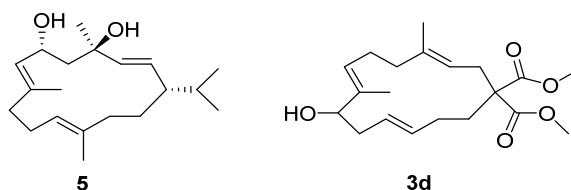


Abbildung 6. 14-gliedrige Makrozyklen, die als Beispielsubstrate für eine P450-BM3-katalysierte chemo-, regio- und stereoselektive Oxidation ausgewählt wurden.

2 Oxidation verschiedener 14-gliedriger Makrozyklen

2.1 Einleitung

Unter makrozyklischen Naturstoffen mit einer Größe zwischen 13 und 40 Ringatomen kommen Makrozyklen mit einer Größe von 14 Ringatomen am häufigsten vor. Wessjohann *et al.* konnten in einer Datenbankanalyse mit Einträgen von über 130.000 Naturstoffen darlegen, dass die meisten Makrozyklen ein Molekulargewicht von 300-400 g/mol haben und am häufigsten als 14-gliedrige Gerüste vorkommen, die sich nur aus Kohlenstoffringatomen zusammensetzen.⁹¹ Ebenso konnte gezeigt werden, dass unter den makrozyklischen Naturstoffen insbesondere die 14-gliedrigen Zyklen 1-2 isolierte und nicht-konjugierte Doppelbindungen tragen. Da die meisten der 14-gliedrigen zyklischen Naturstoffe sich in Summe aus 20 Kohlenstoffatomen zusammensetzen, bestehen diese nach Wessjohann *et al.* aus einer diterpenoiden Ringstruktur mit 3 zusätzlichen Methylgruppen und einer Isopropylgruppe.⁹¹ Da nicht-funktionalisierte 14-gliedrige diterpene Makrozyklen ein Molekulargewicht von ungefähr 274 g/mol haben, tragen die in der Natur vorkommenden diterpenoiden Makrozyklen mit einer Größe von 300-400 g/mol zusätzliche funktionelle Gruppen. Hierbei kann angenommen werden, dass diese zusätzlichen Gruppen zum Teil oder ganz aus Heteroatomen bestehen. Ein Beispiel hierfür sind Sauerstofffunktionalitäten, die u.a. von Cytochrom-P450-Monooxygenasen eingeführt werden.

Unter den bekannten 14-gliedrigen makrozyklischen Substraten, die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen oxidiert werden, stellen die meisten Makrolide dar, die eine Lactongruppe tragen und als Antibiotikum oder einer Vorstufe dessen fungieren. So katalysiert CYP107L1 (PikC) aus *Streptomyces venezuelae* die Hydroxylierung von Narbomycin an Position C-12 zu Pikromycin bzw. an Position C-14 zu Neopikromycin und von Pikromycin an Position C-14 zu Novapikromycin (Abbildung 7).¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Das Makrolid 6-Desoxyerythronolid B wird an Position C-6 zum Erythronolid B von CYP107A1 (EryF) aus *Saccharopolyspora erythraea* hydroxyliert.^{111,112} In einer späteren Stufe des Erythromycin-Biosynthesewegs hydroxyliert CYP113A1 aus *Saccharopolyspora erythraea* Erythromycin D oder B an Position C-12 zu Erythromycin C bzw. A.¹¹³ Im Oleandomycin-Biosyntheseweg epoxidiert CYP107D1 (OleP) aus *Streptomyces antibioticus* 8,8a-Desoxyoleandolid zum Oleandolid.¹¹⁴

Unter den 14-gliedrigen Makrozyklen, die nur aus Kohlenstoffringatomen bestehen, ist nur eine Substanz bekannt, die natürlicherweise als Substrat für eine Cytochrom-P450-Monooxygenase fungiert. So wird Isocembrol (**4**) von CYP71D16 aus *Nicotiana tabacum* an Position C-6 zum Cembreniol hydroxyliert (Abbildung 7).^{87,115,116} Ein synthetisches und nicht-physiologisches P450-Substrat mit einer Ringgröße von 14 Kohlenstoffatomen ist das Carbolid 2-(Cyclotetradecyloxy)-4-(dimethylamino)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-ol.¹¹⁷ Dieser gesättigte Kohlenwasserstoffring ist über eine glykosidische Bindung mit einem Desosaminzucker verbunden und wird von CYP107L1 aus *Streptomyces venezuelae* zu sechs verschiedenen Produkten hydroxyliert.

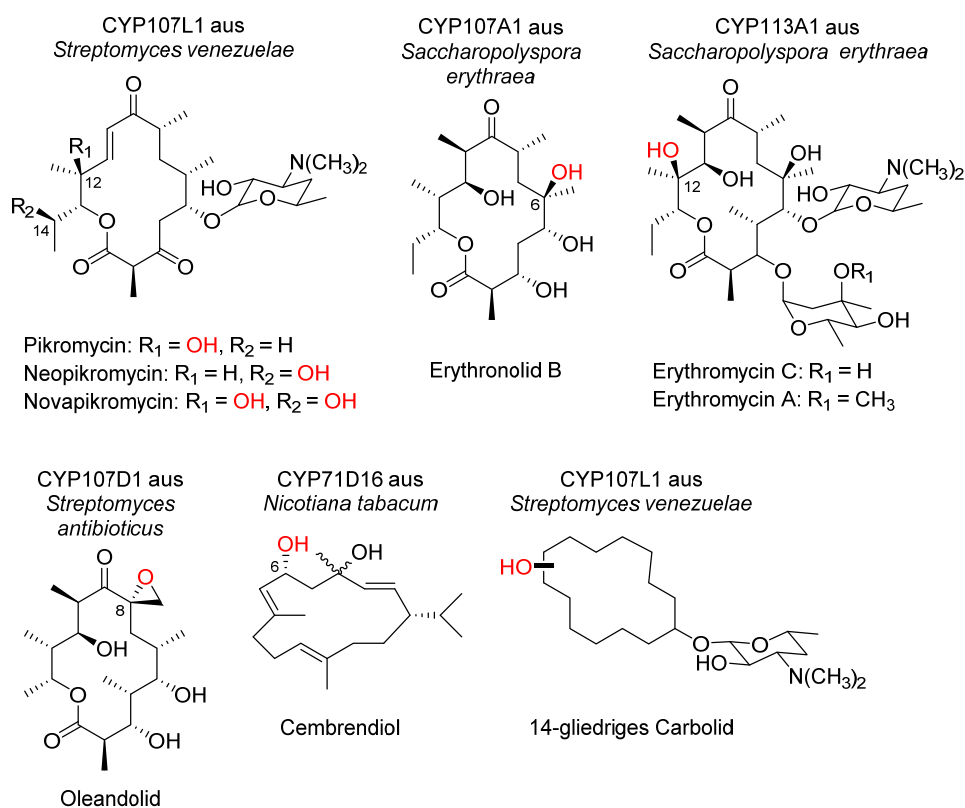


Abbildung 7. Bekannte Oxyfunktionalisierungen von 14-gliedrigen makrozyklischen Substraten, die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert werden.^{87,108,109,111–117} Die eingeführten Oxyfunktionalisierungen sind in rot gezeigt.

Während sich physiologische P450-katalysierte Oxidationen durch eine hohe Spezifität auszeichnen, weisen Oxidationen von nicht-physiologischen Substraten, die von einem P450-Wildtyp katalysiert werden, oft eine geringe Chemo-, Regio-, und Stereoselektivität auf.^{42,50,54} In der gängigen Herangehensweise ist die Selektivität des Biokatalysators durch Mutagenese optimiert worden.^{44,118} Dennoch sind für Oxidationen, die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert werden, auch andere Strategien zur Verbesserung der Selektivität bekannt, z.B. die Modifikation des Substrates.¹¹⁹ Beide Strategien ermöglichen die Umsetzung von artifiziellen Substraten und erweitern somit das Substratspektrum eines Biokatalysators.

Substratmodifikationen können über nicht-kovalente sowie über kovalente Bindungen erfolgen.¹¹⁹ Bei nicht-kovalenten Substratmodifikationen wird zusätzlich zu dem Substrat eine zweite Substanz, ein sogenanntes *decoy* zugegeben.¹²⁰ Das zusätzliche Molekül soll einen Teil des aktiven Zentrums blockieren, wodurch das eigentliche Substrat in eine bestimmte Orientierung gezwungen wird und somit die Selektivität der Reaktion erhöht wird. Das Attrappenmolekül geht unverändert aus der Reaktion hervor. Meistens besitzt es strukturelle Ähnlichkeiten zu einem Teil des physiologischen Substrates und imitiert es somit anteilig.¹¹⁹ Bei Substratmodifikationen über kovalente Bindungen wird an das eigentliche Substrat eine funktionelle Gruppe gekoppelt, die dadurch die Substratakzeptanz erhöht oder/und das Substrat in eine bestimmte Orientierung zwingt. Obgleich

bereits einige Studien zu Substratmodifikation bekannt sind,^{118,119,121} werden nachfolgend nur die Studien mit makrozyklischen Substraten erläutert.

In einer Studie von Li *et al.* wurden gesättigte Kohlenwasserstoffzyklen mit einer Ringgröße von 12-15 Atomen synthetisiert, die jeweils den Aminozucker Desosamin als Seitenkette trugen (Abbildung 8B).¹¹⁷ Als Vorbild dienten hierbei die Makrolide YC-17 (Abbildung 8A) und Narbomycin, die von CYP107L1 regio- und stereoselektiv an Position C-10 und C-12 bzw. C-12 und C-14 hydroxyliert werden. Kristallstrukturen von CYP107L1 mit den jeweiligen Substraten zeigten, dass der Aminozucker über die Dimethylaminogruppe mit bestimmten Aminosäuren des Proteins Wasserstoffbrückenbindungen sowie ionische Bindungen ausbildet, während der makrolide Ring ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht.¹²² Der Aminozucker sollte folglich als Substratanker fungieren und die Oxidation der Kohlenwasserstoffringe auf wenige Positionen begrenzen. Die Regioselektivität bei der Oxidation des 12-gliedrigen Kohlenwasserstoffzyklus konnte hierbei auf die Positionen C-6, C-7 und C-8 (95 %) eingegrenzt werden, obgleich die Hydroxylierungsreaktionen ohne stereoselektive Präferenz erfolgten (Abbildung 8B). Insgesamt wurde der 12-gliedrige Kohlenwasserstoffzyklus zu 7 verschiedenen Produkten umgesetzt.¹¹⁷

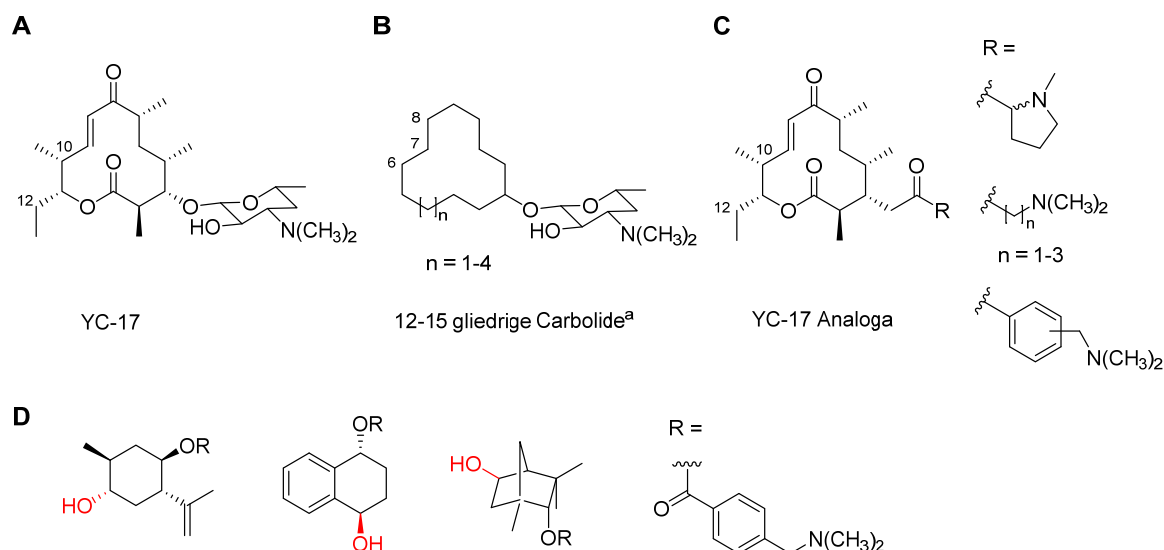


Abbildung 8. Substratvarianten von CYP107L1 aus *Streptomyces venezuelae*.^{109,117,123,124} In A ist das physiologische Substrat YC-17 dargestellt, während in B-D artifizielle Substrate bzw. deren Produkte gezeigt sind. ^aDie angegebenen Atomnummern in B beziehen sich auf das 12-gliedrige Carbolid.

In einer weiteren Studie von Negretti *et al.* wurden über Variationen des Substratankers von YC-17 die Regioselektivität der CYP107L1-katalysierten Reaktion optimiert. Hierbei wurden verschiedene YC-17-Derivate synthetisiert (Abbildung 8C), die jeweils eine *N,N*-Dimethylaminoverbindung unterschiedlicher Größe und Flexibilität anstelle des Aminozuckers besaßen. Während das physiologische Substrat YC-17 an den Positionen C-10 und C-12 im Verhältnis von 1:1 hydroxyliert wurde, konnte mit 3-Dimethylaminobenzoat als Seitenkette die Regioselektivität verbessert werden (C-10:C-12 > 20:1).¹²³ Kürzlich konnte der Einsatz der Seitenkette 3-Dimethylaminobenzoat als Substratanker an verschiedenen (bi-)zyklischen Substraten gezeigt werden (Abbildung 8D). Die von

einer CYP107L1-Dreifachmutante katalysierte Hydroxylierung erfolgte dabei an einer zum Substratanker entfernten Position in *anti*-Beziehung.¹²⁴

Ziel des im Folgenden dargestellten Teilprojektes war es, das Potential von P450-Biokatalysatoren für die selektive C-H-Oxidation von 14-gliedrigen Makrozyklen zu untersuchen. Unter Verwendung eines P450-Enzyms sollten Substratvarianten von unterschiedlicher Polarität und Komplexität getestet werden. Hierbei sollten sowohl der Einsatz von Alkohol- und Estergruppen als potentielle Substratanker getestet werden, als auch der Einfluss von Doppelbindungen und Methylgruppen auf die biokatalytische Oxidation überprüft werden. Die empirische Validierung von 14-gliedrigen Makrozyklen hinsichtlich einer P450-katalysierten Oxidation sollte somit potentielle Zusammenhänge zwischen Substrateigenschaften und der Aktivität sowie Selektivität des Enzyms aufdecken.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Zusammenstellung der Substratreihe aus 14-gliedrigen Makrozyklen

Es wurde eine Reihe aus 14-gliedrigen Zyklen erstellt (Abbildung 9), die sowohl synthetische Verbindungen als auch Naturstoffe beinhaltet. Die synthetischen Verbindungen (**1-3**) wurden von unserem Kooperationspartner – der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sabine Laschat (Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart) – hergestellt.¹²⁵⁻¹²⁸ Unter Verwendung des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation wurden per Ringschlussmetathese¹²⁹ eine systematische Variation von Makrozyklen erstellt, bei dem einer von drei Ringtypen mit jeweils einem von vier Resten unterschiedlicher Polarität (hier als Kopfgruppe bezeichnet) kombiniert wurde.

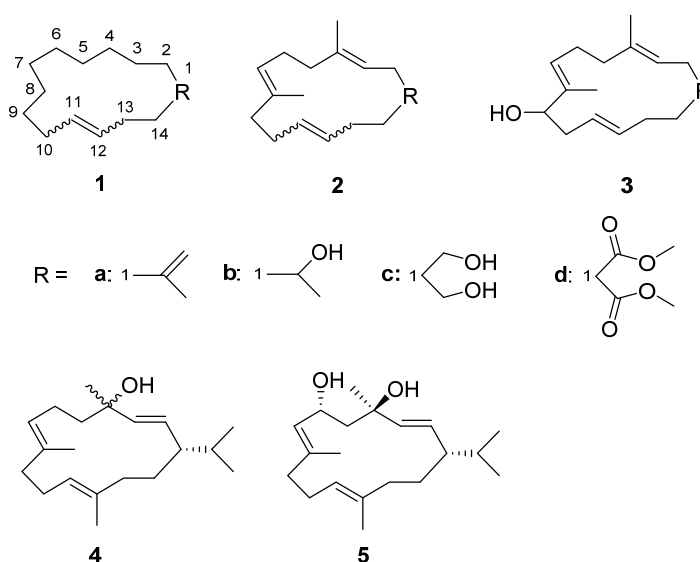


Abbildung 9. Substratreihe aus 14-gliedrigen Makrozyklen. Alle 14-gliedrigen Makrozyklen sind ebenfalls im Formelregister (Anhang: Kapitel 9.2) zu finden. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur, wurde jedoch für alle Makrozyklen (**1-5**) einheitlich verwendet und ist hier für den Makrozyklus **1** angegeben.

Der einfachste Ringtyp Cyclotetradec-11-en (**1**) stellt mit nur einer Doppelbindung den flexibelsten und unpolarsten Ring dar. Die Ringe (3*E*,7*E*)-4,8-Dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien (**2**) und (3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien (**3**) hingegen ähneln mit drei Doppelbindungen an C-3/C-4, C-7/C-8 und C-11/C-12 sowie zwei Methylgruppen an Position C-4 und C-8 terpenoiden Strukturen und sind im Vergleich zum Ring **1** rigidere Verbindungen. Der Ring **3** unterscheidet sich vom Ring **2** durch eine zusätzliche Alkoholgruppe an Position C-9. Die Kopfgruppen an Position C-1 variieren in ihrer Polarität und Größe. Die unpolarste Kopfgruppe ist der Isopropenylrest (**a**). Mit den Kopfgruppen **b-c** wurden eine bzw. zwei Alkoholgruppen eingeführt. Der Diesterrest (**d**) ist die polarste und gleichzeitig sterisch anspruchsvollste Kopfgruppe. Neben den synthetischen Makrozyklen wurden die in *Nicotiana tabacum* vorkommenden Naturstoffe Isocembrol (**4**) und β -Cembrendiol (**5**) getestet. Sie bestehen aus dem Zyklus (1*S*,2*E*,7*E*,11*E*)-4,8,12-Trimethylcyclotetradeca-2,7,11-trien, der an Position C-1 einen Isopropylrest als Kopfgruppe trägt und zusätzliche Alkoholgruppen am Ring besitzt. Die Ringstruktur von **4** und **5** unterscheidet sich vom Ring **2** durch eine zusätzliche Methylgruppe an Position C-12 sowie einer Doppelbindung an Position C-2/C-3 statt C-3/C-4. Während **4** eine Alkoholgruppe an Position C-4 besitzt und als epimeres Gemisch vorlag (4*S* und 4*R*), trägt β -Cembrendiol zwei Alkoholgruppen an Position C-4 und C-6, die in der (4*R*,6*R*)-Konfiguration vorlagen.

2.2.2 Vergleich von P450-BM3-katalysierten Oxidationen verschiedener 14-gliedriger Makrozyklen

Der Einfluss von Substrateigenschaften auf die biokatalytische Oxidation 14-gliedriger Makrozyklen sollte hier mit Hilfe der Cytochrom-P450-Monooxygenase P450-BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* untersucht werden. P450-BM3 ist eine katalytisch eigenständige Monooxygenase, die bereits für die Oxidation von sterisch anspruchsvollen nicht-physiologischen Substraten wie Alkaloiden,⁵⁶ polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen,^{54,55} Sesquiterpenoiden^{52,53} und Steroiden^{55,56,58} eingesetzt wurde. Kristallstrukturen von P450-BM3 zeigten, dass im aktiven Zentrum ein Phenylalanin (Position 87) zentral über dem Hämeisen positioniert ist.⁴² Sie gilt als eine der am häufigsten mutierten Positionen und ist insbesondere für die Oxidation von großen Substraten gegen kleinere Reste getauscht worden.^{55,130} Für die Oxidation der 14-gliedrigen Makrozyklen sollte an Position 87 eine Aminosäuresubstitution mit dem größtmöglichen räumlichen Zugewinn verwendet werden. Demnach wurden alle Reaktionen mit Hilfe der P450-BM3-Mutante F87G durchgeführt.

Mit allen 14-gliedrigen Makrozyklen der Substratreihe konnte per GC- und LC/MS-Analyse (LRMS) eine von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidation detektiert werden. Je nach Makrozyklus wurden jedoch unterschiedliche Umsätze (15-100 % in 0,5 h) und eine unterschiedliche Anzahl an Produkten (5 bis > 16) detektiert, die ein Verhältnis Masse/Ladung entsprechend einer einfachen bis fünffachen Oxidation besaßen (Anhang: Kapitel 9.4.1). Die zugehörigen Massen der Produkte (B-I) sind nachfolgend in Abhängigkeit ihrer Massendifferenz zum Substrat (A) mit Buchstaben gekennzeichnet, wobei B die geringste und I die höchste Massendifferenz zum Substrat aufweist (Abbildung 10). Eine Massendifferenz zwischen Substrat

und Produkt von +16 (D) entspricht einer atomaren Differenz von einem Sauerstoffatom und kann hierbei sowohl eine Hydroxylierung als auch eine Epoxidierung des Substrates bedeuten. Massendifferenzen zwischen Substrat und Produkt von +32 (F), +48 (H) und +64 (K) entsprechen einer atomaren Differenz von 2-4 Sauerstoffatomen und stellen somit konsekutive Hydroxylierungsreaktionen (in möglicher Kombination mit Epoxidierungen) dar. Bei Massendifferenzen zwischen Substrat und Produkt von -2 (B), +14 (C), +30 (E) und +62 (I) wird angenommen, dass auf die 0-4 (konsekutiven) Hydroxylierungsreaktionen eine Oxidation einer Alkoholgruppe zur Ketogruppe folgt. Produkte mit einer Massendifferenz zum Substrat von +14 (C), +30 (E) und +62 (I) sind folglich das Ergebnis von 1-5 (konsekutiven) Oxidationsreaktionen. Eine Massendifferenz zwischen Substrat und Produkt von +34 kann aufgrund einer Epoxidierung mit anschließender Hydrolyse zum 1,2-Diol entstanden sein.

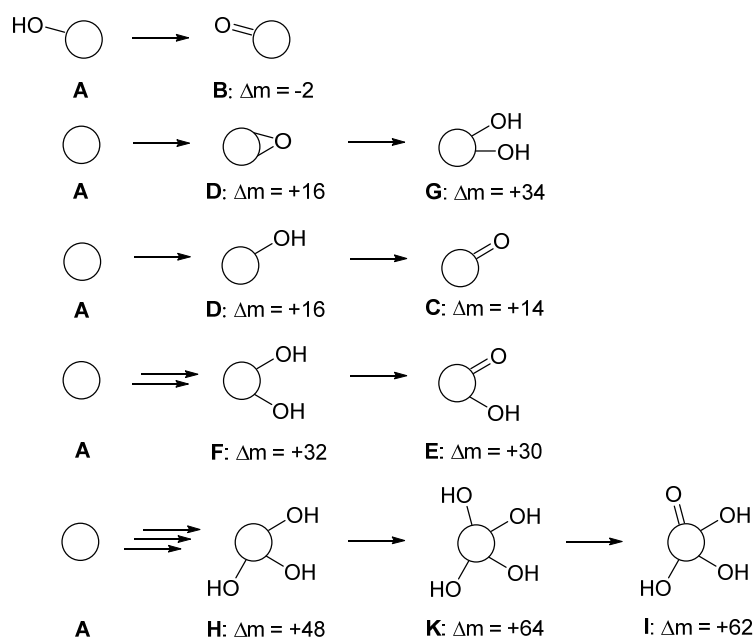


Abbildung 10. Vereinfachte Darstellung der detektierten Reaktionsprodukte (B-I) mit ihren zugehörigen Massendifferenzen (Δm) zum Substrat (A).

Die 14-gliedrigen makrozyklischen Substratvarianten wurden in mehrere Vergleichsgruppen eingeteilt. Dabei wiesen die Makrozyklen einer Vergleichsgruppe entweder eine gleiche Ringstruktur mit unterschiedlichen Kopfgruppen oder unterschiedliche Ringstrukturen mit gleicher Kopfgruppe vor.

Vergleich von 14-gliedrigen Makrozyklen unterschiedlicher Flexibilität

Zunächst sollte der Einfluss der Komplexität der Ringstruktur bei der Oxidation verschiedener 14-gliedriger Makrozyklen untersucht werden. Die unterschiedlich komplexen Ringe **1** und **2** wurden jeweils in Kombination mit der größten Kopfgruppe **d** verglichen, wengleich die C-11/C-12-Doppelbindungen der Makrozyklen **1d** und **2d** in entgegengesetzten Konfigurationen vorlagen (E/Z-Verhältnis: 9:91 (**1d**) und 89:11 (**2d**)) (Abbildung 11). Der nahezu gesättigte Makrozyklus **1d**, der

eine flexiblere Ringstruktur besitzt, zeigte im Vergleich zum rigideren Makrozyklus **2d** einen geringeren Umsatz (**1d**: 15 % nach 0,5 h; **2d**: 59 % nach 0,5 h; Tabelle 1). Obgleich beide Makrozyklen eine vergleichbare Anzahl an Produkten (5-7) bilden, zeigte das Produktspektrum der Oxidation von **2d** zwei Hauptprodukte, während sich die Produkte von **1d** nahezu gleich verteilten. Die Produkte beider Makrozyklen zeigten überwiegend Massendifferenzen zum Substrat von +16 und lassen somit auf eine Hydroxylierung oder eine Epoxidierung schließen.

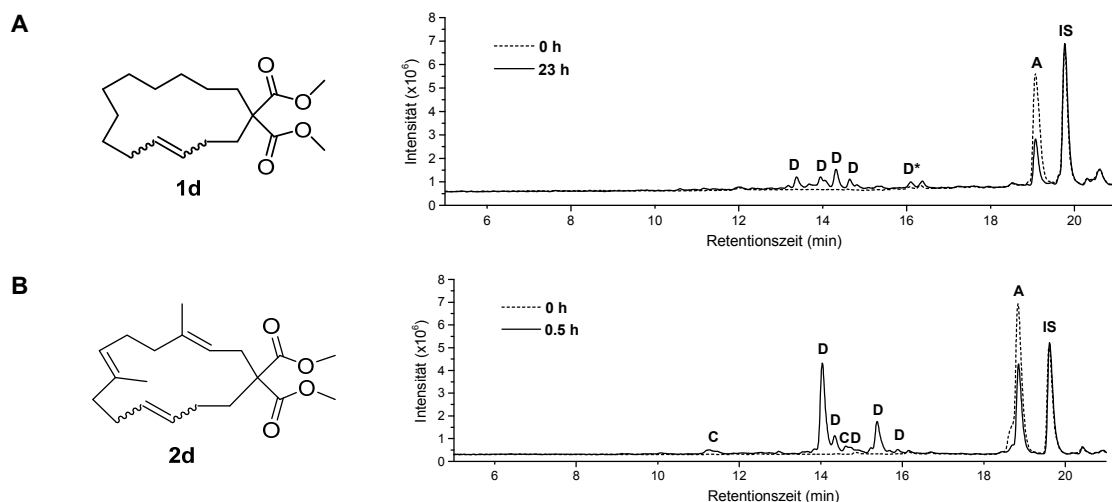


Abbildung 11: LC/MS-Chromatogramme von den Oxidationen der Makrozyklen **1d** (A) und **2d** (B), die von der P450-BM3-Mutante F87G katalysiert wurden. Die Konfiguration der C-11/C-12-Doppelbindung lag bei dem Substrat **1d**¹²⁸ in einem E/Z-Verhältnis von 9:91 und bei **2d**¹²⁷ von 89:11 vor. Die gezeigten Oxidationen der beiden Substrate wurden mit verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt (**1d**: 23 h und **2d**: 0,5 h), wiesen jedoch einen vergleichbaren Umsatz (59-70 %) auf. Als Negativkontrolle diente eine Reaktion, zu der kein Enzym zugegeben wurde (0h-Probe). Die Substrate (A) wurden bei folgende Retentionszeiten detektiert: **1d**: $R_t = 19,2$ min, **2d**: $R_t = 18,9$ min. Der interne Standard (IS) hatte eine Retentionszeit von 19,7 min. Die Produkte wurden anhand ihrer Massen nachgewiesen, wobei Massendifferenzen zu den jeweiligen Substraten von +14 (C) und von +16 (D) detektiert wurden. Das mit einem Stern (*) markierte Produkt (D) konnte mit Hilfe einer Referenzverbindung als (11,12)-Epoxyderivat von **1d** identifiziert werden.

Tabelle 1. Von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidationen der Makrozyklen **1d** und **2d** und massenspektrometrische Charakterisierung der Produkte. R.zeit: Reaktionszeit. Mw: Molekulargewicht in g/mol. Δm : Massendifferenz zum Substrat. ΔA : Atomdifferenz zum Substrat. ^aMehrstufige Oxidationen eines Substrates werden als konsekutive Oxidationen bezeichnet. # In den Proben der verschiedenen Zeitpunkte (0,5 h und 23 h) wurden die gleichen Produkte in unterschiedlichen Intensitäten detektiert.

Substrat	R.zeit (h)	Umsatz (%)	Anzahl der Produkte	Peak	Mw	Δm	ΔA	Anzahl (konsekutiver) Oxidationen ^a
1d	0,5	15 ± 6	5	#				
	23,0	70 ± 2	5	A	310	0	-	-
				D	326	+ 16	+ O	1
2d	0,5	59 ± 5	7	A	334	0	-	-
				C	348	+14	+ O, - H ₂	2
				D	350	+16	+ O	1

Vergleich von 14-gliedrigen Makrozyklen unterschiedlicher Polarität

Der Einfluss der Polarität sollte zum einen bei gleicher Ringstruktur und unterschiedlich polaren Kopfgruppen (**1a-d** und **3c-d**), zum anderen bei unterschiedlich funktionalisierten Ringstrukturen und gleicher Kopfgruppe (**2d** mit **3d** und **4** mit **5**) untersucht werden. Die Oxidation der vorwiegend gesättigten Makrozyklen **1** wies in Abhängigkeit der Kopfgruppen **a-d** erhebliche Unterschiede auf (Abbildung 12).

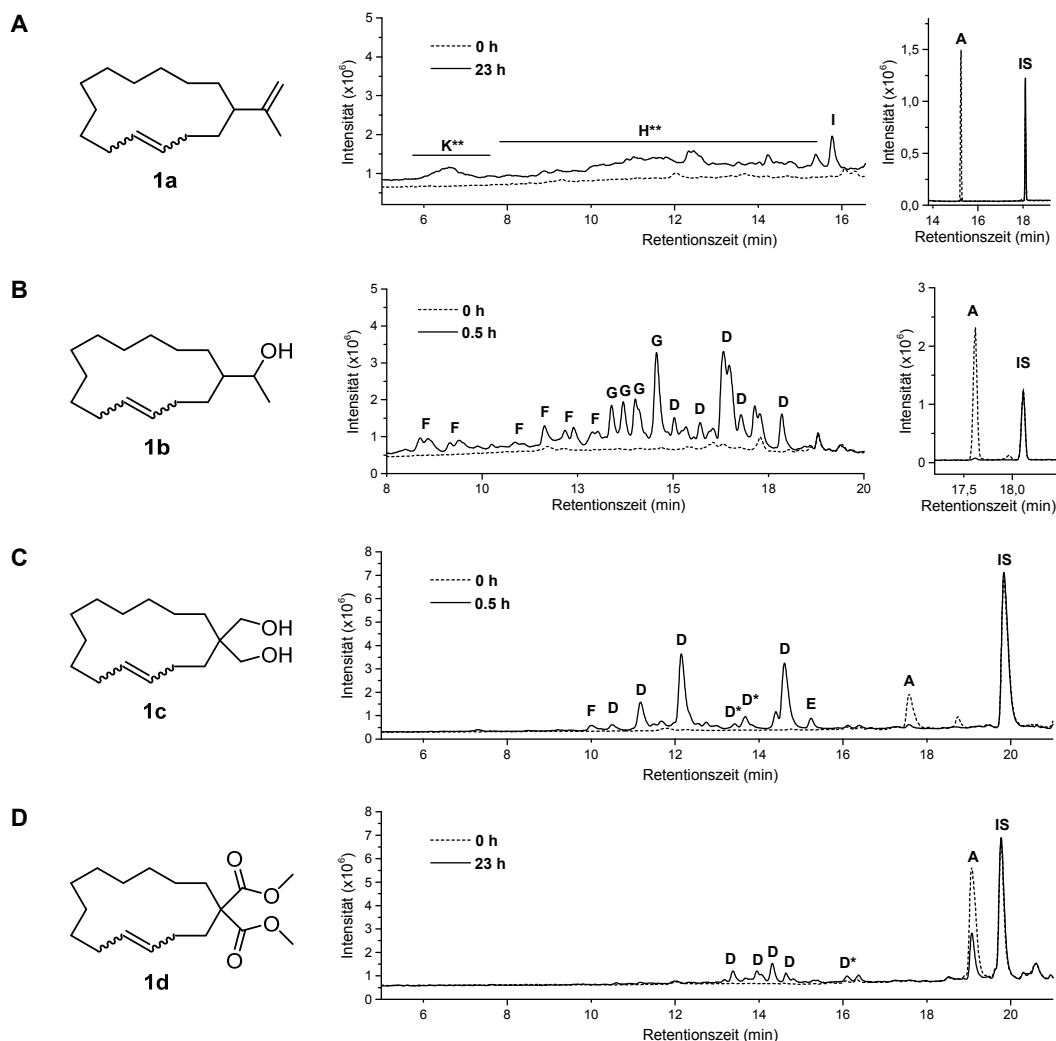


Abbildung 12: LC-MS-Chromatogramme von den Oxidationen der Makrozyklen **1a** (A), **1b** (B), **1c** (C) und **1d** (D), die von der P450-BM3-Mutante F87G katalysiert wurden. Die Konfiguration der C-11/C-12-Doppelbindung lag bei dem Substrat **1b** in einem E/Z-Verhältnis von 1:1, bei **1c** von 17:83 und bei **1d** von 9:91 vor.¹²⁸ Bei **1a** wurde die Konfiguration der Doppelbindung nicht bestimmt.¹²⁸ Die gezeigten Oxidationen der Substrate wurden mit verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt (**1a** und **1d**: 23 h, **1b-c**: 0,5 h), wiesen jedoch einen vergleichbaren Umsatz (70-100 %) auf. Alle Oxidationsreaktionen wurden per LC/MS analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Reaktion, zu der kein Enzym zugegeben wurde (0h-Probe). Die Substrate (A) wurden bei folgende Retentionszeiten detektiert: **1c**: $R_t = 17,5$ min, **1d**: $R_t = 19,2$ min. Der interne Standard (IS) hatte eine Retentionszeit von 19,7 min. Zusätzlich wurden die Oxidationsreaktionen von **1a** und **1b** per GC/MS analysiert, um den Substratverbrauch analysieren zu können: **1a**: $R_t = 14,9$ min; **1b**: $R_t = 17,6$ min, interner Standard (IS): $R_t = 18,1$ min. Die Produkte wurden anhand ihrer Masse identifiziert, wobei Massendifferenzen zu den jeweiligen Substraten von +14 (C), +16 (D), +30 (E), +32 (F), +34 (G), +48 (H), +62 (I), +64 (K) detektiert wurden. Produkte (D), die mit einem Stern (*) markiert wurden, konnten mit Hilfe von Referenzverbindungen als (11,12)-Epoxyderivate der jeweiligen Substrate identifiziert werden. **Produkte des Makrozyklus **1a** konnten anhand ihrer Masse bestimmt werden, obgleich eine Peaktrennung nicht möglich war.

Der Umsatz der Makrozyklen **1b-d** variierte zwischen 15 % (**1d** nach 0,5 h) und 100 % (**1b** nach 0,5 h) und nahm mit steigender Größe und Polarität der Kopfgruppe ab (Tabelle 2). Die Anzahl der Produkte der Makrozyklen **1a-d** nahm ebenfalls mit steigender Polarität und Größe der Kopfgruppe ab (**1b**: > 15; **1c**: 8; **1d**: 5). Wenngleich die Produkte der Oxidation von **1a** nicht klar zu erkennen sind, wird aufgrund des vollständigen Substratverbauchs nach 23 h angenommen, dass eine hohe Anzahl an Produkten vorlag, diese jedoch nicht voneinander getrennt werden konnten (Abbildung 12A). Die Produktmassen der Makrozyklen **1a-d** variierten hierbei zwischen einer Massendifferenz von +16 bis zu +64 zu den jeweiligen Substraten. Während der Makrozyklus mit der unpolaren Isopropenyl-Kopfgruppe **1a** in einer mehrstufigen Reaktion vier- bis fünfmal oxidiert wurde, wurden die Makrozyklen mit 1-2 Alkoholfunktionalitäten nur ein- bis zweimal oxidiert. Der Makrozyklus **1d**, der mit zwei Esterfunktionalitäten sowohl die größte als auch die polarste Kopfgruppe trägt, wurde hingegen nur einfach oxidiert.

Tabelle 2. Von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidationen der Makrozyklen 1a-d und massenspektrometrische Charakterisierung der Produkte. R.zeit: Reaktionszeit. Mw: Molekulargewicht in g/mol. Δm : Massendifferenz zum Substrat. ΔA : Atomdifferenz zum Substrat. *Mehrstufige Oxidationen eines Substrates werden als konsekutive Oxidationen bezeichnet. *Da eine Trennung in einzelne Produktpeaks nicht möglich war, kann hier keine Produktanzahl angegeben werden. # In den Proben der verschiedenen Zeitpunkte (0,5 h und 23 h) wurden die gleichen Produkte in unterschiedlichen Intensitäten detektiert.

Substrat	R.zeit (h)	Umsatz (%)	Anzahl der Produkte	Peak	Mw	Δm	ΔA	Anzahl (konsekutiver) Oxidationen ^a
1a	0,5	40 ± 7	*	#				
	23,0	100 ± 1	*	A	234	0	-	-
				H	282	+48	+ O ₃	3
				I	296	+62	+ O ₄ , - H ₂	5
			K	298	+64	+ O ₄	4	
1b	0,5	100 ± 0	> 15	A	238	0	-	-
				D	254	+16	+ O	1
				F	270	+32	+ O ₂	2
				G	272	+34	+ O ₂ , + H ₂	1
1c	0,5	93 ± 2	8	A	254	0	-	-
				D	270	+16	+ O	1
				E	284	+30	+ O ₂ , - H ₂	2
				F	286	+32	+ O ₂	2
1d	0,5	15 ± 6	5	#				
	23,0	70 ± 2	5	A	310	0	-	-
				D	326	+16	+ O	1

Der Einfluss der Polarität sollte in einem nächsten Schritt auch in Kombination mit der komplexeren Ringstruktur **3** getestet werden. Aufgrund der unselektiven Reaktionen der Cyclotetradecen-Derivate (**1**) mit den kleinen, wenig polaren Kopfgruppen **a-b**, wurden hier nur die Kopfgruppen **c-d** getestet.

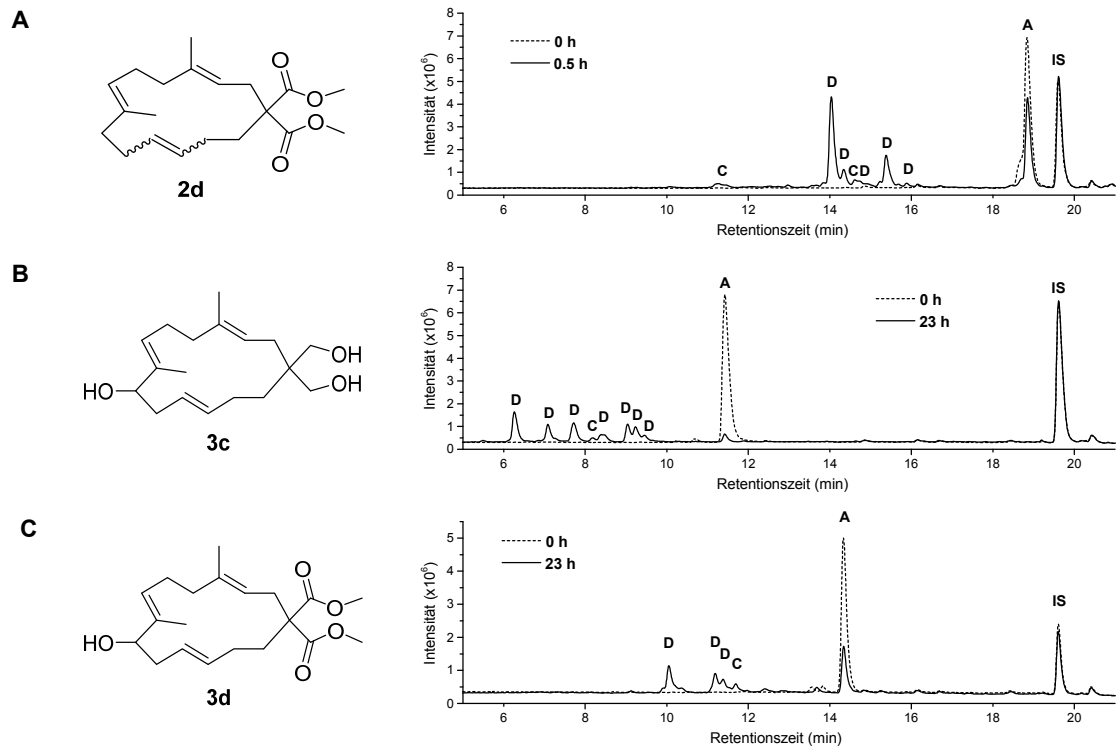


Abbildung 13. LC/MS-Chromatogramme von den Oxidationen der Makrozyklen **2d** (A), **3c** (B) und **3d** (C), die von der P450-BM3-Mutante F87G katalysiert wurden. Die Konfiguration der C-11/C-12-Doppelbindung lag bei dem Substrat **2d** in einem E/Z-Verhältnis von 89:11 und bei den Substraten **3c-d** von 99:1 vor.^{125,127} Die gezeigten Oxidationen der Substrate wurden mit verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt (**2d**: 0,5 h; **3c-d**: 23 h), wiesen jedoch einen vergleichbaren Umsatz (59-97 %) auf. Als Negativkontrolle diente eine Reaktion, zu der kein Enzym zugegeben wurde (0h-Probe). Die Substrate (A) wurden bei folgende Retentionszeiten detektiert: **2d**: R_t = 18,9 min, **3c**: R_t = 11,4 min, **3d**: R_t = 14,4 min. Der interne Standard (IS) hatte eine Retentionszeit von 19,7 min. Die Produkte wurden anhand ihrer Masse nachgewiesen, wobei Massendifferenzen zu den jeweiligen Substraten von +14 (C) und +16 (D) detektiert wurden.

Tabelle 3. Von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidationen der Makrozyklen **2d** und **3c-d** und massenspektrometrische Charakterisierung der Produkte. R.zeit: Reaktionszeit. Mw: Molekulargewicht in g/mol. Δm: Massendifferenz zum Substrat. ΔA: Atomdiffenz zum Substrat. # Mehrstufige Oxidationen eines Substrates werden als konsekutive Oxidationen bezeichnet. # In den Proben der verschiedenen Zeitpunkte (0,5 h und 23 h) wurden die gleichen Produkte in unterschiedlichen Intensitäten detektiert.

Substrat	R.zeit (h)	Umsatz (%)	Anzahl der Produkte	Peak	Mw	Δm	ΔA	Anzahl (konsekutiver) Oxidationen ^a
2d	0,5	59 ± 5	7	A	334	0	-	-
				C	348	+14	+ O, - H ₂	2
				D	350	+16	+ O	1
3c	0,5	50 ± 2	8	#				
	23,0	97 ± 0	8	A	294	0	-	-
				C	308	+14	+ O, - H ₂	2
3d	0,5	36 ± 3	4	#				
	23,0	71 ± 1	4	A	350	0	-	-
				C	364	+14	+ O, - H ₂	2
				D	366	+16	+ O	1

Die Unterschiede im Umsatz der gesättigten Makrozyklen **1**, die die Kopfgruppen **c-d** trugen (**1c-d**: 15-93 % nach 0,5 h), konnten mit den terpenoiden Ringen (**3**), die ebenfalls die Kopfgruppen **c-d** trugen, nur als Tendenz beobachtet werden (Abbildung 13B-C). Während der Makrozyklus **3c** mit einer Diol-Kopfgruppe in 23 h zu 97 % umgesetzt wurde, wurde der Makrozyklus **3d** mit einer Diester-Kopfgruppe nach 23 h zu 71 % oxidiert (Tabelle 3). Die Anzahl der Produkte hatte sich bei Zunahme der Größe und Polarität der Kopfgruppe in Kombination mit beiden Ringstrukturen (**3c-d** und **1c-d**) nahezu halbiert (**3c**: 8 Produkte, **3d**: 4 Produkte). Die gebildeten Produkte aller Makrozyklen **3c-d** und **1c-d** sind überwiegend als Monohydroxylierungs- bzw. Monoepoxidierungsprodukte identifiziert worden. Die Einführung einer Alkoholgruppe in den terpenoiden Ring (Vergleich **2d** und **3d**, Abbildung 13A und Abbildung 13C) hat wie schon bei der Erhöhung der Polarität der Kopfgruppe zu einer Verringerung des Umsatzes geführt (**2d**: 59 % nach 0,5 h und **3d**: 36 % nach 0,5 h) (Tabelle 3). Ebenso hat die Anzahl der Produkte bei Zunahme der Polarität abgenommen (**2d**: 7 Produkte, **3d**: 4 Produkte). Auch hier sind für beide Makrozyklen **2d** und **3d** überwiegend Produkte mit einer Massendifferenz von +16 gefunden worden. Neben den synthetischen Verbindungen sollten auch zwei unterschiedlich polare cembranoide Naturstoffe miteinander verglichen werden, die ebenfalls aus einem 14-gliedrigen Zyklus bestehen (Abbildung 14).

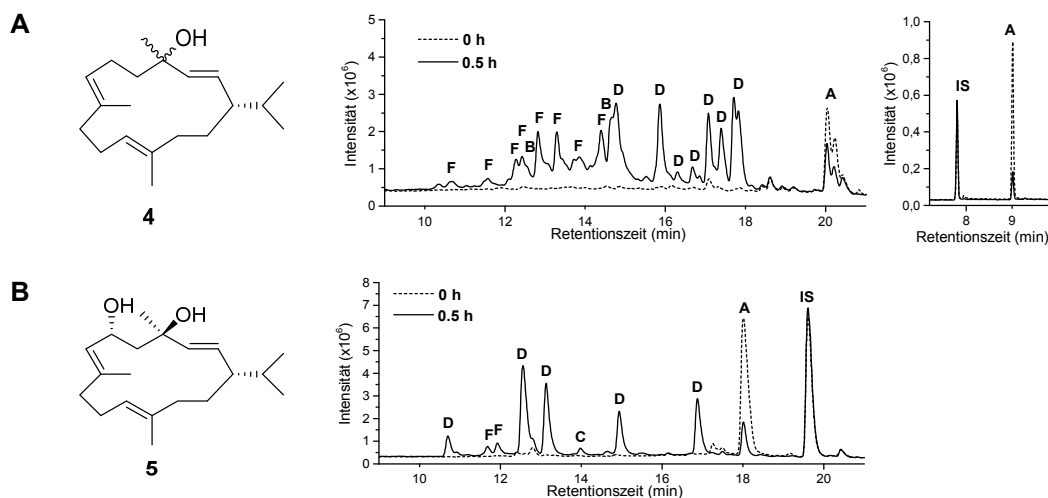


Abbildung 14: LC/MS-Chromatogramme von den Oxidationen der Makrozyklen **4** (A) und **5** (B), die von der P450-BM3-Mutante F87G katalysiert wurden. Beide Oxidationsreaktionen wurden per LC/MS analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Reaktion, zu der kein Enzym zugegeben wurde (0h-Probe). Die Substrate (A) wurden bei folgenden Retentionszeiten detektiert: **4**: $R_t = 20,0$ und $20,2$ min, **5**: $R_t = 18,0$ min. Der interne Standard (IS) hatte eine Retentionszeit von $19,7$ min. Die Oxidationsreaktion von **4** ($R_t = 9,0$ min) wurde zusätzlich per GC/MS mit internem Standard ($R_t = 7,8$ min) analysiert, um den Substratverbrauch analysieren zu können. Die Produkte wurden anhand ihrer Masse nachgewiesen, wobei Massendifferenzen zu den jeweiligen Substraten von -2 (B), $+14$ (C), $+16$ (D), $+32$ (F) detektiert wurden.

Die Einführung einer Alkoholgruppe in den cembranoiden Ring, der als Kopfgruppe einen Isopropylrest trägt (Vergleich **4** und **5**), hat im Gegensatz zu der Einführung einer Alkoholgruppe in den terpenoiden Ring nur zu einer leichten Erhöhung des Umsatzes geführt (**4**: 76 % nach 0,5 h und **5**: 84 % nach 0,5 h; Tabelle 4). Vergleichbar zur Einführung einer Alkoholgruppen in den

terpenoiden Ring, führte die Einführung einer Alkoholgruppe in den cembranoiden Ring zu einer drastischen Minimierung der Produktanzahl (**4**: \gg 16; **5**: 8). Da der Makrozyklus **4** als epimeres Gemisch vorlag, war im Vergleich zu **5** bei gleicher Regioselektivität auch die doppelte Anzahl an Produkte zu erwarten. Auch die Art der gebildeten Produkte unterschied sich zwischen den cembranoiden Substraten. Während der cembranoide Monoalkohol **4** zu vergleichbaren Teilen zu einfach sowie zweifach oxidierten Produkten (D und F) umgesetzt wurde, stellten die Hauptprodukte des cembranoiden Diols **5** einfach oxidierte Produkte (D) dar.

Tabelle 4. Von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidationen der Makrozyklen 4-5 und massenspektrometrische Charakterisierung der Produkte. R.zeit: Reaktionszeit. Mw: Molekulargewicht in g/mol. Δm : Massendifferenz zum Substrat. ΔA : Atomdiffenz zum Substrat. ^aMehrstufige Oxidationen eines Substrates werden als konsekutive Oxidationen bezeichnet.

Substrat	R.zeit (h)	Umsatz (%)	Anzahl der Produkte	Peak	Mw	Δm	ΔA	Anzahl (konsekutiver) Oxidationen ^a
4	0,5	76 \pm 9	> 16	A	290	0	-	-
				B	288	-2	- H ₂	1
				D	306	+16	+ O	1
				F	322	+32	+ O ₂	2
5	0,5	84 \pm 2	8	A	306	0	-	-
				C	320	+14	+ O, - H ₂	2
				D	322	+16	+ O	1
				F	338	+32	+ O ₂	2

2.3 Diskussion

Unter Naturstoffen stellen 14-gliedrige Makrozyklen eine häufig vorkommende Substanzklasse dar. Dennoch sind 14-gliedrige Makrozyklen nur eingeschränkt verfügbar und wurden bisher nur wenig untersucht. Im vorliegenden Projekt wurden in einer grundlegenden Studie synthetisch verfügbare 14-gliedrige Makrozyklen (**1-3**) sowie zwei 14-gliedrige Naturstoffe (**4-5**) hinsichtlich einer möglichen P450-katalysierten Oxidation untersucht. Die synthetischen Makrozyklen (**1-3**) sollten hier als Modellsubstrate fungieren. Mit nur wenigen funktionellen Gruppen sollten die Makrozyklen (**1-3**) potentielle Vorstufen komplexerer 14-gliedriger Naturstoffe darstellen.

Die Oxidation der 14-gliedrigen Makrozyklen wurden hier mit der P450-BM3-Einfachmutante F87G getestet, deren Wildtyp natürlicherweise Fettsäuren mit einer Länge von 10-20 Kohlenstoffatomen hydroxyliert.⁴¹ Die untersuchten 14-gliedrigen Makrozyklen sind im Vergleich zum physiologischen Substrat des Wildtyp-Enzyms artifizielle Substrate und weisen eine deutlich unterschiedliche Größe und Molekülform auf. Mit der P450-BM3-Mutante F87G konnten jedoch für alle Makrozyklen (**1-5**) Umsätze (15-100 % in 0,5 h) nachgewiesen werden. Neben einem nahezu vollständigen Umsatz einiger Substrate, konnten Produkte mit einem oder mehreren zusätzlichen Sauerstoffatomen detektiert werden. Die Abfolge von zwei und mehr konsekutiven Reaktionen zeigte, dass neben den 14-gliedrigen Makrozyklen (**1-5**) auch bereits oxyfunktionalisierte Derivate von der P450-BM3-Mutante F87G als Substrat akzeptiert werden.

Die hohe Anzahl der Produkte (5 bis > 16) veranschaulichte, dass die Herausforderung bei der Oxidation der 14-gliedrigen Zyklen darin lag, die Reaktion regioselektiv zu katalysieren. 14-Gliedrige Makrozyklen mit nur wenigen funktionellen Gruppen besitzen eine Vielzahl an chemisch äquivalenten Kohlenstoffatomen, die alle potentielle Oxidationspositionen darstellen. Bei biokatalytischen Umsetzungen kann eine Erhöhung der Selektivität unter anderem dadurch erreicht werden, dass das Substrat über spezifische Wechselwirkungen zum Enzym in eine bestimmte Orientierung gezwungen wird.¹¹⁷ Im vorliegenden Projekt, sollte die Fragestellung untersucht werden, ob zusätzliche polare Gruppen, die kovalent am Substrat gebunden sind, eine spezifische Wechselwirkung mit dem Enzym ermöglichen und somit die Selektivität der P450-katalysierten Oxidation von Makrozyklen beeinflussen. Der Vergleich der Cyclotetradecen-Derivate (**1**) mit Kopfgruppen unterschiedlicher Polarität zeigte, dass die Anzahl der gebildeten Produkte mit zunehmender Größe und Polarität der Kopfgruppe auf mindestens ein Drittel reduziert werden konnte und damit die Selektivität der Reaktion erhöht wurde. Unter den gesättigten Makrozyklen **1** konnte die geringste Anzahl an Produkten (5) mit dem Makrozyklus **1d** erreicht werden, der als Kopfgruppe ein Diesterrest trägt. Auch unter den diterpenoiden Makrozyklen **3** konnte die geringste Anzahl an Produkten (4) mit einer Diester-Kopfgruppe (**3d**) erzielt werden. Der Vergleich der beiden Makrozyklen **3d** und **2d** zeigte, dass die zusätzliche Hydroxygruppe in **3d** an einer zur Kopfgruppe entfernten Position im Ring ebenfalls die Zahl der Produkte reduzierte (**2d**: 7 Produkte; **3d**: 4 Produkte). Die von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidationen der genannten Makrozyklen **1d**, **2d** und **3d** führten zu Produkten mit einer jeweiligen Masse entsprechend einer einfachen Hydroxylierung bzw. Epoxidierung, deren Oxidationsposition nicht bestimmt werden konnte. Wenngleich die Wechselwirkung der polaren funktionellen Gruppen mit dem Enzym nicht genauer spezifiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass polare Gruppen eine dirigierende Funktion übernehmen und sich positiv auf die Selektivität der P450-katalysierten Oxidation von Makrozyklen auswirken. Im Vergleich der verschiedenen polaren Makrozyklen konnten weiterhin unterschiedlich gute Umsätze beobachtet werden. Unter den Makrozyklen **1** und **3** zeigten die Zyklen mit der Diol-Kopfgruppe (**c**) höhere Umsätze als die Zyklen mit der Diester-Kopfgruppe (**d**). Die geringere Enzymaktivität gegenüber der Kopfgruppe **d** ist möglicherweise auf ihre Größe und damit eine weniger passende Substratbindung zurückzuführen.

In einem weiteren Schritt sollte getestet werden, ob die Erhöhung der Komplexität 14-gliedriger Makrozyklen und damit die Erniedrigung der Flexibilität, die Selektivität der Oxidation verbessern kann. Nach Li *et al.* besitzen gesättigte makrozyklische Kohlenwasserstoffzyklen eine hohe Flexibilität.¹¹⁷ Der Makrozyklus könnte demnach mehrere räumliche Orientierungen relativ zum Hämeisen im aktiven Zentrum des Biokatalysators einnehmen, sodass sich mehrere Produkte ausbilden. Da in der Studie von Li *et al.* die Einführung eines Substratankers an gesättigte Kohlenwasserstoffzyklen nur zu mäßigen Regio- und Stereoselektivitäten führte, postulierten sie, dass hohe Selektivitäten mit weniger flexiblen Zyklen ermöglicht werden könnten.¹¹⁷ Ein starrerere Zyklus sollte im vorliegenden Projekt durch Einführung von Doppelbindungen und Methylgruppen realisiert werden. Die Gegenüberstellung der Makrozyklen **1d** und **2d** zeigte hinsichtlich der Anzahl der Produkte jedoch keine deutlichen Unterschiede. Die von Li *et al.* vorgeschlagene Hypothese, die

einen Zusammenhang zwischen der Komplexität eines Zyklus und der Selektivität seiner Oxidation aufstellt, konnte in vorliegender Studie nicht bestätigt werden. Dennoch wurde der Makrozyklus **2d**, der eine diterpene Struktur besitzt, mit deutlich höherer Aktivität umgesetzt (59 % Umsatz nach 0,5 h) als das weniger komplexe Cyclotetradecen-Derivat **1d** (15 % Umsatz nach 0,5 h). Eine mögliche Erklärung für die höhere Aktivität kann die Einführung von Doppelbindungen und somit von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen sein, die an allylischer Position reaktivere Kohlenstoffatome besitzen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine Bevorzugung der (*E*)-Konfiguration an der C-11/C-12-Doppelbindung von der P450-BM3-Mutante F87G sein. Während der besser umgesetzte Makrozyklus **2d** an Position C-11 überwiegend in einer (*E*)-Konfiguration vorlag (*E/Z* = 89:11), lag der Makrozyklus **1d** überwiegend in einer (*Z*)-Konfiguration vor (*E/Z* = 9:91). In der vorliegenden Studie konnte der Einfluss der (*E/Z*)-Konfiguration an der C-11/C-12-Doppelbindung nicht systematisch untersucht werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die (*E/Z*)-Konfiguration der Substrate auch einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität der biokatalysierten Reaktion hatte. So konnte in Studien zur P450-BM3-katalysierten Oxidation von acyclischen Monoterpenen gezeigt werden, dass die (*E/Z*)-Isomere Geranylaceton und Nerylaceton mit unterschiedlicher Aktivität und Selektivität umgesetzt werden.⁵⁰

Die Untersuchung neun verschiedener 14-gliedrige Makrozyklen zeigte, dass kovalent gebundene Sauerstoff enthaltende Gruppen einen wichtigen Beitrag zur Selektivität von P450-katalysierten Oxidationen leisten. Da mit dieser empirischen Studie kein zugrunde liegender Mechanismus aufgeklärt werden konnte, ist ein vorhersagbarer und kontrollierbarer Einsatz von polaren Gruppen in Makrozyklen zur Steuerung der Selektivität bisher nicht möglich. Dennoch stellt die Strategie, Substratmodifikationen zur Erhöhung der Selektivität einzusetzen, einen vielversprechenden Ansatz dar, der in weiteren Studien untersucht werden sollte. Solange wird vorgeschlagen, analog zu der Studie von Narayan *et al.*¹²⁴ die Optimierung des Substrates mit der gängigen Herangehensweise der Enzymmutagenese zu kombinieren.

3 Chemo-, regio- und stereoselektive Oxidation von β -Cembrenndiol

Das folgende ist in ähnlicher Form bereits publiziert worden. Der Text des Originalartikels wurde übersetzt und um weitere Teile ergänzt.

Abgedruckt mit Genehmigung von Le-Huu, P., Heidt, T., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Chemo-, regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid β -cembrenndiol by P450 BM3. *ACS Catal.* 5, 1772-1780 (2015). Copyright 2015 American Chemical Society.

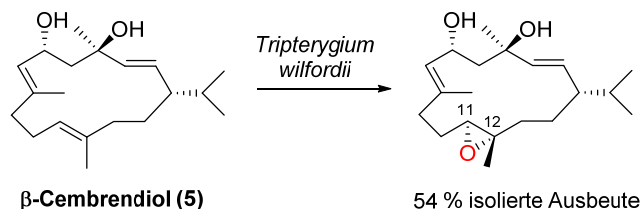
3.1 Einleitung

Das Cembranoid β -Cembrenndiol ((1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol) (**5**) und sein (4*S*)-Epimer α -Cembrenndiol sind die am häufigsten vorkommenden Cembranoide in Tabakpflanzen und deren wichtigste Aromastoffe.⁷² Cembrenndiole sind daher in zahlreichen Studien auf mögliche biologische Aktivitäten untersucht worden. Bereits im Jahr 1985 konnte ein hemmender Effekt von Cembrenndiol auf die Tumorpromotion beschrieben werden. Cembrenndiol inhibiert die Induktion des frühen Antigens des Epstein-Barr Virus in lymphoblastoiden Raji Zellen, die durch 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat hervorgerufen werden kann. β -Cembrenndiol (**5**) zeigte im Vergleich zu dem Stereoisomer α -Cembrenndiol eine größere inhibitorische Wirkung (β -Cembrenndiol (**5**): $IC_{50} = 22 \mu\text{M}$; α -Cembrenndiol: $IC_{50} = 25 \mu\text{M}$).^{131,132} Eine anti-proliferative Wirkung von β -Cembrenndiol (**5**) konnte ebenfalls in der humanen metastasierenden Prostatazelllinie PC-3M nachgewiesen werden.¹³³ Ein entzündungshemmender Effekt der Cembrenndiole konnte auf die Inhibition der Prostaglandinsynthese zurückgeführt werden. Die mittlere inhibitorische Konzentration (**5**: $IC_{50} = 0,39 \text{ mM}$) war dabei um mehr als Faktor drei geringer als die von Acetylsalicylsäure.⁷⁷ Ebenfalls konnte an Ratten und Strudelwürmern gezeigt werden, dass Cembrenndiol Verhaltensauffälligkeiten minimiert, die durch eine Nikotin-Sensibilisierung verursacht werden. Eine mögliche Anwendung von Cembrenndiol in der Behandlung von Nikotinabhängigkeit wurde daher diskutiert.¹³⁴⁻¹³⁶ Im Jahr 2001 wurde β -Cembrenndiol (**5**) erstmals als nicht-kompetitiver Inhibitor von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (AChR) beschrieben.¹³⁵ Es konnte die Hemmung der Agonist-induzierten Ionenströme von humanen neuronalen $\alpha 4\beta 2$ AChR (**5**: $IC_{50} = 19 \mu\text{M}$), von humanen ganglionären $\alpha 3\beta 4$ AChR (**5**: $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$) und von humanen embryonalen muskulären $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ AChR beobachtet werden.¹³⁵ Ebenso konnte die Hemmung von Nikotin-induzierten Strömen in neuronalen nikotinischen $\alpha 4\beta 2$ AChR aus Ratten gezeigt werden.¹³⁷ Aus der Interaktion von **5** mit Acetylcholinrezeptoren resultiert das Potential als neuroprotektiver Wirkstoff eingesetzt werden zu können. Anhand von Hippocampus-Schnitten konnte die neuroprotektive Wirkung von β -Cembrenndiol (**5**) gegen eine durch *N*-Methyl-D-aspartat induzierte Excitotoxizität⁸¹ sowie gegen die Neurotoxizität von Phosphorsäureestern wie Paraoxon⁸² oder Diisopropylfluorophosphat^{138,139} gezeigt werden. Eine *in-vivo*-Studie an Ratten bestätigte, dass **5** zur Vorbeugung von neuronalen Schäden eingesetzt werden kann, die durch das Nervengift Diisopropylfluorophosphat ausgelöst werden.⁸³ Mögliche Anwendungen von **5** zur Behandlung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen,¹⁴⁰ HIV-Infektionen und HIV-assoziierter

neurokognitiver Erkrankungen ist untersucht worden.⁸⁴ Weiterhin konnte kürzlich an Nagetieren die neuroprotektive Wirkung von **5** bei ischämischen Schlaganfällen nachgewiesen werden.¹⁴¹

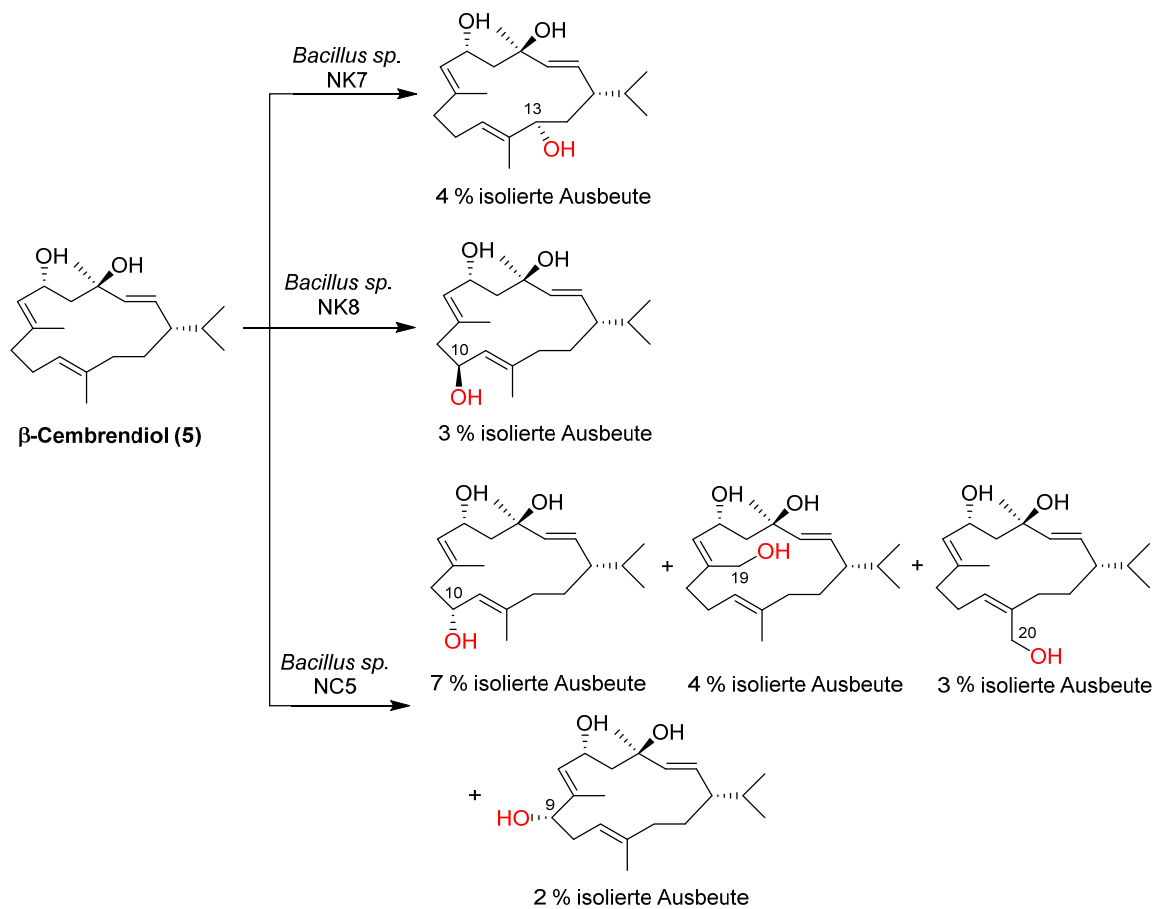
Aufgrund der vielfältigen biologischen Aktivitäten von β -Cembreniol (**5**) und dessen Potential als pharmakologischer Wirkstoff eingesetzt zu werden,¹⁴² sind bereits Studien über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Cembreniol-Analoga durchgeführt worden.^{77,132,133,138,143,144} In allen Studien sind Cembreniol-Analoga untersucht worden, die unter anderem über Oxidationsreaktionen zur Generierung von Alkohol-, Keto- oder Epoxygruppen oder über Acetylierungen hergestellt worden sind. Neben dem Einsatz chemischer Methoden^{60,143,144} sind Biotransformationen für die Synthese von oxidierten Cembreniol-Analoga angewendet worden, die im Folgenden beschrieben werden.

Die ersten Biotransformationen mit β -Cembreniol (**5**) sind im Jahre 1987 in zwei japanischen Patenten veröffentlicht worden.^{145,146} Mit Kulturen von *Bacillus megaterium* NH5 konnten die an Position C-10 bzw. C-20 hydroxylierten Cembreniole produziert werden. Damaliges Ziel war es, Cembreniol-Analoga für einen verbesserten Tabakgeschmack und -geruch sowie weniger reizenden Wirkungen herzustellen.¹⁴⁷ Weiterhin wurde von einer Biotransformation mit pflanzlichen Zellkulturen von *Tripterygium wilfordii* berichtet, mit der innerhalb von 72 h das an der C-11/C-12-Doppelbindung epoxidierte Produkt mit einer (11*S*,12*S*)-Konfiguration hergestellt und mit einer guten Ausbeute von 54 % isoliert werden konnte (Schema 4).¹⁴⁸ Wenngleich die Bildung weiterer Produkte beobachtet wurde, konnten diese weder isoliert noch charakterisiert werden.¹⁴⁸



Schema 4. Biotransformation von β -Cembreniol (**5**) mit pflanzlichen Zellkulturen von *Tripterygium wilfordii*.¹⁴⁸

In einer späteren Studie aus dem Jahr 2008 wurde versucht, β -Cembreniol (**5**) mit Kulturen verschiedener mariner Bakterien zu oxidieren. Die Bakterien *Bacillus sp.* NK7, NK8 und NC5 sind zuvor als symbiotische Lebewesen des im Roten Meer vorkommenden toxischen (roten) Fingerschwamms *Negombata magnifica* isoliert worden. Biotransformationen von **5** mit Kulturen dieser symbiotischen Bakterien resultierten nach 14 Tagen in verschiedenen hydroxylierten Produkten mit isolierten Ausbeuten von 2-7 % (Schema 5). Mit den Kulturen von *Bacillus sp.* NK7 und NK8 konnte jeweils nur ein Produkt, mit einer in (*R*)-Konfiguration eingeführten Hydroxygruppen an Position C-13 bzw. in (*S*)-Konfiguration eingeführten Hydroxygruppe an Position C-10, isoliert werden. Mit der Biotransformation unter Verwendung von *Bacillus sp.* NC5 konnten dagegen vier an den Positionen C-9, C-10, C-19 und C-20 hydroxylierte Produkte gefunden werden, wobei die Alkoholgruppe an Position C-9 (*S*)-konfiguriert und die an Position C-10 (*R*)-konfiguriert vorlagen.¹³³



Schema 5. Biotransformation von β -Cembrenol (5) mit bakteriellen Kulturen von *Bacillus sp.* NK7, NK8 und NC5.¹³³

Neben Biotransformationen von β -Cembrenol (5) sind auch Biotransformationen von α -Cembrenol bekannt. Dabei sind zusätzlich zu den pflanzlichen Zellkulturen von *Tripterygium wilfordii*¹⁴⁸ und *Nicotiana sylvestris*¹⁴⁹ sind auch pilzliche Kulturen von *Mucor ramannianus* ATCC9628¹⁴⁴ und *Cunninghamella elegans* ATCC7929¹⁴⁴ verwendet worden. Es wurden sowohl epoxidierte als auch hydroxylierte Produkte von α -Cembrenol gefunden.

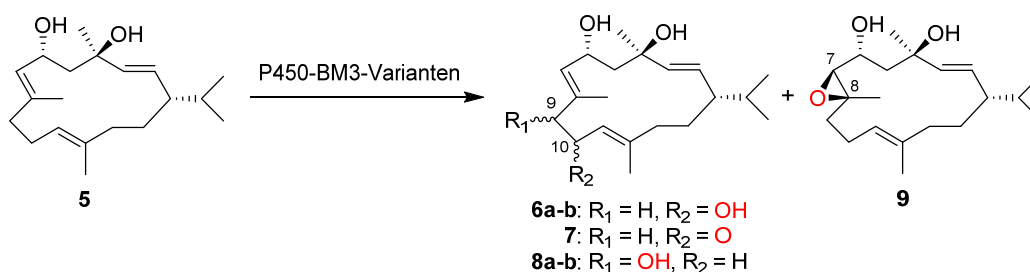
Ziel des im Folgenden dargestellten Teilprojektes war es, die P450-BM3-katalysierte Oxidation von β -Cembrenol (5) hinsichtlich ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität zu optimieren. Neben der Erstellung und Charakterisierung von verbesserten P450-BM3-Varianten sollten die gebildeten Oxidationsprodukte identifiziert und chemisch analysiert werden.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 P450-BM3-katalysierte β -Cembreniol-Oxidation

Im vorliegenden Projekt wurde eine Optimierung von P450-BM3 für die Oxidation von β -Cembreniol (**5**) schrittweise durchgeführt. Zunächst sollte die Aktivität und anschließend die Chemo- und Regioselektivität der P450-BM3-katalysierten Oxidation von **5** verbessert werden. Anschließend folgte die Untersuchung der regioselektivsten P450-BM3-Mutanten hinsichtlich ihrer Stereoselektivität.

Da der P450-BM3-Wildtyp β -Cembreniol (**5**) zu weniger als 2 % umsetzte, wurde vermutet, dass der Aminosäurerest F87 den Zugang von **5** zum Hämeisen verhindert. Aufgrund der Lokalisation über dem Porphyrinring (Abbildung 15) ist F87 die am häufigsten mutierte Aminosäure in P450-BM3.⁴² Die Substitution dieses Aminosäurerestes gegen kleinere Aminosäurereste generiert zusätzlichen Raum in der Substratbindetasche (Abbildung 16A-C) und ermöglicht somit die Oxidation von sterisch anspruchsvollen Substraten.⁴² Im vorliegenden Projekt sollte in der ersten P450-BM3-Mutantengeneration F87 durch kleinere und hydrophobere Aminosäuren ersetzt werden. Die Insertion von Leucin oder Valin an Position 87 führte zu keiner im Vergleich zum Wildtyp verbesserten Aktivität. Jedoch wurde für Varianten mit kleineren Aminosäuren (Alanin oder Glycin) an dieser Position ein 3 bis 30-fach verbesserter Umsatz beobachtet (Tabelle 5, Generation I). Während die P450-BM3-Mutante F87A β -Cembreniol (**5**) nur zu 6 % umsetzte, oxidierte die P450-BM3-Mutante F87G **5** zu 59 % (wie schon in Kapitel 2.2.2 unter anderen Reaktionsbedingungen beobachtet). Bei der von der P450-BM3-Mutante F87A katalysierten Oxidation wurde **5** zu den zwei Produkten 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) und 7,8-Epoxy- β -cembreniol (**9**) in einem Verhältnis von 78:22 (Schema 6) oxidiert. β -Cembreniol (**5**) wurde somit an der Position C-9 sowie der benachbarten C-7/C-8-Doppelbindung oxidiert. Die von der P450-BM3-Mutante F87G katalysierte Oxidation von **5** verlief weniger chemo- und regioselektiv und ergab mehr als fünf Produkte. Hierbei wurde **5** zu beiden epimeren Hydroxylierungsprodukten an Position C-10 (**6a-b**), dem Epoxid **9** und dem Produkt **8a** in einem Verhältnis von 38:21:13:8 oxidiert. Zusätzlich wurden zu 19 % andere Produkte wie z.B. das Enon **7** gebildet. Um die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität weiter zu verbessern, wurden die P450-BM3-Einfachmutanten F87G und F87A als Ausgangsmutanten für weitere Aminosäuresubstitutionen gewählt.



Schema 6. P450-BM3-katalysierte Oxidation von β -Cembreniol (5**).** Es wurden die Produkte 9-OH- β -Cembrentriol (**8a-b**), 10-OH- β -Cembrentriol (**6a-b**), β -Cembreniol-10-on (**7**) und 7,8-Epoxy- β -cembreniol (**9**) gebildet. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

3.2.2 Generierung einer Kollektion von P450-BM3-Varianten

In der zweiten und dritten P450-BM3-Mutantengeneration wurden weitere Aminosäuresubstitutionen eingeführt, die bereits für die Oxidation von großen, nicht-physiologischen Substraten, wie Alkaloiden,⁵⁶ Thioglykosiden,⁵⁶ polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen,⁵⁴ Sesquiterpenoiden^{52,53} oder Steroiden,⁵⁸ verwendet worden sind. Unter den bekannten Mutationen wurden diejenigen Aminosäuren ausgesucht, die einen möglichst unmittelbaren Kontakt zum Substrat aufweisen und auch als Aminosäuren der ersten Sphäre bezeichnet werden.⁵³ Alle gewählten Aminosäuren (A74, L75, V78, I263, A264 und L437) befinden sich in einem Abstand von weniger als 15 Å zum Hämeisen (Abbildung 15). Während sich die Aminosäuren A74, L75, V78 in der ersten Substraterkennungsstelle befinden, sind die Aminosäuren I263 und A264 in der vierten und L437 in der sechsten lokalisiert. Von Mutationen aller genannten Aminosäuren wurde angenommen, dass sie das Substrat β -Cembreniol (**5**) im aktiven Zentrum in eine bestimmte Orientierung dirigieren und damit die Regio- und Stereoselektivität des Enzyms beeinflussen.

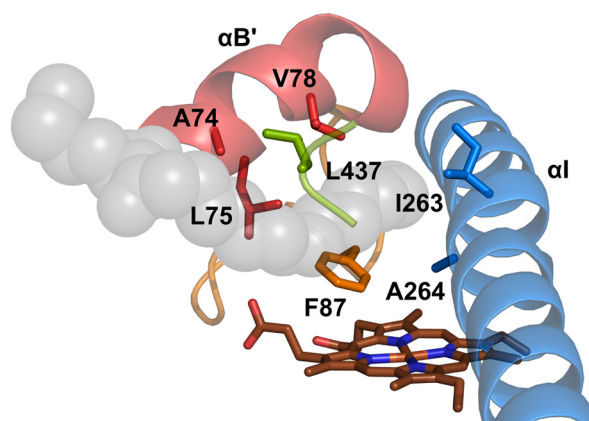


Abbildung 15. Substratbindetasche von P450-BM3 aus *Bacillus megaterium* (PDB-Code: 1ZO9).³⁸ Die gezeigte P450-BM3-Struktur basiert auf einer Kokristallisation mit dem Substrat *N*-Palmitoylmethionin (graue Kugeln). Die Hämgruppe (braun) sowie ausgewählte Aminosäuren sind als Stäbe dargestellt. Die B'-Helix ist in rot, die I-Helix in blau, der B'-C-Loop in orange und der β 4.1- β 4.2-Loop in grün gekennzeichnet.

Es wurde eine P450-BM3-Kollektion aus drei Generationen erstellt, bei der in jeder Generation eine neue Aminosäuresubstitution eingeführt wurde. Für jede Mutante wurden der Substratumsatz sowie die Produktverteilung analysiert. Von 29 generierten P450-BM3-Mutanten zeigten zehn Zwei- bis Dreifachmutanten mit Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 75, 78 und in einem Fall an Position 263 im Vergleich zu den Ausgangsmutanten F87A und F87G eine signifikante Verbesserung des Umsatzes und der Selektivität (Tabelle 5). Mit Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 74, 264 und 437 konnte keine diesbezügliche Verbesserung festgestellt werden (Tabelle 5). Aufgrund der Identifikation von zehn optimierten P450-BM3-Mutanten wurde keine weitere Enzymmutagenese durchgeführt.

3.2.3 Screening nach chemo-, regio- und stereoselektiven P450-BM3-Varianten

Das Screening der P450-BM3-Kollektion ermöglichte (neben der Identifikation von F87) die Identifikation von zwei zusätzlichen Aminosäureresten (L75 und V78), die von entscheidender Bedeutung für die Oxidation von β -Cembrenndiol (**5**) sind. Beide Reste liegen in der B'-Helix oberhalb des Porphyrinrings und gehören zur ersten Substraterkennungsstelle. Es konnte gezeigt werden, dass mit Alaninsubstitutionen an diesen beiden Positionen (und in einem Fall einer Serinsubstitution an Position 75) eine hinsichtlich des Umsatzes (und ggf. der Selektivität) verbesserte Oxidation von **5** erzielt werden kann (Tabelle 5).

In der F87A-basierten zweiten Generation konnte mit einer Alaninsubstitution an Position 78 (Abbildung 16D) der Umsatz von **5** nahezu um das Achtfache erhöht werden, obgleich die Regioselektivität mit fünf gebildeten Produkten abnahm (Tabelle 5, Generation IIa). Die resultierende P450-BM3-Mutante V78A/F87A produzierte hauptsächlich das 9-OH- β -Cembrentriol (**8b**) (45 %), das zu dem Produkt **8a** (8 %) (welches von der Ausgangsmutante F87A gebildet wurde) eine gegensätzliche Konfiguration an C-9 aufweist. Neben den Produkten **8a-b** katalysierte die P450-BM3-Mutante V78A/F87A die Herstellung des 7,8-Epoxy- β -cembrenndiols (**9**, 38 %) sowie der 10-OH- β -Cembrentrirole (**6a-b**, 10 % in Summe) her (Abbildung 17A).

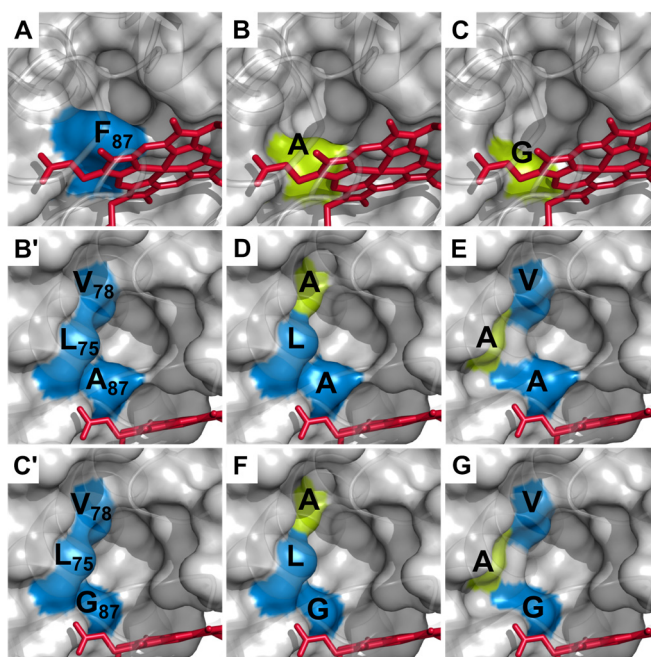


Abbildung 16. Form der Substratbindetasche verschiedener P450-BM3-Varianten oberhalb der Hämgruppe (rot). Die linke Spalte zeigt die jeweiligen Ausgangsenzyme, wobei die Aminosäuren F87, V78 und L75 in blau markiert sind. In der mittleren und rechten Spalte sind die jeweils neu eingeführten Aminosäurereste in grün visualisiert. Die obere Reihe zeigt die Unterschiede in der Substratbindetasche zwischen dem Wildtyp (A) und den Einfachmutanten F87A (B) und F87G (C). Während die mittlere Reihe die Unterschiede der Substratbindetasche zwischen den Zweifachmutanten V78A/F87A (D) und L75A/F87A (E) im Vergleich zur Ausgangsmutante F87A (B') zeigt, sind in der unteren Reihe die Unterschiede zwischen den Zweifachmutanten V78A/F87G (F) und L75A/F87G (G) im Vergleich zur Ausgangsmutante F87G (C') dargestellt. Die Felder B und B' sowie C und C' zeigen unterschiedliche Perspektiven der Mutante F87A bzw. F87G. Die Strukturmodelle basieren auf der P450-BM3-Kristallstruktur (PDB-Code: 1ZO9)³⁸ und sind mit Hilfe von PyMOL 0.99rc6. generiert worden. Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Tabelle 5. Umsatz (Ums.) und Produktverteilung von β -Cembrenol-Oxidationen verschiedener P450-BM3-Mutanten. Die Experimente wurden mit zellfreiem *E.-coli*-Extrakt (2,5 μ M finale P450-Konzentration) durchgeführt. ^aDie Umsätze sind relativ zu denen der Ausgangsmutante (die auf 1,0 normalisiert wurden) als n-fache Verbesserung angegeben. Einige Mutanten zeigten keine Aktivität (n.a.). Mutanten, die eine signifikante Verbesserung hinsichtlich des Umsatzes sowie der Selektivität gegenüber der Ausgangsmutante zeigen, sind mit einem Stern (*) markiert. Die im Text beschriebenen Mutanten und ihre dazugehörigen Werte sind fett gedruckt. [#]Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet worden. Abweichungen, bei denen die Summe aller Produkte ungleich 100 % ist, sind auf Rundungen zurückzuführen. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Generation	Eltern-mutante	zusätzliche Aminosäure-substitution	n-fache Verbesserung des Umsatzes gegenüber der Ausgangsmutante ^a (abs. Ums.(%))	Produktverteilung (%)						andere Produkte
				C-10		C-9		C-7/C-8	9	
				6a	6b	7	8a	8b		
I	WT	F87L	n.a.	-	-	-	-	-	-	-
		F87V	n.a.	-	-	-	-	-	-	-
		F87A[#]	3,00 (6 \pm 4)	-	-	-	78	-	22	-
		F87G[#]	29,50 (59 \pm 2)	39	21	2	8	-	13	17
IIa	F87A	-	1,00	-	-	-	78	-	22	-
	F87A	A74G	1,00	12	12	-	31	-	45	-
	F87A	L75A^{*#}	10,67 (64 \pm 8)	36	59	4	-	-	-	-
	F87A	V78G ^{*#}	4,67	16	7	-	-	56	21	-
	F87A	V78A^{*#}	7,83 (47 \pm 8)	7	3	-	8	45	38	-
	F87A	I263A	< 1,00	-	-	-	80	-	-	20
	F87A	I263L^{*#}	2,83 (17 \pm 1)	-	-	-	92	8	-	-
	F87A	A264G	1,43	-	40	-	35	-	25	-
	F87A	A264V	< 1,00	-	-	-	-	-	-	100
	F87A	L437A	< 1,00	10	-	-	32	11	39	7
IIIa	F87A V78A	-	1,00	7	3	-	8	45	38	-
	F87A V78A	L75A^{*#}	1,94 (91 \pm 2)	38	34	4	-	4	3	17
	F87A V78A	I263G [#]	1,04	7	14	-	15	21	21	22
	F87A V78A	A264V [#]	< 1,00	-	-	-	49	23	28	-
IIb	F87G	-	1,00	39	21	2	8	-	13	17
	F87G	A264V [#]	< 1,00	77	7	-	16	-	-	-
	F87G	L75A^{*#}	1,64 (97 \pm 4)	40	24	27	-	-	-	9
	F87G	L75S^{*#}	1,32 (78 \pm 8)	42	35	18	-	-	-	6
	F87G	V78G ^{*#}	1,05	62	27	11	-	-	-	-
	F87G	V78A^{*#}	1,14 (67 \pm 6)	52	27	12	-	-	3	6
IIIb	F87G V78A	-	1,00	52	27	12	-	-	3	6
	F87G V78A	L75A^{*#}	1,09 (73 \pm 5)	59	15	22	-	-	-	3
	F87G V78A	I263A	< 1,00	59	34	4	3	-	-	-
	F87G V78A	I263F	< 1,00	58	28	-	-	-	12	2
	F87G V78A	A264G	< 1,00	47	23	4	-	-	15	11
	F87G V78A	A264V [#]	< 1,00	85	15	-	-	-	-	-
	F87G V78A	L437A	< 1,00	50	32	18	-	-	-	-
	F87G V78A	L437F	< 1,00	48	28	7	-	4	8	5
	F87G V78A	L437N	< 1,00	56	33	10	-	-	-	-

Die Einführung von Alanin an Position 75 (anstatt Position 78) in die Einfachmutante F87A (Abbildung 16E) erhöhte den Umsatz von **5** um mehr als das Zehnfache und führte zu einer 100 %igen Regioselektivität für die Oxidation an Position C-10 (wobei die Ausgangsmutante F87A und die Zweifachmutante V78A/F87A **5** überwiegend an den Position C-7, C-8 und C-9 oxidierten). In der F87A-basierten dritten Generation führte das Hinzufügen einer weiteren Mutation (V78A) in die P450-BM3 Zweifachmutante L75A/F87A zu einer weiteren Erhöhung der Aktivität (91 % Umsatz von **5**), obgleich die Selektivität für die Position C-10 abnahm (76 %) (Tabelle 5, Generation IIIa).

In der F87G-basierten zweiten Generation erhöhte eine Alaninsubstitution an Position 78 (Abbildung 16F) den Umsatz von **5** nur um den Faktor 1,14 (67 % Umsatz), verbesserte die Regioselektivität aber entscheidend (Tabelle 5, Generation IIb). Während die Ausgangsmutante F87G die Oxidationsprodukte der Position C-10 (**2a-b** und **3**) nur zu 62 % herstellte, konnte die P450-BM3-Mutante V78A/F87G diese zu 91 % produzieren. Die Insertion eines Alanins an Position 75 (anstatt Position 78) in die Einfachmutante F87G (Abbildung 16G) führte zum höchsten Umsatz von **5** (97 %), wobei die Regioselektivität für die Position C-10 vollständig erhalten blieb (91 %) (Abbildung 17B). Vergleichbare Ergebnisse konnten mit der P450-BM3-Mutante L75S/F87G und mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G der dritten Generation erzielt werden, obgleich die Umsätze geringer waren (73-78 %).

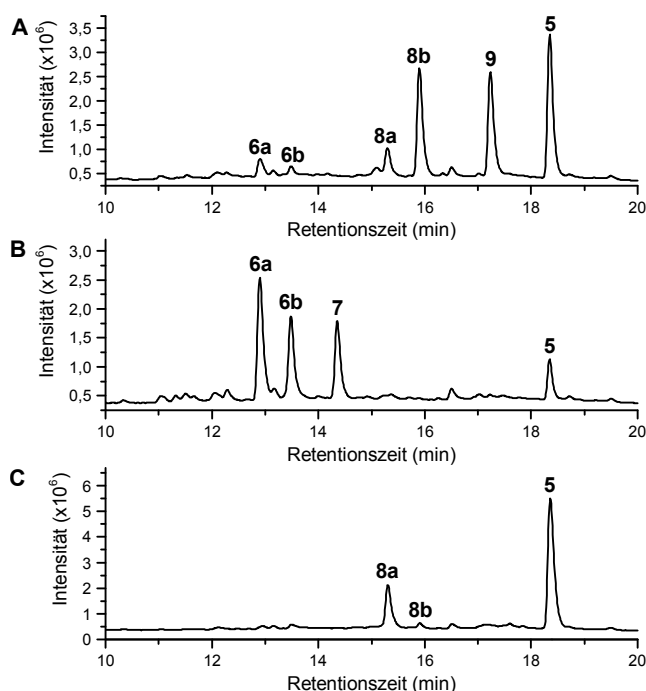


Abbildung 17. LC/MS-Chromatogramme der Oxidationen von β -Cembreniol (**5**), die von den P450-BM3-Mutanten V78A/F87A (A), L75A/F87G (B) und F87A/I263L (C) katalysiert wurden. Mit der Oxidation von **5** konnten die epimeren 10-OH- β -Cembrentrirole (**6a-b**), das Enon (**7**), die epimeren 9-OH- β -Cembrentrirole (**8a-b**) und das 7,8-Epoxy- β -cembreniol (**9**) generiert werden. Das Produkt **6a** wurde bei einer Retentionszeit von 13,0 min, **6b** bei 13,5 min, **7** bei 14,4 min, **8a** bei 15,5 min, **8b** bei 16,0 min, **9** bei 17,3 min und das Substrat **5** bei 18,4 min detektiert. Die Intensität ist als Totalionenstrom des positiven Ionisierungsmodus angegeben. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Mit einer Aminosäuresubstitution in der I-Helix an Position 263 von Isoleucin zu Leucin konnte in der F87A-basierten zweiten Generation die Produktivität hinsichtlich des 9-OH- β -Cembrentriols **8a** gesteigert werden. Während die P450-BM3 Einfachmutante F87A β -Cembrendiol (**5**) nur zu 6 % umsetzte, konnte die P450-BM3-Mutante F87A/I263L **5** mit nahezu dreifach höherer Aktivität (17 %) und verbesserter Chemo- und Regioselektivität umsetzen (Tabelle 5, Generation IIa). Während die Ausgangsmutante F87A neben den 9-OH- β -Cembrentriolen **8a-b** auch das Epoxid **9** (22 %) herstellte, produzierte die P450-BM3-Mutante F87A/I263L einzig die 9-OH- β -Cembrentriole **8a-b** (Abbildung 17C).

3.2.4 Untersuchung der Stereoselektivität

Die generierten P450-BM3-Mutanten mit der höchsten Regioselektivität wurden hinsichtlich ihrer Stereoselektivität genauer untersucht. Im Gegensatz zu den Screeningexperimenten wurde hier gereinigtes Enzym verwendet, sodass eine Oxidation der Alkoholgruppen zu Ketogruppen von *E.-coli*-eigenen Proteinen ausgeschlossen werden konnte. Die Diastereomerenverhältnisse der epimeren 9-OH- β -Cembrentriole (**8a-b**) und 10-OH- β -Cembrentriole (**6a-b**) wurden anhand ihrer Peakflächen bestimmt.

Unter den P450-BM3-Mutanten, die die 9-OH- β -Cembrentriole (**8a-b**) produzierten, stellte die Mutante F87A/I263L hauptsächlich das Epimer **8a** her (dr (**8a:8b**) = 89:11), während die Mutante V78A/F87A bevorzugt das entgegengesetzte Epimer **8b** bildete (dr (**8a:8b**) = 21:79) (Tabelle 6).

Tabelle 6. Diastereomerenverhältnis (dr) der epimeren 9-OH- (8a-b**) und 10-OH- β -Cembrentriole (**6a-b**) nach 0,5 h und 24 h Reaktionszeit.** Die Werte basieren auf zwei unterschiedlichen Experimenten. Es wurde gereinigtes Enzym (1 μ M) verwendet. n.b. = nicht bestimmt. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Aminosäure-substitution				dr		Diastereomere
L75	V78	F87	I263	0,5 h	24 h	
		A	L	89:11	n.b.	8a:8b
	A	A		21:79	n.b.	8a:8b
A		G		51:49	61:39	6a:6b
S		G		46:54	49:51	6a:6b
A	A	G		65:35	74:26	6a:6b

Die Stereoselektivität der 10-OH- β -Cembrentriole (**6a-b**) produzierenden P450-BM3-Mutanten wurde zeitabhängig (0,5-24 h) analysiert. Die Mutante L75S/F87G produzierte die Alkohole **6a-b** unabhängig von der Reaktionsdauer nicht stereoselektiv (0,5 h: dr (**6a:6b**) = 46:54; 24 h: dr (**6a:6b**) = 49:51). Ebenso konnte bei der Mutante L75A/F87G nach 0,5 h keine Stereoselektivität nachgewiesen werden (dr (**6a:6b**) = 51:49). Die Analyse über 24 h zeigte jedoch, dass sich im Verlauf der Reaktion das Diastereomerenverhältnis zu Gunsten des 10-OH- β -Cembrentriols **6a** ändert (dr (**6a:6b**) = 61:39), da der Alkohol **6b** zum korrespondierenden Enon **7** oxidiert wurde (Abbildung 18A). Eine vergleichbare stereospezifische Alkoholoxidation konnte mit der P450-BM3-Dreifachmutante L75A/V78A/F87G beobachtet werden (Abbildung 18B), obgleich schon beim ersten untersuchten

Zeitpunkt eine Stereopräferenz für den Alkohol **6a** vorlag (0,5 h: dr (**6a:6b**) = 65:35; 24 h: dr (**6a:6b**) = 74:26).

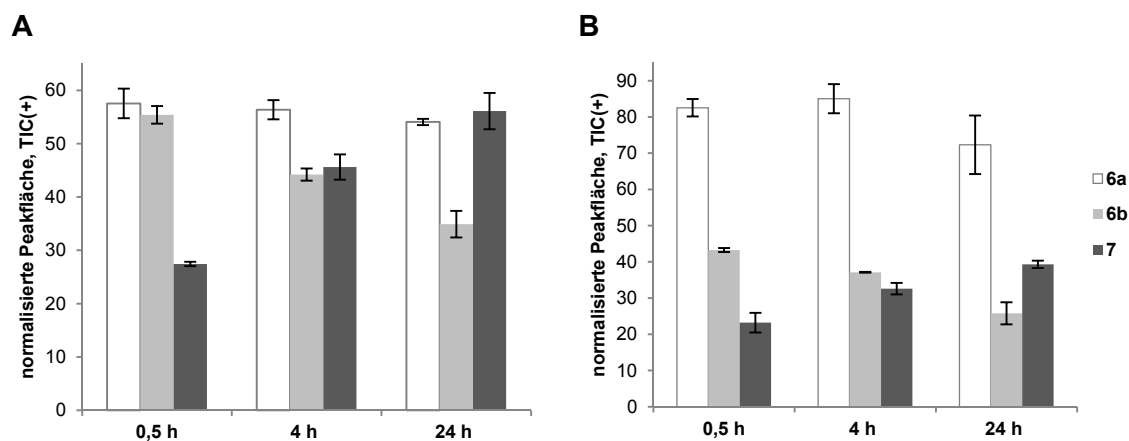
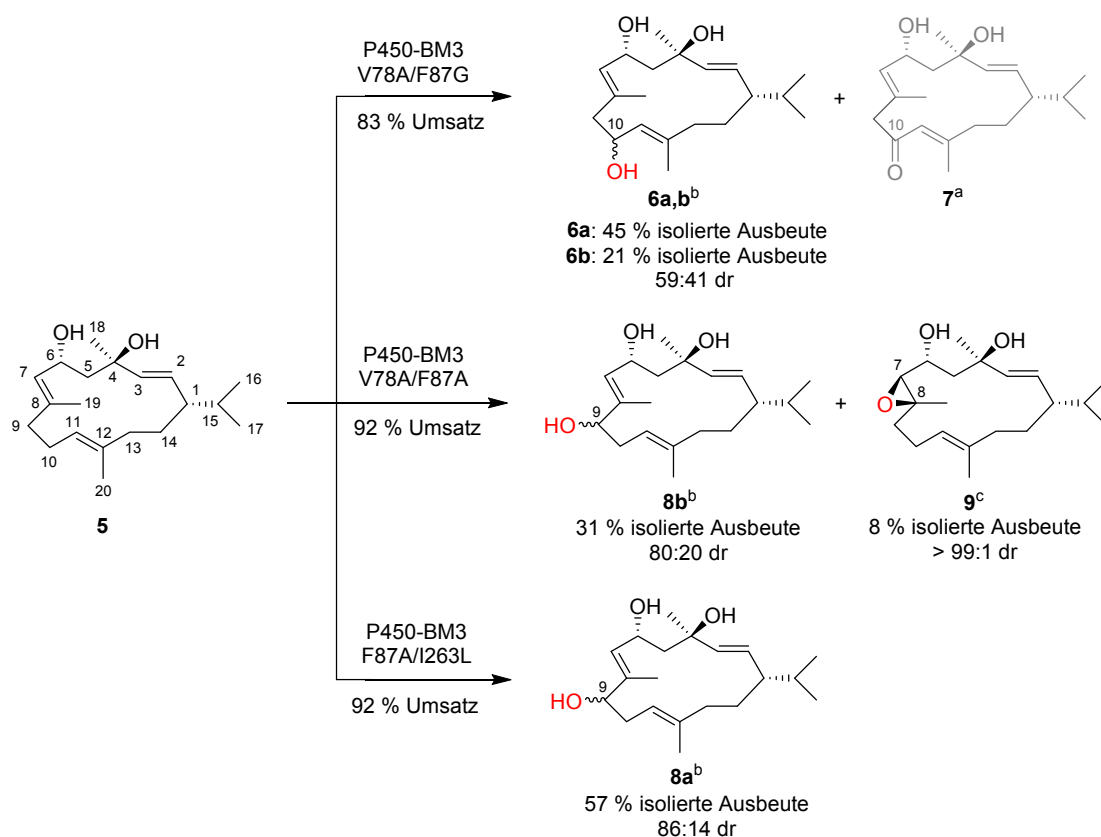


Abbildung 18. Zeitabhängige Bildung der 10-OH- β -Cembrentrirole (**6a-b**) und des β -Cembrenliol-10-on (**7**) im Verlauf einer von den P450-BM3-Mutanten L75A/F87G (A) und L75A/V78A/F87G (B) katalysierten β -Cembrenliol-Oxidation. Die detektierten Peakflächen sind in Relation zum internen Standard als normalisierte Peakfläche angegeben. Die zugehörigen Diastereomerenverhältnisse der 0,5 h und 24 h Proben sind in Tabelle 6 gezeigt. Es wurde gereinigtes Enzym (1 μ M) verwendet. Mittelwerte und mittlere absolute Abweichungen sind aus zwei unterschiedlichen Experimenten berechnet worden. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

3.2.5 Isolierung und Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte

Die P450-BM3-katalysierte Oxidation von β -Cembrenliol (**5**) wurde mit drei verschiedenen Mutanten im präparativen Maßstab durchgeführt. Die präparativen Reaktionen wurden im Gegensatz zu den Screeningexperimenten mit gereinigten Enzymen und unter ständiger Durchmischung durchgeführt, wobei Ausbeuten von über 83 % erzielt wurden (Schema 7). Die P450-BM3-Mutante V78A/F87G oxidierte **5** zu den Produkten **6a** (45 % isolierte Ausbeute) und **6b** (21 % isolierte Ausbeute), während die P450-BM3-Mutante V78A/F87A **5** zu den Produkten **9** (8 % isolierte Ausbeute) und **8b** (31 % isolierte Ausbeute) oxidierte. Mit der P450-BM3-Mutante F87A/I263L wurde nach Oxidation von **5** das Produkt **8a** (57 % isolierte Ausbeute) erhalten.

Nach Isolation der Oxidationsprodukte mittels semipräparativer HPLC, konnten die Strukturen von **6a-b**, **8a-b** und **9** mittels NMR-Spektroskopie und hochauflösender Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale wurde durch 2D-NMR-Analysen (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC) ermöglicht (Kapitel 7.6.1-7.6.6 und Kapitel 9.5.1-9.5.6). Die Auswertung der NMR-Analysen erfolgte dabei in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie (Prof. Dr. S. Laschat, Universität Stuttgart) von T. Heidt und Dr. B. Claasen.



Schema 7. P450-BM3-katalysierte Oxidation von β -Cembrenliol (5**) im präparativen Maßstab.** Zur Bestimmung der Umsätze und der Diastereomerenverhältnisse (dr) wurde das Rohprodukt per LC/MS analysiert. Die Berechnung der Umsatzwerte basiert auf dem Verhältnis aller Produktsignale zu der Summe aus Substrat- und Produktsignalen. Es sind alle Produkte mit einem Anteil von über 13 % gezeigt. ^aDie in grau dargestellte Struktur wurde aufgrund von MS-Analysen angenommen. Alle anderen gezeigten Strukturen sind über 1D- und 2D-NMR-Analysen bestimmt worden. ^bDie Konfiguration der neu eingeführten Stereozentren in den Epimeren **6a-b** wurde nicht bestimmt. ^cDas (7*R*,8*R*)-Stereoisomer von **9** konnte nicht detektiert werden. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Während das Substrat **5** im ¹H-NMR zwischen 4,1 und 5,6 ppm fünf Signale zeigte, konnten bei den Produkten **6a-b** und **8a-b** im genannten Bereich sechs Signale detektiert werden, die den olefinischen Protonen (H-2, H-3, H-7 und H-11) und den zu einer Alkoholgruppe benachbarten Protonen (H-6 und dem zur neu eingeführten Alkoholgruppe benachbartem Proton) zugeordnet werden konnte (Abbildung 19). Im Fall eines hydroxylierten Produktes kann im ¹H-¹H-COSY-Spektrum über das Korrelationssignal des Protons in direkter Nachbarschaft zur neu eingeführten Alkoholgruppe die Position bestimmt werden, an der **5** hydroxyliert wurde. Eine neue Hydroxygruppe an Position C-10 (**6a-b**) führte im Bereich zwischen 4,1 und 5,6 ppm zu drei Korrelationssignalen aus je zwei Protonen (H-2/H-3, H-6/H-7 und H-10/H-11). Das zur neu eingeführten Alkoholgruppe benachbarte Proton musste somit in direkter Nachbarschaft zum olefinischen Proton H-11 an Position C-10 liegen. Im Fall einer Hydroxygruppe an Position C-9 (**8a-b**) zeigten sowohl das Proton H-11 als auch das zur neu eingeführten Hydroxygruppe benachbarte Proton H-9 COSY-Korrelationssignale zu den Methylenprotonen H-10_{a,b} bei 2,2-2,4 ppm. Die Produkte **6a-b** konnten somit als die epimeren (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triole mit unterschiedlichen absoluten

Konfigurationen an Position C-10^{138,151} und die Produkte **8a-b** als die epimeren (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triole mit unterschiedlichen absoluten Konfigurationen an Position C-9¹³³ identifiziert werden.

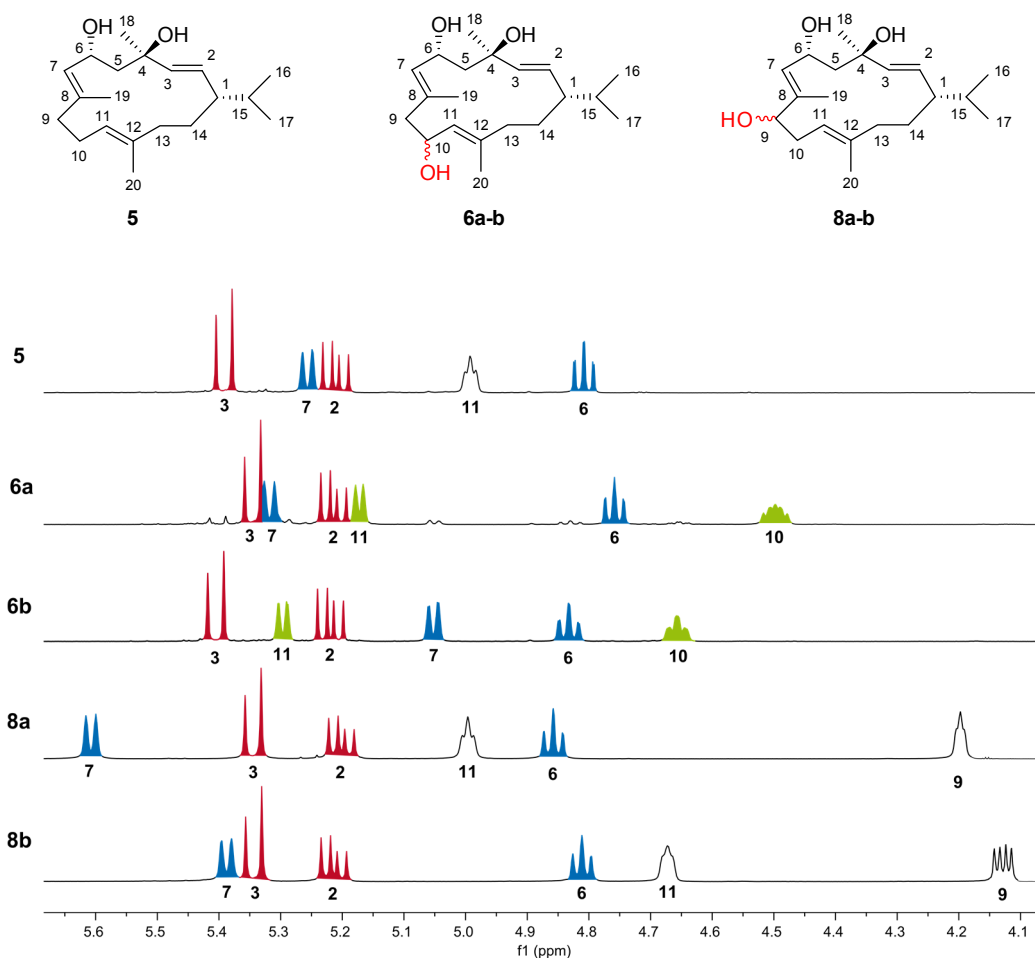


Abbildung 19. ^1H -NMR-Spektren von β -Cembrenol (**5**), 10-OH- β -Cembrenol (**6a-b**) und 9-OH- β -Cembrenol (**8a-b**) im Bereich von 4,1-5,6 ppm. Unter den Signalen ist die Zuordnung zu den Protonen mittels ihrer Atomnummer aufgeführt. Korrelationssignale, die im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum detektiert wurden sind jeweils farbig dargestellt. Die ^1H -NMR-Spektren wurde in CDCl_3 bei 600 MHz aufgenommen. Die vollständigen NMR-Daten von **5**, **6a-b** und **8a-b** sind in den Kapiteln 7.6.1-7.6.5 aufgeführt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

Im Gegensatz zu den Produkten **6** und **8** zeigte das Oxidationsprodukt **9** im ^1H -NMR zwischen 4,0 und 5,6 ppm nur vier Signale (eines weniger als das Substrat **5**) (Abbildung 20). Eine Epoxidierung muss somit zum Verlust eines olefinischen Signals geführt haben. Das Methinsignal bei 2,83 ppm wurde dem neu epoxidierten C-7 Atom zugeordnet und zeigte eine vicinale Kopplung zum Proton H-6 ($^3J_{6,7} = 8,0$ Hz). In Übereinstimmung zur Literatur konnte die absolute Konfiguration des Epoxids als (7*S*,8*S*) beschrieben werden und das Produkt **9** als (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*S*,8*S*,11*E*)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol identifiziert werden.¹⁵²

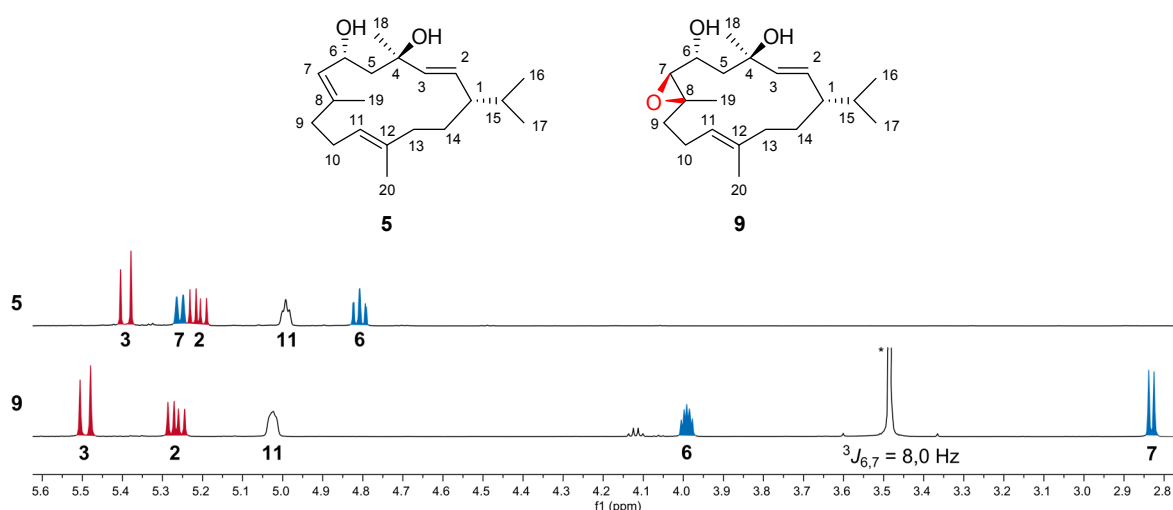


Abbildung 20. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von β -Cembrendiol (**5**) und 7,8-Epoxy- β -cembrendiol (**9**) im Bereich von 4,1-5,6 ppm. Unter den Signalen ist die Zuordnung zu den Protonen mittels ihrer Atomnummer aufgeführt. Korrelationssignale, die im $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektrum detektiert wurden sind jeweils farbig dargestellt. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurde in CDCl_3 bei 600 MHz aufgenommen. Signale, die auf Lösungsmittel zurückzuführen sind, wurden mit einem Stern (*) markiert. Die vollständigen NMR-Daten von **5** und **9** sind in den Kapiteln 7.6.1 und 7.6.6 aufgeführt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

Produkt **7** wurde per hochauflösende Massenspektrometrie (ESI) analysiert. Es konnte ein Molekülionenpeak von 343,2243 (berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z : 343,2244) detektiert werden. Es wurde daher angenommen, dass Produkt **7** das (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol-10-on darstellt.

3.2.6 Charakterisierung der P450-BM3-Biokatalysatoren

Die P450-BM3-Mutanten mit der höchsten Selektivität und Aktivität für jedes der Produkte wurden hinsichtlich ihrer Kopplungseffizienz und Substratoxidationsrate analysiert (Tabelle 7). Die Kopplungseffizienz ist als das Verhältnis zwischen der Stoffmenge des verbrauchten Substrates und der Stoffmenge des verbrauchten NADPHs bestimmt worden.

Tabelle 7. Katalytische Eigenschaften P450-BM3-Varianten, die β -Cembrendiol hydroxylieren. ^aVerhältnis zwischen der Stoffmenge des verbrauchten Substrates und der Stoffmenge des verbrauchten NADPHs. ^bStoffmenge des verbrauchten Substrates pro Stoffmenge der eingesetzten P450 pro Minute. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Aminosäuresubstitution				Kopplungseffizienz ^a (%)	Substratoxidationsrate ^b (min^{-1})
L75	V78	F87	I263		
		A	L	23 ± 1	$1,2 \pm 0,0$
		A	A	27 ± 2	$4,4 \pm 0,2$
	A	G		41 ± 2	$22,7 \pm 1,4$
	S	G		37 ± 4	$5,7 \pm 0,7$
	A	A	G	56 ± 2	$13 \pm 0,4$

Im Allgemeinen waren die Kopplungseffizienzen sowie die Substratoxidationsraten der F87G-basierten Mutanten höher als die der F87A-basierten Mutanten. Unter den 10-OH- β -Cembrentriol

(6a-b) produzierenden P450-BM3-Mutanten zeigte die Mutante L75A/F87G die höchste Substratoxidationsrate (23 min^{-1} , bei einer Kopplungseffizienz von 41 %). Eine höhere Kopplungseffizienz (56 %) aber geringere Substratoxidationsrate (13 min^{-1}) wurde mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G beobachtet. Die 9-OH- β -Cembrenliol (8a-b) produzierende P450-BM3-Mutante F87A/I263L zeigte eine Substratoxidationsrate von $1,2 \text{ min}^{-1}$ und eine Kopplungseffizienz von 23 %.

3.3 Diskussion

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der diterpenoide Naturstoff β -Cembrenliol (5), der für seine vielfältigen biologischen Aktivitäten bekannt ist, von der P450-BM3-Mutante F87G zu acht verschiedenen Produkten umgesetzt werden kann (Kapitel 2). In dem vorliegenden Kapitel gelang es mit Hilfe von semirationalem Proteindesign, die Selektivität dieser Reaktion zu verbessern.

Für die Entwicklung von selektiven Enzymvarianten wurde eine P450-BM3-Mutantenkollektion aus 29 Varianten erstellt, die literaturbekannte Aminosäuresubstitutionen an sieben verschiedenen Positionen trugen. Die hier gewählten Aminosäurepositionen (A74, L75, V78, I263, A264 und L437) waren in der Substratbindetasche lokalisiert und stellten Aminosäuren der ersten Sphäre dar. Schon in anderen semirationalen Mutagenesestrategien für P450-BM3 sind die Strukturdaten des Enzyms und der daraus resultierende aktuelle Kenntnisstand genutzt worden, um an einer Selektion von Aminosäurepositionen Mutagenese durchzuführen.^{54,153} Während auch in anderen Studien eine vergleichbare Anzahl an Aminosäurepositionen ausgewählt wurde, führte die anschließende ortsspezifische Sättigungsmutagenese zu einer großen Anzahl an Varianten (> 10.000) und erforderte eine zusätzliche Vorauswahl, wie z.B. das von Fasan und Mitarbeitern entwickelte *fingerprinting*.^{52,53,154} In dem von Reetz und Mitarbeitern entwickelten kombinatorischen Sättigungstest des aktiven Zentrums (CAST, *combinatorial active-site saturation test*) ist die Anzahl der möglichen Varianten durch ein kombinatorisches Verfahren reduziert worden, in dem die Positionen zunächst gruppiert worden sind und die beste Variante einer Gruppe als Vorlage für die nächste Gruppe an Mutanten diente.^{58,155-157} Eine weitere Möglichkeit, die Anzahl an Varianten effizient zu reduzieren, ist die von Arnold und Mitarbeitern verwendete kombinatorische Alaninsubstitution für die Oxidation großer Substrate, bei der keine andere Aminosäure als Alanin eingeführt wurde.⁵⁶ Auch im vorliegenden Projekt sind die an bestimmten Positionen eingeführten Aminosäuren auf wenige (meist kleine hydrophobe Aminosäuren) begrenzt worden, um die Anzahl der zu testenden Proben zu minimieren und den Aufwand des LC/MS-basierten Screenings gering zu halten. Nachdem in der ersten Generation kleine und hydrophobe Reste an Position 87 getestet wurden, sind die besten zwei Varianten F87A und F87G als Vorlage für weitere Mutageneserunden gewählt worden. In der zweiten und dritten Generation wurden literaturbekannte Positionen mutiert, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum katalytischen Hämeisen (als Aminosäuren der ersten Sphäre) ausgewählt wurden. Wenngleich die getestete Kollektion nur 29 Varianten umfasste, konnten bereits Mutanten mit guter Chemo-, Regio- und Stereoselektivität gefunden werden. Im Vergleich dazu sind in anderen Studien zur Enzymoptimierung eine deutlich höhere Anzahl an

P450-BM3-Varianten validiert worden. Während in der CAST-Methode über 8700 Varianten HPLC-basiert getestet wurden, um Mutanten mit einer Regio- und Stereoselektivität > 96 % zu finden,⁵⁸ wurden in dem von Fasan und Mitarbeitern entwickeltem Verfahren zunächst in der *fingerprint*-Analyse über 10.000 Varianten photometrisch getestet aus denen ca. 500 ausgewählt wurden. Nach anschließender Reaktivitätsvorhersage konnten unter den 75 per HPLC getesteten P450-BM3-Varianten Mutanten mit enantiokomplementärer exzellenter Stereoselektivität (100 %) gefunden werden.⁵²

Bei dem Einsatz des dreifach ungesättigten diterpenoiden β -Cembrenndiols (**5**) als Substrat für die P450-Bioakatalyse wurden als mögliche Oxidationsreaktionen sowohl Hydroxylierungen als auch Epoxidierungen erwartet. Beide Reaktionstypen konkurrieren in P450-katalysierten Oxidationen von Alkenen miteinander.¹⁵⁸ Bestimmende Faktoren stellten hierbei die Ionisierungsenergie des Substrates sowie die Dissoziationsenergie der relevanten C-H-Bindung dar.²⁹ Ebenso sind die Struktur des Enzyms und damit die durch die Substratbindetasche vorgegebene Orientierung des Substrates als Faktor zu berücksichtigen.⁵ So konnten bei der Oxidation des linearen Monoterpens Nerylaceton, die von dem P450-BM3-Wildtyp katalysiert wurde, sowohl die 5,6- und 9,10-Epoxyprodukte (58 % in Summe) als auch das 11-OH-Nerylaceton (11 %) neben einem nicht identifizierten Produkt (22 %) detektiert werden.⁵⁰ Mit der P450-BM3-Mutante A328V konnte die Chemoselektivität zu Gunsten der Alkohole 11-OH- und 12-OH-Nerylacteton (98 % in Summe) erhöht werden.⁵⁰ Bei den Oxidationen von β -Cembrenndiol (**5**), die von P450-BM3-Mutanten katalysiert wurden, konnten sowohl eine Epoxidierungsreaktion als auch zwei allylische Hydroxylierungsreaktionen detektiert werden. Während die P450-BM3-Mutante F87A/I263L eine 100 %ige Chemoselektivität für eine Hydroxylierung mit Bildung eines Cembrentriols zeigte, konnte die P450-BM3-Mutante V78A/F87A die Bildung eines Epoxy- β -cembrenndiols mit einer Chemoselektivität von 38 % katalysieren.

Neben der Chemoselektivität, ist die regio- und stereoselektive Oxidation von β -Cembrenndiol (**5**) eine besondere Herausforderung. Aufgrund seiner Größe und den wenigen funktionellen Gruppen besitzt **5** eine Vielzahl an chemisch äquivalenten Kohlenstoffatomen, die potentielle Oxidationspositionen darstellen. Neben dem Ziel, einen selektiven Biokatalysator für die Oxidation von **5** zu entwickeln, sollten Biokatalysatoren erhalten werden, welche die Synthese unterschiedlicher Zielprodukte ermöglichen. Unter den Biokatalysatoren für Epoxidierungen oder Hydroxylierungen sollten folglich selektive Biokatalysatoren für verschiedene Regio- und Stereoisomere entwickelt werden.

Unter den drei Doppelbindungen von β -Cembrenndiol (**5**), die potentielle Positionen für Epoxidierungsreaktionen darstellen (Abbildung 21), konnte nur an der C-7/C-8-Doppelbindung eine Epoxidierungsreaktion nachgewiesen werden, die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87A katalysiert wurde. Zusätzlich weist β -Cembrenndiol (**5**) dreizehn potentielle Hydroxylierungspositionen auf, unter denen sich sieben allylische Positionen befinden (Abbildung 21). Bei den P450-BM3-katalysierten Oxidationen konnten jedoch nur an den benachbarten und

jeweils allylischen Positionen C-9 und C-10 Oxidationsprodukte beobachtet werden. Während die P450-BM3-Mutante F87A/I263L eine 100 %ige Regioselektivität für die Oxidation an Position C-9 zeigte, wies die P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G eine 97 %ige Regioselektivität für die Oxidation an Position C-10 auf.

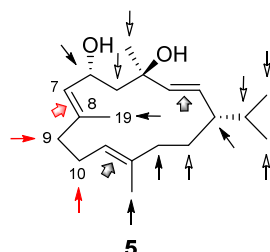


Abbildung 21. Potentielle Oxidationspositionen von 5. Mögliche Positionen, an denen 5 epoxidiert werden kann sind mit einem breiten Pfeil gezeigt. Mögliche Positionen an denen 5 hydroxyliert werden kann sind mit dünnen Pfeilen markiert, wobei allylische Positionen mit einem ausgefülltem Pfeil und nicht-allylische Positionen mit einem nicht-ausgefülltem Pfeil dargestellt sind. Rote Pfeile markieren die Oxidationspositionen detektierter Produkte. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur. Verändert nach Le-Huu *et al.*¹⁵⁰ Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2015 American Chemical Society.

Semirationales Proteindesign ermöglichte es, das Substrat in voneinander unterscheidbare Orientierungen zu zwingen, indem zwei Substratbindetaschen mit geringfügigen aber entscheidenden Unterschieden generiert wurden. Auffällig ist jedoch, dass β -Cembreniol (**5**) nur an einer Seite des Moleküls (C-7 bis C-10) oxidiert wurde und nur eine grundsätzliche Ausrichtung von β -Cembreniol (**5**) im aktiven Zentrum von P450-BM3 möglich zu sein scheint. Dabei ist ungewiss, ob die räumlichen Ausmaße des 14-gliedrigen Kohlenwasserstoffzyklus **5** keine andere Ausrichtung im aktiven Zentrum ermöglichen oder ob spezifische Wechselwirkung zwischen den Alkoholgruppen von **5** und Aminosäureresten von P450-BM3 β -Cembreniol (**5**) in eine Ausrichtung zwingen.

In einer Studie von Branco *et al.* sind am Beispiel von (-)- α -Pinen die Reaktivitäten verschiedener Kohlenstoffzentren über Bindungsdissoziationsenergien berechnet worden.¹⁵⁹ Während die Doppelbindung eine ähnliche Reaktivität wie die allylischen Kohlenstoffzentren gegenüber einer Epoxidierung bzw. allylischen Hydroxylierungen aufwies, war die Reaktivität der nicht-allylischen Kohlenstoffzentren niedriger. Unter den allylischen Hydroxylierungspositionen zeigte die nicht-terminale Position, die zur Bildung eines sekundären Alkohols führt, eine etwas höhere Reaktivität als die terminale Position, die zur Bildung eines primären Alkohols führt.¹⁵⁹ Bei der Oxidation von β -Cembreniol (**5**) sind Hydroxylierungen nur an allylischen nicht-terminalen Positionen beobachtet worden. Eine allylische Hydroxylierung an der terminalen Position C-19 wäre ebenfalls denkbar gewesen, ist jedoch nicht nachgewiesen worden. Die Position C-19 befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den oxidierten Positionen C-7 bis C-10, zeigt aber möglicherweise in eine von der Hämgruppe abgewandte Richtung. Fraglich ist hierbei, ob die Reaktivität der β -Cembreniol-Kohlenstoffzentren oder die durch die Substratbindetasche des Enzyms vorgegebene Orientierung

des β -Cembrenndiols (**5**) der entscheidendere Faktor für die in den P450-BM3-katalysierten Oxidationen von **5** beobachtete Regioselektivität darstellt.

Die P450-BM3-katalysierte Oxidation von **5** konnte mit unterschiedlichen Stereoselektivitäten erzielt werden. Die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87A katalysierte Epoxidierung an Position C-7/C-8 verlief mit einem exzellenten Diastereomerenverhältnis von > 99:1 ähnlich stereoselektiv wie die von der P450-BM3-Mutante F87A/I263L katalysierte Hydroxylierung an Position C-9 mit einem Diastereomerenverhältnis von 89:11. Die epimeren 10-OH- β -Cembrentriolen (**6a-b**) hingegen wurden bestenfalls von der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G in einem Diastereomerenverhältnis von 74:26 erzielt. Weiterhin konnte bei der Hydroxylierung an Position C-10 mit den P450-BM3-Mutanten L75A/(V78A)/F87G eine stereospezifische Alkoholoxidation zum korrespondierenden Enon beobachtet werden, die im Anschluss an eine nicht-stereoselektive Hydroxylierung zu einer Erhöhung der Diastereomerenverhältnisse führte. In weiteren Untersuchungen müsste gezeigt werden, ob die Stereospezifität dieser Überoxidation vom Alkohol zum Enon dazu genutzt werden kann, in einem Verfahren ähnlich einer kinetischen Racematspaltung einen enantiomerenreinen Alkohol zu erhalten. Die absolute Konfiguration der neu eingeführten Stereozentren an Position C-9 und C-10 der β -Cembrentriolen (**6** und **8**) wurde nicht bestimmt. In weiterführenden Studien könnte entweder über die Kristallisation der Substanzen mit anschließender Röntgenstrukturaufklärung oder über NMR-basierte Methoden die absolute Konfiguration bestimmt werden. Bei der Bestimmung über NMR-Analysen werden meist chirale Derivatisierungsreagenzien ähnlich dem Mosher-Reagenz verwendet, um diastereomere Ester mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen zu erhalten.^{160,161} Dieses Verfahren ist jüngst auch für Substanzen mit mehreren funktionellen Gruppen eingesetzt worden.¹⁶²

Ein entscheidender Faktor der Einsetzbarkeit von P450-Biokatalysatoren stellt ihre Kopplungseffizienz dar. Als Kopplungseffizienz bezeichnet man das Verhältnis von gebildeten Produkten zum verbrauchten Kofaktor NAD(P)H, das idealerweise 100 % betragen sollte. Bei P450-katalysierten Reaktionen treten jedoch häufig Entkopplungsreaktionen auf, bei denen der Kofaktor NAD(P)H verbraucht wird, ohne dass dieser Verbrauch zur Produktbildung führt. Um die Verfügbarkeit von reduziertem Kofaktor sicherzustellen, wurde dieser in der vorliegenden Studie mit Glucose-Dehydrogenase regeneriert. Von den hier verwendeten P450-Biokatalysatoren wurde die Kopplungseffizienz als spezifischer Parameter für Cytochrom-P450-Monooxygenasen bestimmt. Die höchste Kopplungseffizienz von 56 % wurde mit der 10-OH- β -Cembrentriolen produzierenden P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G und die niedrigste (23 %) mit der 9-OH- β -Cembrentriolen produzierenden P450-BM3-Mutante F87A/I263L gemessen. Während bei der Umsetzung nicht-physiologischer Substrate auch Kopplungseffizienzen von weniger als 1 % detektiert worden sind,⁵⁶ liegen sie im Durchschnitt bei 30-40 %.¹¹⁸ Die Kopplungseffizienzen der hier entwickelten P450-Biokatalysatoren für das nicht-physiologische Substrat **5** liegen somit im üblichen Bereich. Weiterhin war auffällig, dass die F87G-basierten P450-BM3-Mutanten eine höhere Kopplungseffizienz als die F87A-basierten Mutanten zeigten. Die Einführung eines Glycins anstelle eines Alanins hat hier möglicherweise den notwendigen Platz im aktiven Zentrum geschaffen, damit

das Substrat β -Cembreniol (**5**) enger anliegend binden kann und es zu weniger Entkopplungsreaktionen kommt. Vergleichbar hierzu hat bei der P450-BM3-katalysierten Oxidationen des Sesquiterpenlactons Parthenolid die Einführung eines Alanins anstelle eines Valins an Position 87 zu einer deutlichen Erhöhung der Kopplungseffizienz geführt (Kopplungseffizienz der Mutanten VII-H11 mit F87A: 31 % und XII-D8 mit F87V: 1,4 %).

P450-BM3 ist nach aktuellem Kenntnisstand das bisher einzige bekannte Cembreniol oxidierende Enzym. Wenngleich die biokatalytischen Substratoxidationsraten der 9-OH- β -Cembreniol produzierenden Mutanten gering waren (1,2 und 4,4 min⁻¹), waren die Mutanten stabil genug, um in präparativen Reaktionen hohe Umsätze (92 %) erzielen zu können. Bei isolierten Gesamtausbeuten von 39-66 %, konnten die 9-OH- genauso wie die 10-OH- β -Cembreniole mit isolierten Einzelausbeuten von 31-57 % erhalten werden. Bereits über Biotransformationen mit pflanzlichen oder bakteriellen Kulturen konnten Cembreniole erhalten werden (Kapitel 3.1). In Biotransformationen mit Kulturen von *Bacillus sp.* NK8 und NC5 wurden die 9-OH- und 10-OH- β -Cembreniole jedoch nur mit isolierten Ausbeuten von 3-7 % hergestellt.¹³³ Das Rohprodukt der Biotransformationen ist in der Studie von El Sayed *et al.* nicht analysiert worden.¹³³ So bleibt unklar, ob eine niedrige Selektivität zur Bildung weiterer Produkte, die nicht isoliert werden konnten, geführt hat oder ob eine geringe Aktivität der *Bacillus*-Kulturen der limitierende Faktor für höhere Ausbeuten war.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte *in-vitro*-Oxidation mit dem Biokatalysator P450-BM3 stellt somit eine vielversprechende Methode zur Oxyfunktionalisierung von β -Cembreniol (**5**) dar. Die P450-BM3-katalysierten Oxidationen sind bisher nur mit geringen Substratkonzentrationen (200 μ M) durchgeführt worden. In weiteren Studien sollte daher die Substratkonzentration der enzymatischen Reaktion optimiert werden. Da das diastereomerenreine β -Cembreniol (**5**) nur zu einem hohen Preis kommerziell erhältlich ist, muss für eine Hochskalierung dieser Reaktion die Verfügbarkeit des Substrates berücksichtigt werden. Während in anderen Studien Cembreniol über eine aufwendige Isolation und Reinigung aus Tabakblättern gewonnen wurde,¹³³ würde die Etablierung eines biosynthetischen Syntheseweges für Cembreniol(-Derivate) neue Möglichkeiten eröffnen. Für das Sesquiterpenlacton Artemisininsäure konnte die Totalbiosynthese bereits erfolgreich in *S. cerevisiae* etabliert und bis zur industriellen Anwendung gebracht werden.^{163,164}

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass eine strukturbasierte Enzymmutagenese eine effiziente Methode ist, P450-Biokatalysatoren für eine chemo-, regio- und stereoselektive Oxidation zu entwickeln. Die erfolgreiche Durchführung von selektiven C-H-Oxyfunktionalisierungen am Beispiel des makrozyklischen Diterpenoids β -Cembreniol (**5**) verdeutlicht dabei das Potential von Biokatalysatoren.

4 P450-P450-Kaskadenreaktion zur zweifachen Hydroxylierung von β -Cembrenndiol

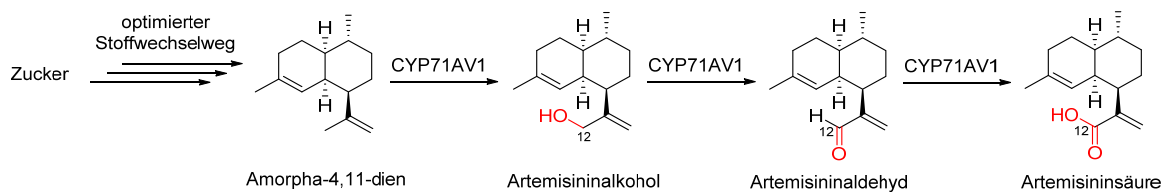
4.1 Einleitung

Die evolutionär optimierte Abfolge chemischer Reaktionen in Stoffwechselwegen von lebenden Organismen war das Leitbild für die Erforschung von Kaskadenreaktionen.¹⁶⁵ Biosynthesewege stellen ein Beispiel für natürlich vorkommende Kaskadenreaktionen dar. Ihre Effizienz ist häufig hervorgehoben worden und hat Synthesechemikern genauso wie Biotechnologen als Inspiration für deren artifizielle Nachbildung sowie für die Synthese von diversen organischen Verbindungen gedient.^{105,166}

Unter Kaskaden versteht man die Kombination von zwei oder mehreren Reaktionen, die in einem Reaktionsgefäß ausgeführt werden. Bei diesen auch als Eintopfprozess beschriebenen Reaktionen besteht keine Notwendigkeit, Reaktionsintermediate zu isolieren, sodass im Vergleich zur klassischen schrittweisen Synthese höhere Gesamtausbeuten bei niedrigerem Aufwand erzielt werden können. Die Einfachheit der Reaktionsdurchführung, die damit verbundene Reduzierung von Kosten und Zeit, als auch die Reduktion von organischen Lösungsmittelabfällen sind weitere zentrale Vorteile von Kaskadenreaktionen.^{165,167,168}

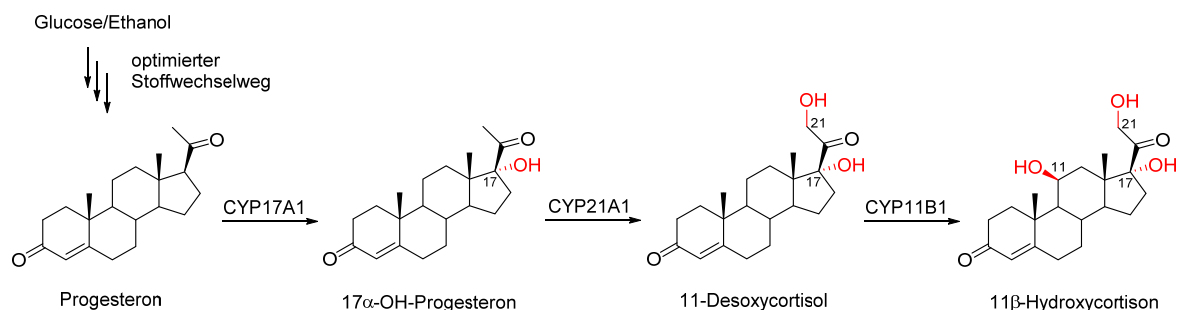
Kaskadenreaktionen sind hinsichtlich unterschiedlicher Eigenschaften (wie dem Typ des Katalysators, der Anzahl der verwendeten Katalysatoren, der Anzahl der Reaktionsschritte, der Anordnung der Einzelreaktionen und der Anordnung der Katalysatoren) klassifiziert worden.¹⁶⁹ Als Katalysator sind Biokatalysatoren, organische Katalysatoren oder eine Kombination von beiden eingesetzt worden. Der Vorteil von Biokatalysatoren ist die Kompatibilität verschiedener Reaktionen im wässrigen Lösungsmittel, die bei Verwendung von chemischen Katalysatoren nicht gegeben ist.¹ Der einfachste und im vorliegenden Projekt relevante Reaktionsaufbau einer Kaskade ist der lineare Verlauf, bei dem ein Substrat über eine oder mehrere Zwischenstufen zu einem Produkt umgesetzt wird.¹⁶⁸ Während Dominoreaktionen über reaktive Zwischenstufen verlaufen und an beiden Reaktionen derselbe Katalysator beteiligt ist, wurden Tandemreaktionen als eine Abfolge von Reaktionen beschrieben, die über stabile Intermediate verlaufen und somit auch in unabhängig voneinander funktionierende Einzelschritte unterteilt werden können.¹⁷⁰ Die Einzelreaktionen können hierbei von demselben Katalysator genauso wie von mehreren Katalysatoren vermittelt werden. Bei Multi-Enzym-Kaskadenreaktionen, bei denen mindestens zwei Katalysatoren beteiligt sind, kann darüber hinaus zwischen unterschiedlichen Anordnungen der Enzyme differenziert werden. Während in simultanen Kaskadenreaktionen sich alle beteiligten Katalysatoren und Reaktanden von Anfang an in der Reaktionslösung befinden, werden bei sequentiellen Reaktionen die Katalysatoren nacheinander zugegeben. Die Zugabe des zweiten Katalysators und der für den zweiten Schritt erforderlichen Reaktanden erfolgt dabei zu einem späteren Zeitpunkt, sobald die erste Reaktion vollständig abgelaufen ist.¹⁷¹ Ebenfalls kann differenziert werden in Kaskadenreaktionen, bei denen die chemischen Reaktionen an unterschiedlichen oder an gleicher(/n) Position(en) im Molekül abläuft. In letzterem Fall ist somit eine bestimmte Abfolge der Reaktionen zwingend.

Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind aufgrund ihrer komplexen Organisation in Multikomponentensystemen nur selten in Kaskadenreaktionen eingesetzt worden.¹⁷² Nachfolgend werden bisher bekannte biotechnologische P450-Kaskadenreaktionen vorgestellt, wobei zwischen Kaskadenreaktionen an gleicher oder unterschiedlichen Position(en) unterschieden werden soll. Ein inzwischen industriell angewendetes Beispiel einer P450-Kaskadenreaktion mit einer Abfolge von Reaktionen an gleicher Position ist die Produktion von Artemisininsäure – der Vorstufe des Antimalaria Wirkstoffs Artemisinin.^{164,173} In *S. cerevisiae* konnte ausgehend von Zuckermolekülen der sesquiterpene Bicyklus Amorpha-4,11-dien hergestellt werden.¹⁷⁴ Mit der pflanzlichen P450-Monooxygenase CYP71AV1 aus *Artemisia annua* konnte anschließend eine Sauerstoffunktionalität eingeführt werden.¹⁷⁵ In einer dreistufigen CYP71AV1-katalysierten Oxidation an Position C-12 über die Zwischenstufen Artemisininalkohol und Artemisininaldehyd wurde die Artemisininsäure erhalten (Schema 8). Im Jahr 2013 konnte mit einem entwickelten Hefestamm die Totalbiosynthese von Artemisininsäure mit einer Ausbeute von 25 g/l erzielt werden.¹⁶³



Schema 8: Dreistufige P450-Kaskadenreaktion, in der CYP71AV1 die Oxidation von Armopha-4,11-dien zur Artemisininsäure katalysiert.^{163,175} Die dargestellte Kaskade ist Teil einer in *S. cerevisiae* etablierten Totalsynthese von Artemisininsäure.

Beispiele für P450-Kaskadenreaktionen, bei denen Sauerstoffatome an unterschiedlichen Positionen eingeführt wurden sind nachfolgend beschrieben. Als Vorbild für diese P450-katalysierten Reaktionen diente jeweils der humane (Seco-)Steroidmetabolismus. Im Steroidmetabolismus von Säugern dient Progesteron als Vorläufer für 11 β -Hydroxycortison (auch als Cortisol bekannt). Während Progesteron nur zwei Sauerstoffunktionalitäten trägt, besitzt 11 β -Hydroxycortison drei zusätzliche Hydroxygruppen (Schema 9).



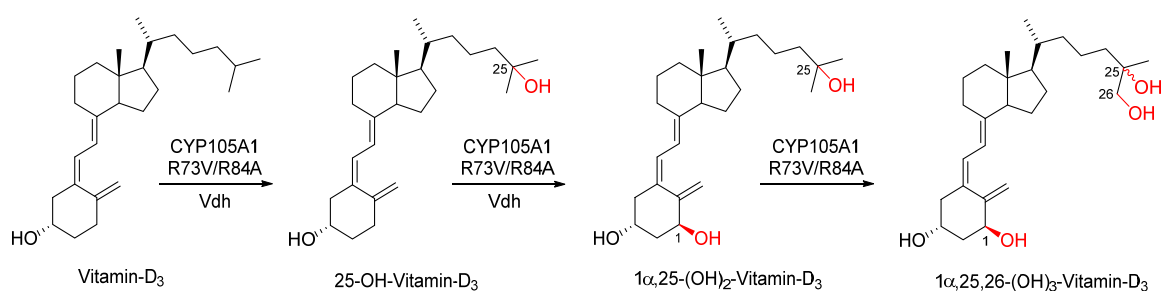
Schema 9. Dreistufige P450-Kaskadenreaktion, in der Progesteron an den Positionen C-17, C-21 und C-11 zum 11 β -Hydroxycortison hydroxyliert wird.^{176,177} Als Katalysatoren dienen dabei CYP17A1 vom Rind sowie die humanen CYP21A1 und CYP11B1. Die dargestellte Kaskade ist Teil der in *S. cerevisiae* etablierten Totalsynthese von 11 β -Hydroxycortison.

Progesteron wird folglich in einer Abfolge von drei P450-katalysierten Reaktionen an den Positionen C-17, C-21 und C-11 hydroxyliert. Als Intermediate werden hierbei 17α -Hydroxyprogesteron und 11-Desoxycortisol gebildet. Die Hydroxylierungen erfolgen unabhängig voneinander durch die drei verschiedenen Cytochrom-P450-Monooxygenasen 17α -, 21- und 11β -Hydroxylase.¹⁷⁸ Die Totalbiosynthese von 11β -Hydroxycortison in *S. cerevisiae* wurde im Jahr 2003 von Szczebara *et al.* veröffentlicht.¹⁷⁷ Zunächst war es gelungen in einem optimierten Hefestamm, ausgehend von Galaktose, das Steroid Progesteron herzustellen.¹⁷⁶ Nach dem Vorbild des Säugermetabolismus konnten im Anschluss drei P450-katalysierte Hydroxylierungsreaktionen durchgeführt werden. Neben zwei Elektronentransferproteinen wurden die Monooxygenase CYP17A1 vom Rind sowie die humanen CYP21A1 und CYP11B1 verwendet. 11β -Hydroxycortison konnte hierbei mit einer Ausbeute von 12 $\mu\text{g/ml}$ synthetisiert werden.¹⁷⁷

Im humanen Vitamin-D₃-Metabolismus werden ausgehend von Vitamin-D₃ (Cholecalciferol) zwei bis drei Hydroxylierungen katalysiert. Die Einzelschritte erfolgen in unterschiedlichen Organen und werden durch verschiedene P450-Enzyme katalysiert. Die erste Hydroxylierung findet an Position C-25 zum Prohormon 25-OH-Vitamin-D₃ statt und wird von dem mikrosomalen Leberenzym CYP2R1 oder dem mitochondrialen Leberenzym CYP27A1 katalysiert. Es folgt die von CYP27B1-katalysierte Hydroxylierung an Position C-1 zum aktiven $1,25\text{-(OH)}_2$ -Vitamin-D₃ (Calcitriol) in den Mitochondrien der Niere. Die Hydroxylierung an Position C-24, die eine inaktivierende Wirkung hat, kann ausgehend vom 25-OH-Vitamin-D₃ oder $1,25\text{-(OH)}_2$ -Vitamin-D₃ erfolgen und wird von CYP24A1 in den Mitochondrien der Niere oder des Darms katalysiert.¹⁷⁹

Hydroxylierungen von Vitamin-D₃ und seinen Derivaten konnten in einer *in-vitro*-Studie mit dem in *E. coli* exprimiertem CYP105A1 Katalysator aus *Streptomyces griseolus* gezeigt werden. CYP105A1 akzeptiert sowohl Vitamin-D₃ als auch 1α -OH-Vitamin-D₃ als Substrate für eine Hydroxylierung an Position C-25. Ebenfalls konnte in einer weiteren Reaktion die Hydroxylierung von 25-OH-Vitamin-D₃ an Position C-1 zum zweifach hydroxylierten Derivat detektiert werden.¹⁸⁰

In einer weiteren *in-vivo*-Studie gelang mit *Streptomyces-lividans*-Zellen, die rekombinant die CYP105A1-Mutante R73V/R84A exprimierten, die zweistufige Synthese von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2$ -Vitamin-D₃ mit einer Ausbeute von 2 mg/l (Schema 10).¹⁸¹ Hierbei konnten ebenfalls die dreifach hydroxylierten Produkte $1\alpha,25,26\text{-(OH)}_3$ -Vitamin-D₃ detektiert werden. Wenngleich das erste Intermediat der dreistufigen Synthese sowohl 1-OH-Vitamin-D₃ als auch 25-OH-Vitamin-D₃ hätte sein können, postulierten Hayashi *et al.*, dass die dreistufige Synthese bevorzugt über eine Hydroxylierung an Position C-25, C-1 und C-26 in genannter Reihenfolge abläuft.^{181,182} Die ersten zwei Stufen der CYP105A1-katalysierten Kaskade konnten ebenfalls mit der Vitamin-D-Hydroxylase (Vdh) aus *Pseudonocardia autotrophica* erzielt werden. Sie gehört zur CYP107-Familie und katalysiert *in vitro* die zweifache Hydroxylierung des Vitamins-D₃ zum $1\alpha,25\text{-(OH)}_2$ -Vitamin-D₃. Im Gegensatz zu CYP105A1 konnte bei der Oxidation von Vitamin-D₃ keine Hydroxylierung an Position C-1 detektiert werden. Die Synthese des $1\alpha,25\text{-(OH)}_3$ -Vitamin-D₃ erfolgte somit zwingend über das Intermediat 25-OH-Vitamin-D₃.¹⁸³



Schema 10. Zwei- bis dreistufige P450-Kaskadenreaktion, von Vitamin-D₃ zu 1 α ,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ bzw. 1 α ,25,26-(OH)₃-Vitamin-D₃.^{181,183} Während die dreistufige Kaskadenreaktion mit in *S. lividans* exprimierten CYP105A1 aus *S. griseolus* ausgeführt wurde, konnten die ersten beiden Stufen auch mit der in *E. coli* exprimierten Vitamin-D-Hydroxylase (Vdh) durchgeführt werden.

Kristallstrukturen vom CYP105A1-Wildtyp und aktiveren CYP105A1-Mutanten sowie Kokristallisation von CYP105A1-Mutanten mit dem Produkt 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ ermöglichten weitere Erkenntnisse zu dem breiten Reaktionsspektrum von CYP105A1.^{184,185} Die auf den Kenntnissen der dreidimensionalen Struktur basierten Mutagenesestudien zeigten, dass dieselben Aminosäuresubstitutionen entscheidenden Einfluss auf Hydroxylierungsreaktionen an Position C-1 genauso wie an Position C-25 haben. Sakaki und Mitarbeiter postulierten daraufhin, dass Vitamin-D₃-Derivate in zwei verschiedenen Orientierungen im aktiven Zentrum binden können. Für die von einem P450-Enzym katalysierte dreistufige Kaskadenreaktion müssten somit die Produkte der C-25-Oxidation (25-OH-Vitamin-D₃) und der C-1-Oxidation (1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃) nach Diffusion aus der Substratbindetasche für die darauffolgende Oxidation an Position C-1 und an Position C-26 erneut in gegensätzlicher Orientierung in das aktive Zentrum eintreten. Kokristallisationen einer vierfachen Mutante von der Monooxygenase CYP107 (Vdh) mit den Substraten Vitamin-D₃ und 25-OH-Vitamin-D₃ konnten die gegensätzliche Orientierung der Secosteroide im aktiven Zentrum des Enzyms bestätigen.¹⁸⁶

In den beschriebenen Beispielen von P450-Kaskadenreaktionen sind bekannte Naturstoffe synthetisiert worden, deren Biosynthesewege sowie die daran beteiligten Katalysatoren bereits aufgeklärt waren. Für den biotechnologischen Prozess konnten somit zum Teil die physiologischen P450-Enzyme genutzt werden. Ziel des vorliegenden Projektes sollte eine mehrfache Oxidation des in *Nicotiana tabacum* vorkommenden β -Cembrendiols (**5**) sein. Bisher ist jedoch keine P450-Monooxygenase bekannt deren physiologische Funktion die Oxidation von β -Cembrendiol (**5**) ist. Dennoch wurden in Tabak auch höher funktionalisierte β -Cembrendiol-Derivate gefunden, die neben den Hydroxygruppen an Position C-4 und C-6 weitere Sauerstofffunktionalitäten trugen. Unter den dreifach oxyfunktionalisierten β -Cembrendiol-Derivaten wurden Substanzen mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe an Position C-11 oder C-12 oder einer Epoxygruppe an den Doppelbindungen C-7/C-8 oder C-11/C-12 gefunden, während die vierfach oxyfunktionalisierten Derivate zwei zusätzliche Hydroxygruppen an Position C-7 und C-11 oder C-11 und C-12 vorwiesen. Während davon ausgegangen wird, dass die zusätzlichen Hydroxygruppen des 2,8,12-Cembratrien-4,6,7,11-

tetraols in zwei Reaktionsschritten eingeführt werden, sind die Hydroxygruppen an Position C-11 und C-12 vermutlich über eine Epoxid-Hydrolyse entstanden.^{72,187,188}

Im vorliegenden Teilprojekt sollte eine artifizielle P450-P450-Kaskade etabliert werden, die die konsekutive chemo-, regio- und stereoselektive Einführung von zwei Sauerstoffunktionalitäten in die 14-gliedrige Ringstruktur des β -Cembrenndiols (**5**) ermöglicht.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Design einer P450-P450-Kaskadenreaktion

Die Etablierung einer P450-P450-Kaskadenreaktion erfolgte mit dem Ziel, eine möglichst hohe Gesamtausbeute des zweifach hydroxylierten Produktes von β -Cembrenndiol (**5**) zu erzielen. Folglich war es wichtig, die einzelnen Oxidationsschritte mit jeweils hohen Selektivitäten durchzuführen. Für den ersten Oxidationsschritt wurde der P450-BM3-Biokatalysator F87A/I263L gewählt, mit dem die Oxidation des β -Cembrenndiols (**5**) zum 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) bereits mit einer isolierten Ausbeute von 57 % und einer Selektivität von 73 % erzielt werden konnte (Kapitel 3.2.5). Für den zweiten Oxidationsschritt, sollte nach einer geeigneten P450-BM3-Mutante gesucht werden, die das 9-OH- β -Cembrentriols (**8a**) mit hoher Regio-, Chemo- und Stereoselektivität umsetzt.

4.2.2 Screening von P450-BM3-Mutanten hinsichtlich einer selektiven Oxidation von 9-OH- β -Cembrentriol

Das P450-BM3-Screening nach Enzymen für die Oxidation der Vorstufe β -Cembrenndiol (**5**) hatte bereits gezeigt, dass die P450-BM3-Aminosäurereste F87, L75 und V78 eine entscheidende Rolle spielten (Kapitel 3.2.3). Alle drei Aminosäuren sind oberhalb des Porphyrinrings in der Substratbindetasche lokalisiert (Kapitel 3.2.2: Abbildung 15). Während die Aminosäure F87 des B'-C-Loops direkt über der Hämgruppe positioniert ist und damit großen Substraten den Zugang zum Hämeisen versperrt, liegen die Aminosäuren L75 und V78 der B'-Helix in größerer Entfernung zum Hämeisen und beeinflussen damit möglicherweise die Orientierung großer Substrate.^{42,56} Der Austausch dieser Aminosäuren, die alle in der ersten Substraterkennungsstelle lokalisiert sind, gegen die kleineren hydrophoben Resten Alanin und Glycin bewirkte eine Erhöhung der Aktivität gegenüber β -Cembrenndiol (**5**). Des Weiteren konnte durch Kombination von Mutationen an diesen drei Positionen 75, 78 und 87 die Regioselektivität der β -Cembrenndiol-Oxidation gesteuert werden.¹⁵⁰

Für die Suche nach einem geeigneten Enzym für den zweiten Oxidationsschritt – der Oxidation des 9-OH- β -Cembrentriols (**8a**) – wurde eine Auswahl aus zwölf ein- bis dreifachen P450-BM3-Mutanten erstellt (Tabelle 8). In der ersten Mutagenesegeneration wurde eine Aminosäuresubstitution an Position 87 hin zu Glycin oder Alanin durchgeführt. In der zweiten Generation wurden zusätzliche Aminosäuresubstitution von Leucin an Position 75 oder Valin an Position 78 jeweils gegen Glycin oder Alanin eingeführt, während in der dritten Generation an allen drei Positionen 75, 78 und 87 Alanin- oder Glycinreste eingebaut wurden.

Tabelle 8. Umsatz und Produktverteilung von 9-OH- β -Cembrentriol-(8a)-Oxidationen verschiedener P450-BM3-Mutanten. Das Diastereomerenverhältnis (dr) der Produkte 9,10-OH- β -Cembrentetraol (**10a-b**) ist angegeben. **10a** hatte eine Retentionszeit (R_t) von 10,3 min und **10b** von 10,5 min. Die Produkte mit einer Retentionszeit von 4,5, 8,6 und 8,8 min zeigten eine Massendifferenz von +16 zum Substrat (LRMS). Die Experimente wurden mit zellfreiem *E.-coli*-Extrakt (2,5 μ M finale P450-Konzentration) durchgeführt. Abweichungen, bei denen die Summe aller Produkte ungleich 100 % ist, sind auf Rundungen zurückzuführen. Drei Mutanten zeigten Umsätze von < 10 % (n.d. = nicht detektierbar), ohne dass Produkte detektiert werden konnten. Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet worden.

Generation	Aminosäure-substitution			Umsatz (%)	Produktverteilung (%)					dr (10a:10b)	
	L75	V78	F87		R_t 4,5 (min)	R_t 8,6 (min)	R_t 8,8 (min)	10a	10b		andere Produkte
Ia			G	24 \pm 3	9	-	-	58	33	-	64:36
IIa	G		G	54 \pm 11	35	31	17	8	8	-	49:51
IIa	A		G	48 \pm 10	37	22	7	9	25	-	27:73
IIa		G	G	28 \pm 10	-	-	-	35	61	4	36:64
IIa		A	G	48 \pm 8	-	-	-	49	49	2	50:50
IIIa	A	A	G	47 \pm 5	-	6	2	9	75	8	11:89
Ib			A	n.d.	-	-	-	-	-	-	-
IIb	G		A	35 \pm 4	18	55	11	-	7	9	> 1:99
IIb	A		A	15 \pm 5	31	44	-	-	25	-	> 1:99
IIb		G	A	n.d.	-	-	-	-	-	-	-
IIb		A	A	n.d.	-	-	-	-	-	-	-
IIIb	A	A	A	54 \pm 9	4	43	8	-	38	7	> 1:99

Während der P450-BM3-Wildtyp keine Aktivität gegenüber dem 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) zeigte, konnte mit der Einführung eines Glycins an Position 87 ein Umsatz von 24 % erreicht werden (Tabelle 8, Generation: Ia). Die P450-BM3-Mutante F87G katalysierte die Hydroxylierung des 9-OH- β -Cembrentriols (**8a**) an Position C-10 mit einer Regioselektivität von 91 %. Die daraus resultierenden 9,10-OH- β -Cembrentetraole (**10a-b**) mit unterschiedlichen Konfigurationen an Position C-10 wurden hierbei in einem Diastereomerenverhältnis von 64:36 zu Gunsten von **10a** gebildet. In der zweiten F87G-basierten Generation (IIa) führten Aminosäuresubstitutionen an Position 78 zu einer Aktivitätssteigerung bis Faktor 2 (48 % Umsatz mit V78A/F87G) und einer Erhöhung der Regioselektivität für Position C-10 (98 % im Fall von V78A/F87G). Während in der P450-BM3-Mutante F87G die Substitution an Position 78 gegen ein Glycin eine Umkehr der Stereoselektivität zu Gunsten von **10b** (Diastereomerenverhältnis von 36:64) zur Folge hatte, führte die Substitution an Position 78 gegen ein Alanin zu einer Diastereoselektivität von 1 (Abbildung 22B). Die Einführung von Aminosäuresubstitutionen an Position 75 (anstatt Position 78) in die P450-BM3-Mutante F87G, führte ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung bis Faktor 2 (54 % Umsatz mit L75G/F87G). Im Gegensatz zu der Aminosäuresubstitution an Position 78, führte der Austausch an Position 75 jedoch zu einer Verringerung der Regioselektivität für Position C-10 (16 % im Fall von L75G/F87G). Mit beiden P450-BM3-Mutanten L75G/F87G und L75A/F87G konnten Produkte bei einer Retentionszeit von 4,5 min (35 % im Fall von L75G/F87G), 8,6 min (31 % im Fall von L75G/F87G) und 8,8 min (17 % im Fall von L75G/F87G) detektiert werden, deren Strukturen nicht

aufgeklärt wurden (Abbildung 22A). Die detektierten Massen dieser Produkte zeigen jedoch eine Differenz zum Substrat von sechzehn, was eine Hydroxylierung oder Epoxidierung des Substrates vermuten lässt. In der dritten Generation (IIIa) konnte mit der dreifachen P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G im Vergleich zu den Zweifachmutanten keine Erhöhung der Aktivität erzielt werden (47% Umsatz). Das Produktspektrum ähnelte dem der P450-BM3-Zweifachmutante V78A/F87G, zeigte jedoch mit 84 % eine etwas geringere Regioselektivität für Position C-10. Dennoch konnte mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G in der dritten Generation das beste Diastereomerenverhältnis zu Gunsten von **10b** (11:89) erzielt werden (Abbildung 22C).

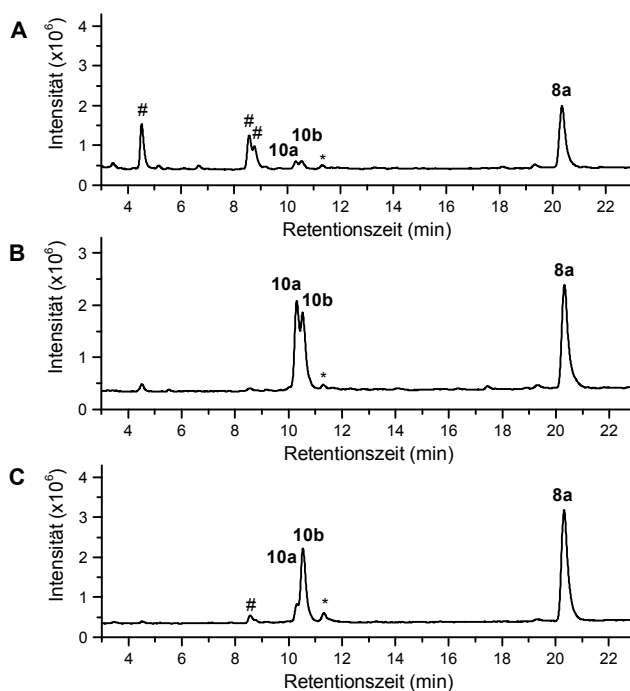


Abbildung 22. LC/MS-Chromatogramme der P450-BM3-katalysierten Oxidationen von 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) unter Verwendung der Mutanten L75G/F87G (A), V78A/F87G (B) und L75A/V78A/F87G (C). Das Substrat 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) wurde bei einer Retentionszeit von 20,3 min und die Produkte 9,10-OH- β -Cembrentetraol (**10a-b**) bei einer Retentionszeit von 10,3 min und 10,5 min detektiert. Es konnten weitere Produkte (#) bei einer Retentionszeit von 4,5 min, 8,6 min und 8,8 min detektiert werden. Hintergrundsignale sind mit einem Stern (*) markiert. Die Intensität ist als Totalionenstrom des positiven Ionisierungsmodus angegeben.

Im Gegensatz zur P450-BM3-Einfachmutante F87G, konnte mit der Einführung eines Alanins an Position 87 (Generation Ib) kein Umsatz detektiert werden (Tabelle 8). Während in der zweiten F87A-basierten Generation (IIb) Aminosäuresubstitutionen an Position 78 keine signifikante Aktivität hervorriefen, wurden mit Aminosäuresubstitutionen an Position 75 Umsätze von 15-35 % detektiert. Ähnlich zu den F87G-basierten Mutanten konnten mit Aminosäuresubstitutionen an Position 75 nur geringe Regioselektivitäten für Position C-10 erzielt werden (7-25 % im Fall von L75A/G/F87A). Als Hauptprodukt wurde jeweils das Produkt mit einer Retentionszeit von 8,6 min (55 % im Fall von L75G/F87A) detektiert. In der dritten F87A-basierten Generation (IIIb) konnte mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87A die Aktivität verbessert werden (54 % Umsatz), obgleich die Selektivität gering war (**10b**: 38% und R_t 8,6: 43 %).

4.2.3 Zweifache Hydroxylierung von β -Cembrenndiol

Für die zweifache Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (**5**) wurde zunächst nach einem geeigneten Reaktionsmodus zur Etablierung der P450-P450-Kaskadenreaktion gesucht. Dabei sollten die P450-BM3-Biokatalysatoren F87A/I263L und V78A/F87G bzw. L75A/V78A/F87G verwendet werden. Es sollte untersucht werden, ob eine Zugabe der Katalysatoren für beide Oxidationsschritte simultan erfolgen kann oder ob ein sequentieller Reaktionsmodus, bei dem der zweite Katalysator erst nach Abschluss der ersten Oxidation zugegeben wird, vorteilhafter ist. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob im sequentiellen Reaktionsmodus die Reihenfolge der katalysierten Hydroxylierungen entscheidend ist. Die Untersuchung der Reaktionsmodi erfolgte im analytischen Maßstab, auf dem die nachfolgend angegebenen Ausbeuten basieren.

Bei simultaner Zugabe der P450-BM3-Biokatalysatoren F87A/I263L und (L75A/V78A/F87G) wurde β -Cembrenndiol (**5**) nach 17 h zu 98 % umgesetzt (Abbildung 24A und D sowie Anhang: Tabelle 19 und Tabelle 20). Während keine 9-OH- β -Cembrentriolen (**8a-b**) detektiert wurden, konnte die Hydroxylierung des β -Cembrenndiols (**5**) an Position C-10 nachgewiesen werden (**6a-b**, 52-55 % Ausbeute), die von der P450-BM3-Mutante (L75A/V78A/F87G) katalysiert wird (Kapitel 3.2.3). Nach 17 h hatte ebenfalls bereits die zweifache Hydroxylierung von **5** zu den 9,10-OH- β -Cembrenntetraolen (**10a-b**) mit einer Gesamtausbeute von 6-15 % stattgefunden. Im Verlauf weiterer 7 h konnte jedoch die Ausbeute der gewünschten Produkte **10a-b** nicht weiter erhöht werden, sodass die Produktverteilung zwischen 17 h und 24 h weitestgehend konstant blieb.

Bei einem sequentiellen Aufbau der Kaskadenreaktion, der mit der Katalyse der Mutante V78A/F87G (Reaktionsmodus: sequentiell Ia) bzw. L75A/V78A/F87G (Reaktionsmodus: sequentiell Ib) begann, wurde β -Cembrenndiol (**5**) zunächst an Position C-10 hydroxyliert (Abbildung 24B und E). Nach 17h konnten bei einem Umsatz von 98 % die 10-OH- β -Cembrentriolen (**6a-b**) mit einer Gesamtausbeute von 63-64 % detektiert werden. Während unter Verwendung der P450-BM3-Mutante V78A/F87G ein Diastereomerenverhältnis von 73:27 (**6a:6b**) beobachtet wurde, wurde mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G ein Diastereomerenverhältnis von 89:11 (**6a:6b**) erhalten. Ähnlich zum simultanen Reaktionsmodus konnte durch Zugabe des zweiten Enzyms, der P450-BM3-Mutante F87A/I263L, keine weitere Oxidation und somit keine Hydroxylierung des 10-OH- β -Cembrentriols (**6a**) an Position C-9 zum gewünschten 9,10-OH- β -Cembrenntetraol (**10a-b**) erreicht werden.

In einem nächsten Schritt wurde die sequentielle Kaskadenreaktion mit umgedrehter Reihenfolge der P450-BM3-Biokatalysatoren getestet. Bei einem sequentiellen Aufbau, der mit der Katalyse der P450-BM3-Mutante F87A/I263L startete (Reaktionsmodus: sequentiell IIa), konnte nach 17 h ein nahezu vollständiger Umsatz des β -Cembrenndiols (**5**) (97 %) detektiert werden (Abbildung 24C und Abbildung 23A-B). Als Hauptprodukt wurde das 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) mit einer Ausbeute von 80 % nachgewiesen, während das zugehörige Epimer 9-OH- β -Cembrentriol (**8b**) nur mit einer Ausbeute von 9 % gebildet wurde (dr (**8a:8b**) 90:10). Die 10-OH- β -Cembrentriolen (**6a-b**) wurden als Nebenprodukte mit einer Ausbeute von 8 % gebildet. Die Zugabe des zweiten P450-BM3-Biokatalysators V78A/F87G zum Zeitpunkt 17 h, führte zur Hydroxylierung des 9-OH- β -Cembrentriols (**8a**) an Position C-10 zu den gewünschten 9,10-OH- β -Cembrenntetraolen (**10a-b**)

(Abbildung 23C). Nach 7 h wurde das 9-OH- β -Cembrenndiol (**8a**) zu 89 % umgesetzt und die 9,10-OH- β -Cembrenntetraole (**10a-b**) mit einer Ausbeute von 40 % (**10a**) und 43 % (**10b**) gebildet (dr (**10a:10b**) = 48:52). Eine Kontrollreaktion, bei der die P450-BM3-Mutante F87A/I263L und β -Cembrenndiol (**5**) für 24 h inkubiert wurde, zeigte keine der zweifach hydroxylierten β -Cembrenndiol-Produkte **10a-b** (Anhang: Tabelle 19). Es konnte daher zweifelsfrei bestätigt werden, dass die Hydroxylierung an Position C-10 von der P450-BM3-Mutante V78A/F87G katalysiert wird. Die sequentielle Kaskadenreaktion mit der P450-BM3-Mutante F87A/I263L als erstes und der P450-BM3-Mutante V78A/F87G als zweites Enzym ermöglichte die Synthese der gewünschten 9,10-OH- β -Cembrenntetraole (**10a-b**) mit einer Gesamtausbeute von 66 %.

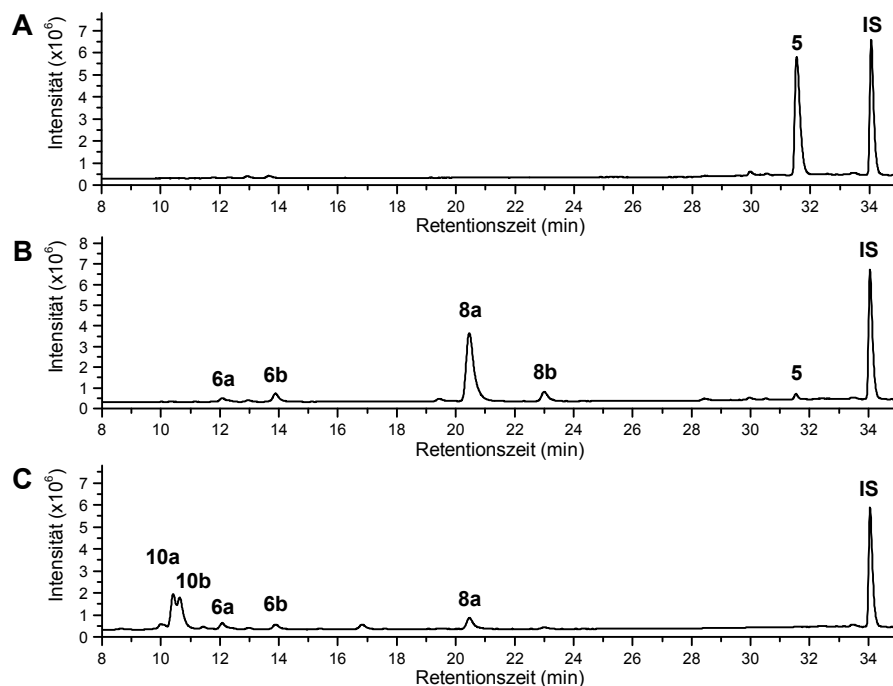


Abbildung 23. LC/MS-Chromatogramme der P450-BM3-katalysierten zweifachen Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (**5**) an den Zeitpunkten 0 h (A), 17 h (B) und 24 h (C). Die Oxidation wurde sequentiell durch die P450-BM3-Mutanten F87A/I263L (0-17 h) und V78A/F87G (17-24 h) katalysiert. Das Substrat β -Cembrenndiol (**5**) wurde bei einer Retentionszeit von 31,5 min, das Zwischenprodukt 9-OH- β -Cembrenndiol (**8a**) bei 20,5 min und die Endprodukte 9,10-OH- β -Cembrenntetraol (**10a-b**) bei 10,4 min und 10,6 min detektiert. Als Nebenprodukte wurden u.a. 9-OH- β -Cembrenndiol (**8b**) bei 23,0 min, sowie die 10-OH- β -Cembrenndiole (**6a-b**) bei 12,1 und 13,9 min detektiert. Der interne Standard (IS) hatte eine Retentionszeit von 34,0 min. Die Intensität ist als Totalionenstrom des positiven Ionisierungsmodus angegeben. Die Analytkonzentration der 24 h Probe (C) ist im Gegensatz zu den 0 h und 17 h Proben um den Faktor 1,1 verdünnt.

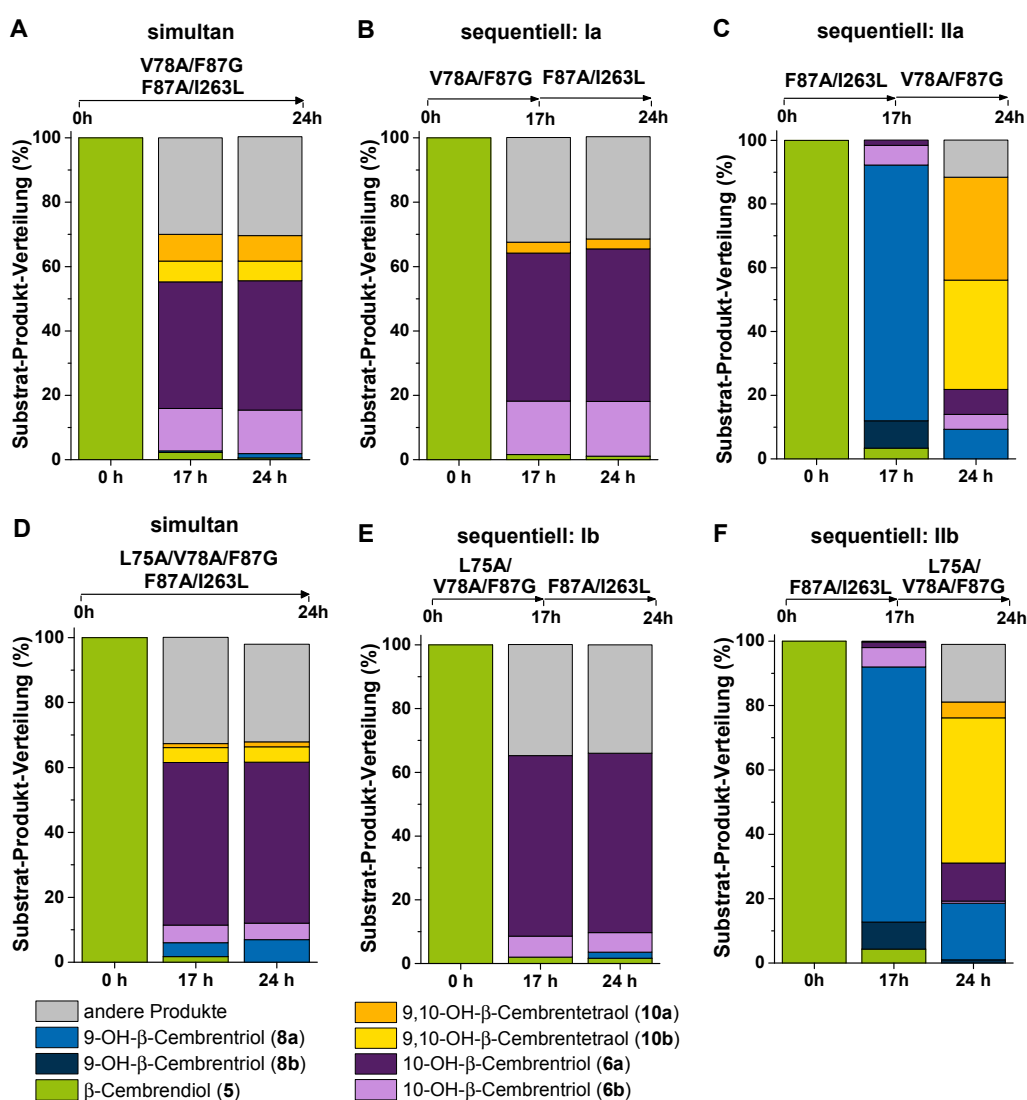


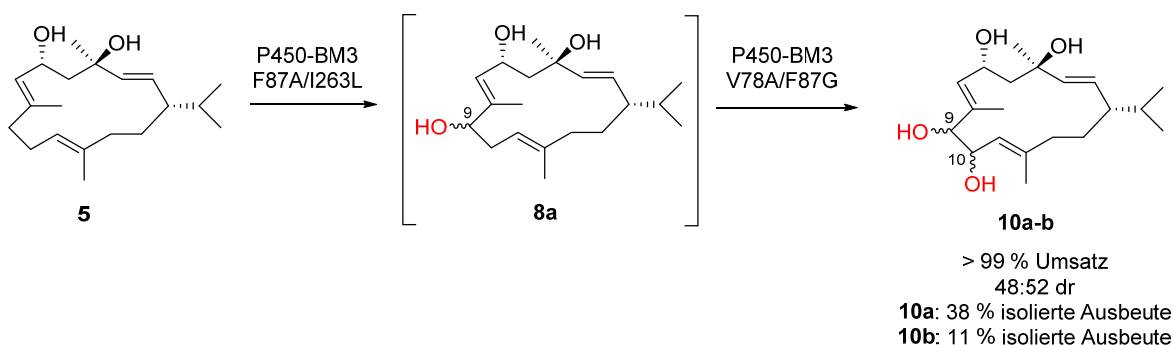
Abbildung 24. Substrat-Produkt-Verteilung der P450-P450-Kaskadenreaktionen zur zweifachen Oxidation von β -Cembrenliol (5). In A und D wurden die Reaktionen durch simultane Zugabe der P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und V78A/F87G (0-24 h) (A) bzw. L75A/V78A/F87G (0-24 h) (D) katalysiert. In B und E wurde die Reaktion sequentiell zunächst von der P450-BM3-Mutante V78A/F87G (B) bzw. L75A/V78A/F87G (E) (0-17 h) und anschließend von der P450-BM3-Mutante F87A/I263L (17-24 h) katalysiert. In C und F wurden die Reaktionen sequentiell durchgeführt, indem die Reaktion zunächst durch die P450-BM3-Mutante F87A/I263L (0-17 h) und anschließend durch die P450-BM3-Mutante V78A/F87G (C) bzw. L75A/V78A/F87G (F) (17-24 h) katalysiert wurden. Die Reaktionen wurden mit gereinigten Enzymen bei einer finalen P450-Konzentration von 2,5 μ M durchgeführt. In C und F sind die Mittelwerte von drei Experimenten, in A-B und D-E von zwei Experimenten dargestellt. Die Zahlenwerte der aufgeführten Ergebnisse inklusive Abweichungen sind im Anhang (Tabelle 19 und Tabelle 20) aufgeführt. Die 9-OH- bzw. 10-OH- β -Cembrentrirole (**8a-b**) sowie die 9,10-OH- β -Cembrentetraole (**10a-b**) stellen jeweils epimere Produkte dar.

Die sequentielle P450-P450-Kaskadenreaktion, die mit der Katalyse der P450-BM3-Mutante F87A/I263L startete, wurde anschließend mit der P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G als zweiten Katalysator durchgeführt (Reaktionsmodus: sequentiell IIb; Abbildung 24F). Die Tripelmutante war für den zweiten Oxidationsschritt hinsichtlich der Diastereoselektivität von **10a-b** optimiert worden. Die erste Oxidation des β -Cembrenliols (**5**) zum 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**), die von der P450-BM3-Mutante F87A/I263L katalysiert wurde, verlief wie oben beschrieben. Nachdem

nach 17 h der zweite Katalysator – die P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G – zugegeben wurde, konnte 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) in 7 h zu 77 % umgesetzt werden. Die Hydroxylierung an Position C-10 zu den 9,10-OH- β -Cembrentetraolen (**10a-b**) verlief mit Ausbeuten von 6 % (**10a**) und 56 % (**10b**). Während die Gesamtausbeute der Produkte **10a-b** mit 50 % im Vergleich zu der von den P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und V78A/F87G katalysierten Kaskadenreaktion geringer war, konnte die Ausbeute von **10b** um den Faktor 1,3 verbessert werden. Ebenso konnte das Diastereomerenverhältnis unter Verwendung der Tripelmutante von 42:52 (**10a:10b**) auf 10:90 zu Gunsten von **10b** erhöht werden.

4.2.4 Isolierung und Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte

Um eine Strukturaufklärung der isolierten Oxidationsprodukte zu ermöglichen, wurde die zweifache Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (**5**) in einem präparativen Maßstab durchgeführt. Hierzu wurde die Kaskadenreaktion sequentiell mit den P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und V78A/F87G durchgeführt. Aus der Analyse des Rohproduktes ergab sich ein Umsatz des β -Cembrenndiols (**5**) von über 99 %, während das Zwischenprodukt **8a** zu 9 % detektiert wurde. Die Oxidationsprodukte **10a-b** konnten mittels semipräparativer HPLC isoliert werden, wobei das Produkt **10a** nach einmaliger Chromatografie mit einer isolierten Ausbeute von 38 % und das Produkt **10b** nach zweimaliger Chromatografie mit einer isolierten Ausbeute von 11 % erhalten wurde (Schema 11).



Schema 11. Zweifache Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (5**) im präparativen Maßstab.** Zur Bestimmung des Umsatzes und des Diastereomerenverhältnisses (dr) wurde das Rohprodukt per LC/MS analysiert. Die Berechnung des Umsatzes basiert dabei auf dem Verhältnis des Substratsignals zu der Summe aus Substrat- und Produktsignalen. Die isolierte Ausbeute von **10a** wurde nach einmaliger Reinigung, die von **10b** nach einer zweimaligen Reinigung bestimmt (Kapitel 7.4.2). Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

Anschließend wurden die isolierten Produkte **10a-b** per NMR Spektroskopie und hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale wurde durch 2D-NMR-Analysen (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC und ^1H - ^{13}C -HMBC) ermöglicht (Kapitel 7.6.7-7.6.8 und 9.5.7-9.5.8). Beide Produkte **10a-b** zeigten im ^1H -NMR-Spektrum sieben Signale mit chemischen Verschiebungen im Bereich von 3,8 bis 5,8 ppm (Abbildung 25). Im Vergleich mit ^1H -NMR-Analysen der Vorstufen zeigten die Produkte **10a-b** im genannten Bereich zwei zusätzliche Signale im Vergleich zum β -Cembrenndiol (**5**) und ein zusätzliches Signal im Vergleich zu den β -Cembrentriolen (**6a-b** und **8a-b**) (Kapitel 3.2.5). Bei ^1H -NMR-Analysen von Cembrenndiol-

Derivaten wurden im Bereich höherer Resonanzfrequenzen Signale olefinischer Protonen oder Protonen in direkter Nachbarschaft zu Hydroxygruppen erwartet. Eine Epoxidierung konnte somit ausgeschlossen werden, da damit ein Verlust an olefinischen Protonen verbunden gewesen wäre. Im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum können benachbarte Protonen über Korrelationssignale identifiziert werden. Die Position der neu eingeführten Hydroxygruppe konnte somit über das zusätzliche ^1H - ^1H -Korrelationssignal aufgeklärt werden. Die Produkte **10a-b** zeigten im Bereich von 3,8 bis 5,8 ppm im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum vier Korrelationssignale, wobei bei einem Proton Korrelationssignale zu zwei verschiedenen Protonen detektiert wurden (Abbildung 25). Die Korrelationssignale können somit den Protonenpaaren H-2/H-3, H-6/H-7, H-9/H-10 und H-10/H-11 zugeordnet werden. Folglich muss die neue Hydroxylierung an Position C-10 stattgefunden haben. Die Produkte **10a-b** konnten somit als die epimeren (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraole mit unterschiedlicher Konfiguration an Position C-10 identifiziert werden. Sie unterscheiden sich jeweils in der vicinalen Kopplungskonstante zwischen den Atomen H-9 und H-10 (**10a**: $^3J_{9,10} = 7,6$ Hz und **10b**: $^3J_{9,10} = 3,3$ Hz).

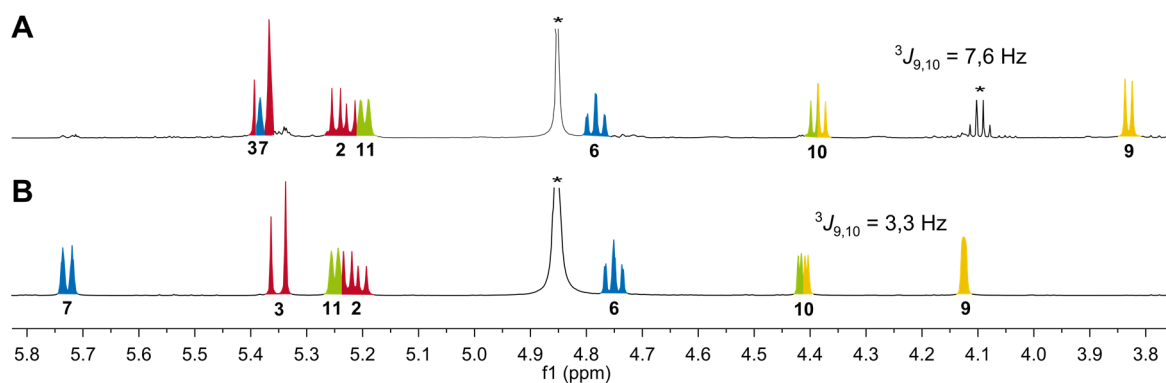
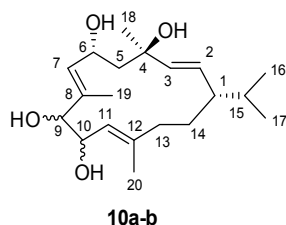


Abbildung 25. ^1H -NMR-Spektren von 9,10-OH- β -Cembrenetraol (**10a**) (A) und 9,10-OH- β -Cembrenetraol (**10b**) (B) im Bereich von 3,8-5,8 ppm. Unter den Signalen ist die Zuordnung zu den Protonen mittels ihrer Atomnummer aufgeführt. Korrelationssignale, die im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum detektiert wurden sind jeweils farbig dargestellt. Die ^1H -NMR-Spektren wurde in CD_3OD bei 600 MHz aufgenommen. Signale, die auf Lösungsmittel zurückzuführen sind, wurden mit einem Stern (*) markiert. Die vollständigen NMR-Daten von **10a-b** sind in den Kapiteln 7.6.7 und 7.6.8 aufgeführt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

4.3 Diskussion

Es konnte bereits gezeigt werden, dass P450-BM3-Mutanten geeignete Katalysatoren für die chemo-, regio- und stereoselektive Oxidation des makrozyklischen Diterpenoids β -Cembrenndiol (**5**) sind (Kapitel 3).¹⁵⁰ In einer weiterführenden Studie sollte untersucht werden, ob auch die höher funktionalisierten β -Cembrentriolen von P450-BM3-Mutanten oxidiert werden können und somit eine weitere Sauerstofffunktionalität in das diterpenoide Gerüst eingeführt werden kann.

Am Beispiel vom 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) wurde ein Screening von P450-BM3-Mutanten durchgeführt. Die Detektion verschiedener Produkte mit der Masse eines hydroxylierten 9-OH- β -Cembrentriols wie z.B. die 9,10-OH- β -Cembrentetraole (**10a-b**) bestätigte die Eignung von P450-BM3-Enzymen für die Oxidation eines dreifach oxidierten Cembranoids. Für das Screening wurde eine Auswahl aus P450-BM3-Mutanten mit Alanin- oder Glycinsubstitutionen an den Positionen L75, V78 und F87 verwendet. Hierbei zeigten im allgemeinen F87G-basierte Mutanten höhere Umsätze (24-54 %) im Vergleich zu den F87A-basierten Mutanten. Während zusätzliche Substitutionen an Position L75 zu den unbekanntesten Produkten (R_t 4,5 min, R_t 8,6 min und R_t 8,8 min) führten, konnten mit Substitutionen an Position V78 die Hydroxylierung des 9-OH- β -Cembrentriols (**8a**) an Position C-10 erreicht werden. Die höchste Regioselektivität für die Hydroxylierung an Position C-10 wurde mit der P450-BM3-Mutante V78A/F87G erzielt (98 %). Wenngleich die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87G katalysierte Reaktion in einem Diastereomerenverhältnis der 9,10-OH- β -Cembrentetraole (**10a-b**) von 50:50 nicht stereoselektiv verlief, konnte mit der zusätzlichen Einführung eines Alanins an Position 75 zur P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G das Diastereomerenverhältnis zu Gunsten des Produktes **10b** erhöht werden (11:89). Schon in vorangegangenen Studien wurden Alaninsubstitutionen zur Optimierung von P450-BM3 für die Oxidation sterisch anspruchsvoller Substrate angewendet.⁵⁶ Der Nutzen von Alanin- oder Glycinsubstitutionen konnte hier für die Oxidation eines makrozyklischen Diterpenoids gezeigt werden. Das Vorwissen über relevante Aminosäurepositionen für BM3-katalysierte Cembranoid-Oxidationen ermöglichte in nur drei Generationen und einer Anzahl von nur 12 verschiedenen Mutanten eine effektive und zielorientierte Enzymoptimierung.

Nachdem der Katalysator P450-BM3 sowohl für die regio- und stereoselektive Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (**5**) zum 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) als auch für die regioselektive Hydroxylierung vom 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) zum 9,10-OH- β -Cembrentetraol (**10a-b**) optimiert wurden, sollten beide Schritte miteinander kombiniert und eine zweistufige P450-P450-Kaskadenreaktion etabliert werden.

Der einfachste Reaktionsaufbau der P450-P450-Kaskadenreaktion wäre die simultane Zugabe beider P450-BM3-Mutanten zum Startpunkt der Reaktion gewesen. Dieser Aufbau führte jedoch nur zu einer geringen Ausbeute der zweifach hydroxylierten Produkte **10a-b** (15 %). Beide verwendeten P450-BM3-Mutanten akzeptieren das Substrat β -Cembrenndiol (**5**), wenngleich die P450-BM3-Mutante F87A/I263L eine Hydroxylierung an Position C-9 und die P450-BM3-Mutante V78A/F87G an Position C-10 katalysieren. Zwischen den konkurrierenden Enzymen setzte sich folglich die Mutante mit höherer Reaktionsgeschwindigkeit durch. Obwohl die Substratoxidationsraten nicht

explizit untersucht wurden, lassen die unterschiedlichen Umsätze von β -Cembrenliol (**5**) (F87A/I263L: 17 %; V78A/F87G: 67 %) eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit der P450-BM3-Mutante V78A/F87G vermuten. Bei simultaner Zugabe wird β -Cembrenliol (**5**) folglich größtenteils zu den 10-OH- β -Cembrentriolen (**6a-b**) umgesetzt. Das unveränderte Produktspektrum zwischen 17 h und 24 h zeigt, dass eine anschließende Hydroxylierung an Position C-9 nicht mehr möglich ist. Die Screeningergebnisse vom 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) legen nahe, dass das aktive Zentrum F87A-basierter Mutanten räumliche Limitierungen vorweist, die eine 10-OH- β -Cembrentriol (**6a-b**) Oxidation verhindern.

Bei der sequentiellen Kaskadenreaktion mit der P450-BM3-Mutante (L75/V78A/F87G) als erstes Enzym konnten wie erwartet die 10-OH- β -Cembrentriolen (**6a-b**) als Zwischenprodukt erhalten werden. Analog zu den Ergebnissen der simultanen Reaktion war eine anschließende von der P450-BM3-Mutante F87A/I263L katalysierte Hydroxylierung an Position C-9 nicht möglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedlichen räumlichen Verhältnisse in den aktiven Zentren der P450-BM3-Mutanten eine Passgenauigkeit für die verschiedenen Intermediate der Einzelschritte der Kaskadenreaktion besitzen. Der Einsatz der P450-BM3-Mutanten in entsprechender Reihenfolge war folglich Bedingung für eine erfolgreiche P450-P450-Kaskadenreaktion.

Bei der sequentiellen Kaskadenreaktion mit P450-BM3-F87A/I263L als erstes Enzym konnte die Oxidation des β -Cembrenliols (**5**) zum Zwischenprodukt 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) mit einer Ausbeute von 80 % katalysiert werden. Durch Zugabe der P450-BM3-Mutante V78A/F87G wurde anschließend eine Oxidation des Zwischenproduktes zu den 9,10-OH- β -Cembrentetraolen (**10a-b**) mit Ausbeuten von 40 % (**10a**) und 43 % (**10b**) erzielt. Bei Einsatz der P450-BM3-Tripelmutante L75A/V78A/F87G als Katalysator für den zweiten Oxidationsschritt konnte **10b** mit einer höheren Ausbeute (56 %) gewonnen werden.

Die Skalierung in einen präparativen Maßstab wurde mit den P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und V78A/F87G durchgeführt. Im Vergleich zum analytischen Maßstab, in dem die Kaskadenreaktion mit einer Gesamtausbeute von 66 % verlief, gelang die Kaskadenreaktion im präparativen Maßstab mit einer Gesamtausbeute von 49 %. Die Synthese der Substanzen 9,10-OH- β -Cembrentetraol (**10a-b**) sind nach aktuellem Kenntnisstand erstmalig beschrieben worden. Sobald in einem weiterführenden Experiment die absolute Konfiguration des Zwischenproduktes **8a** bestimmt wurde, kann aufgrund der relativen Bestimmung auch die absolute Konfiguration für die 9,10-OH- β -Cembrentetraole (**10a-b**) angegeben werden. β -Cembrenliol (**5**) zeigte bereits vielfältige biologische Aktivitäten und gilt daher als eine Substanz, die potentiell pharmakologisch von Interesse ist.^{138,147} Die hier beschriebene P450-Kaskadenreaktion zur Synthese der 9,10-OH- β -Cembrentetraole (**10a-b**) ermöglichte somit den Zugang zu bisher unbekanntem Cembrenliol-Derivaten, die möglicherweise verbesserte oder neuartige biologische Aktivität vorweisen.

Nach dem biomimetischen Modell von Baran und Mitarbeitern kann die Totalsynthese von Terpenoiden besonders effizient in zwei Phasen ausgeführt werden. Während in der ersten Phase ein nicht-funktionalisierter Zyklus synthetisiert werden soll, sollen in der zweiten Phase (der Oxidationsphase) die verschiedenen Sauerstoffunktionalitäten eingeführt werden. Die

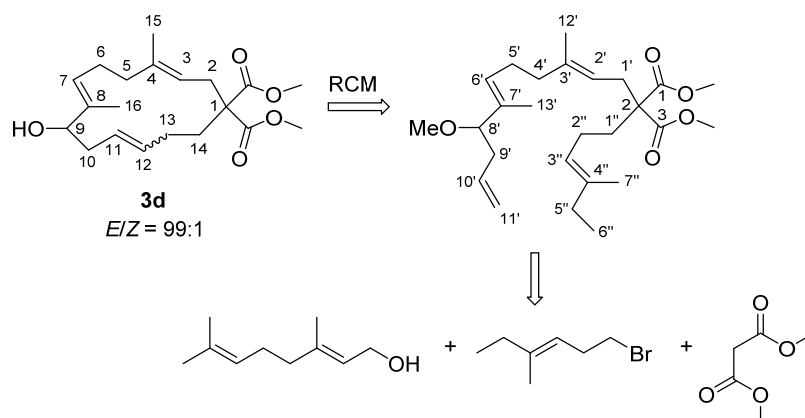
Herausforderung der Oxidationsphase ist dabei die geforderte hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität.¹⁰²

Das makrozyklische Diterpenoid β -Cembrenndiol (**5**) besitzt mit dreizehn potentiellen Hydroxylierungspositionen, worunter sich sieben allylische Positionen befinden, eine große Anzahl möglicher Oxidationsprodukten. In diesem Projekt gelang es in das zyklische Diterpenoid **5** regioselektiv zwei Hydroxygruppen an den benachbarten Positionen C-9 und C-10 einzuführen. Unter Verwendung verschiedener P450-BM3-Mutanten konnte die zweistufige Synthese der 9,10-OH- β -Cembrentetraolen (**10a-b**) als sequentielle Kaskadenreaktion etabliert werden. In diesem Eintopfprozess war eine Isolation des Intermediates nicht notwendig und ermöglichte somit eine einfache Reaktionsdurchführung. Es kann davon ausgegangen werden, dass im Vergleich zu zwei Einzelschrittreaktionen höhere Ausbeuten erzielt werden konnten. Die hier beschriebene artifizielle Kaskadenreaktion kann als Beispiel für eine erfolgreiche Oxidationsphase in der Synthese von sterisch anspruchsvollen makrozyklischen Terpenoiden verstanden werden und zeigt, dass mit Hilfe von maßgeschneiderten P450-BM3-Mutanten mehrere regio- und stereoselektive Oxidationen von komplexen Molekülen möglich sind.

5 Chemo- und regioselektive Oxidation eines synthetischen makrozyklischen Diterpenoids

5.1 Einleitung

Die Synthese des Diterpenoids (*3E,7E,11E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (**3d**) gelang T. Heidt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Laschat, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart) über ein acyclisches Tetraen mit einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen (Schema 12).¹²⁷ Das Tetraen konnte ausgehend von den drei Bausteinen Geraniol, 1-Brom-4-methylhex-3-en sowie Dimethylmalonat synthetisiert werden, die über Alkylierungsreaktionen miteinander verknüpft wurden. Schlüsselschritt der Totalsynthese von **3d** war jedoch die Zyklisierung des Tetraens, die über eine Ringschlussmetathese (RCM, *ring closing metathesis*) (*E*)-selektiv mit einer Ausbeute von 63 % gelang.¹²⁷



Schema 12. Retrosynthetische Analyse des (*3E,7E,11E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (3d**).** Die *E/Z*-Selektivität der Ringschlussmetathese-Reaktion (RCM) ist angegeben. Verändert nach Heidt *et al.*¹²⁷ Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

Ringschlussmetathese-Reaktionen werden häufig in der Synthese von makrozyklischen Naturstoffen angewendet.^{189,190} Hierbei wird eine acyclische Verbindung mit zwei Alkengruppen zu einem zyklischen Alken fusioniert, während die anderen beiden an der Reaktion beteiligten Kohlenstoffatome zu einem Alkenderivat verknüpft werden und als Nebenprodukt aus der Reaktion hervorgehen (Abbildung 26A).^{129,191} Ringschlussmetathesen werden mit Hilfe von Metallcarbenkomplexen katalysiert und sind somit organometallische Reaktionen. Dabei werden sterisch anspruchsvolle Molybdän- oder Rutheniumkatalysatoren verwendet, die die Reaktion über Metallcyclobutan-Zwischenstufen katalysieren.¹²⁹ In der Totalsynthese von **3d** wurde ein Ruthenium-Katalysator der zweiten Generation (Grubbs-II-Katalysator) verwendet (Abbildung 26B).¹²⁷

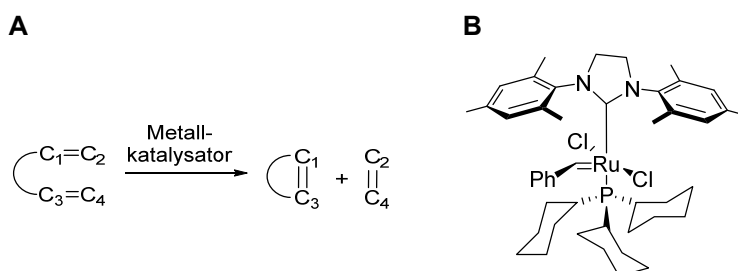


Abbildung 26. (A) Schema der Ringschlussmetathese Reaktion. (B) Darstellung des Grubbs-II-Katalysators als Beispiel eines für Ringschlussmetathesen verwendeten Metallkatalysators. Verändert nach Hoveyda und Zhugralin.¹²⁹

Eine häufige Nebenreaktion der Ringschlussmetathese stellt eine intermolekulare Addition zu einem Dimer dar. Im Fall von makrozyklischen Produkten, deren Ausgangsverbindungen mehr als zwei Doppelbindungen haben, kann zusätzlich eine Zyklisierung zu kleineren Ringen stattfinden. Für die Synthese des Diterpenoids **3d** konnte gezeigt werden, dass sowohl der Sauerstoffsubstituent an Position C-9 als auch die beiden Alkylreste an Position C-4' entscheidenden Einfluss auf die Minimierung der Nebenreaktionen haben.¹²⁷

In Kapitel 2 konnte gezeigt werden, dass das chemokatalytisch hergestellte makrozyklische Diterpenoid **3d** von der Monooxygenase P450-BM3 oxidiert wird. Unter allen getesteten Makrozyklen (**1-5**) führte die Oxidation des Makrozyklus **3d** zu der geringsten Anzahl an gebildeten Produkten. Der Makrozyklus **3d** wurde daher für die vorliegende Studie ausgewählt, um mit Hilfe von Enzymmutagenese die Reaktion hinsichtlich ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität zu optimieren.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Screening nach selektiven P450-BM3-Varianten

Für die Suche nach einer selektiveren P450-BM3-Mutante wurde eine Auswahl aus acht verschiedenen Mutanten mit Aminosäuresubstitutionen an den Positionen F87, L75 und V78 erstellt. Schon bei der Oxidation des diterpenoiden Makrozyklus β -Cembrendiol (**5**) hatten Glycin- oder Alaninsubstitutionen an diesen drei Positionen die Aktivität genauso wie die Regioselektivität der Reaktion entscheidend verbessern können (Kapitel 2).¹⁵⁰ Die Aminosäure F87 ist im B'-C Loop zentral über dem Porphyrinring lokalisiert und versperrt insbesondere großen Substraten den Zugang zum Hämeisen. Die Aminosäuren L75 und V78 der B'-Helix liegen ebenfalls in der Substratbindetasche oberhalb des Porphyrinrings und zeigen in Richtung des Hämeisens.⁴²

Während der P450-BM3-Wildtyp keine Aktivität gegenüber dem makrozyklischen Diterpenoid **3d** zeigte, bestätigte die Wiederholung der in Kapitel 2.2.2 aufgeführten F87G-katalysierten Oxidation unter anderen Reaktionsbedingungen den Umsatz von **3d** zu 33 % (Tabelle 9, Generation Ia). Es bildete sich das an Position C-5 hydroxylierte Produkt **11** (55%). Daneben konnten zwei weitere Produkte bei einer Retentionszeit von 11,4 min (24 %) und 11,7 min (21 %) detektiert werden, deren Strukturen nicht aufgeklärt wurden. Mit den Mutanten der zweiten F87G-basierten Generation (IIa), die zusätzliche Aminosäuresubstitutionen an Position L75 und V78 tragen, konnten im Vergleich zur

Ausgangsmutante höhere Umsätze (50-85 %) nachgewiesen werden. Eine leichte Steigerung der Selektivität für Produkt **11** (64 %) konnte jedoch nur mit der P450-BM3-Mutante V78A/F87G erzielt werden. Die P450-BM3-Mutante V78G/F87G bildete als einzige Mutante nicht hauptsächlich das Produkt **11**, sondern die Produkte bei einer Retentionszeit von 11,7 min (38 %) und 12,8 min (35 %) (Abbildung 27A).

Tabelle 9. Umsatz und Produktverteilung von 3d-Oxidationen verschiedener P450-BM3-Mutanten. Das Produkt **11** wurde bei einer Retentionszeit (R_t) von 10,4 min detektiert. Die Produkte mit einer Retentionszeit von 11,4 min, 11,7 min und 12,8 min zeigten eine Massendifferenz von +16 zum Substrat (LRMS). Die Experimente wurden mit zellfreiem *E. coli*-Extrakt (2,5 μ M finale P450-Konzentration) durchgeführt.

Generation	Aminosäure-substitution			Umsatz (%)	Produktverteilung (%)				
	L75	V78	F87		11	R_t 11,4 (min)	R_t 11,7 (min)	R_t 12,8 (min)	andere Produkte
Ia			G	33 \pm 8	55	24	21	-	-
IIa	A		G	85 \pm 5	54	14	-	-	32
IIa		G	G	72 \pm 4	17	-	38	35	10
IIa		A	G	50 \pm 5	64	13	16	7	-
Ib			A	25 \pm 7	100	-	-	-	-
IIb	A		A	87 \pm 5	75	9	-	-	16
IIb		G	A	88 \pm 1	90	-	-	5	5
IIb		A	A	81 \pm 2	87	7	-	-	6

Im Vergleich zur P450-BM3-Einfachmutante F87G konnte mit der P450-BM3-Einfachmutante F87A (Generation Ib) eine 100 %ige Selektivität für das Produkt **11** erzielt werden, obgleich der Umsatz von **3d** mit 25 % niedriger war. Die Einführung von zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen an Position L75 und V78 in die Ausgangsmutante F87A (Generation IIb) führte zu Erhöhungen der Aktivität um einen Faktor von mindestens drei (81-88 % Umsatz). Die höchsten Selektivitäten für Produkt **11** (87-90 %) konnten dabei mit einer Glycin- bzw. Alaninsubstitution an Position 78 erreicht werden. So konnte mit der P450-BM3-Mutante V78G/F87A bei einem Umsatz von 88 % das Produkt **11** mit einer Selektivität von 90 % erzielt werden (Abbildung 27B).

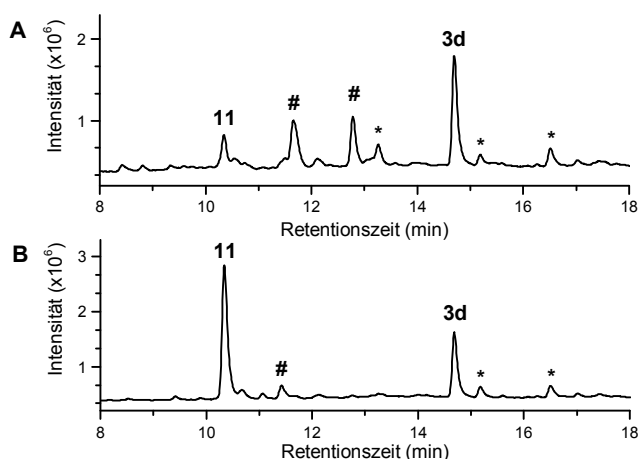
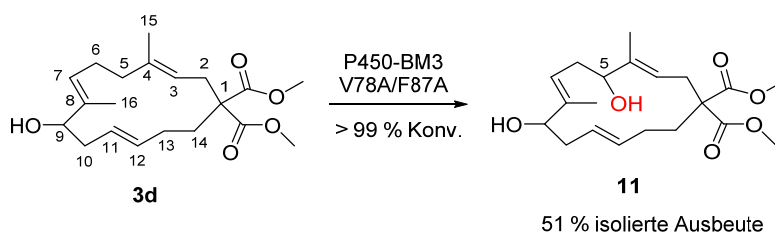


Abbildung 27. LC/MS-Chromatogramme der Oxidationen von dem Diterpenoid **3d**, die von den P450-BM3-Mutanten **V78G/F87G** (A) und **V78A/F87A** (B) katalysiert wurden. Das Substrat **3d** wurde bei einer Retentionszeit von 14,7 min und das Produkt **11** bei 10,4 min detektiert. Weitere Produkte (#) wurden bei Retentionszeiten von 11,4 min, 11,7 min und 12,8 min detektiert. Hintergrundsignale sind mit einem (*) gekennzeichnet. Die Intensität ist als Totalionenstrom des positiven Ionisierungsmodus angegeben.

5.2.2 Isolierung und Strukturaufklärung des Oxidationsproduktes

Für die selektive Oxidation von **3d** im präparativen Maßstab wurde die P450-BM3-Mutante **V78A/F87A** gewählt, die eine der besten Aktivitäten sowie Selektivitäten für das Produkt **11** vorwies. Die Oxidation des Diterpenoids **3d** gelang mit einem Umsatz > 99 %. Das gebildete Produkt **11** konnte mittels semipräparativer HPLC in einer Ausbeute von 51 % isoliert werden (Schema 13).



Schema 13. Selektive Oxidation des Diterpenoids **3d** im präparativen Maßstab. Die Reaktion wurde von der P450-BM3-Mutante **V78A/F87A** katalysiert. Die absolute Konfiguration des gebildeten Stereozentrums an Position C-5 wurde nicht bestimmt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

Eine NMR-spektroskopische sowie hochauflösende massenspektrometrische Analyse ermöglichte anschließend die Strukturaufklärung des Produktes **11**. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale wurde durch 2D-NMR-Analysen (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC) ermöglicht (Kapitel 7.6.9 und Kapitel 9.5.9). Die Auswertung der NMR-Analysen erfolgte durch T. Heidt, Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart.

Die Massenanalyse von **11** bestätigte den Einbau eines Sauerstoffatoms und ließ somit auf eine Hydroxylierung oder Epoxidierung des Substrates **3d** schließen. Im Vergleich zum Substrat **3d**¹²⁷ zeigte das Produkt **11** im ^1H -NMR-Spektrum im Bereich von 3.8-5.6 ppm ein zusätzliches Signal bei 4.15 ppm. Eine Epoxidierungsreaktion hätte zu einem Verlust eines olefinischen Protons und damit zum Verlust eines Signals im genannten Bereich von 3.8-5.6 ppm geführt und konnte somit

ausgeschlossen werden. Das Produkt **11** besaß im Vergleich zum Substrat folglich eine zusätzliche Alkoholgruppe, deren Position aufgeklärt werden sollte. Im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum, in dem Kopplungssignale über drei Bindungen entfernter Protonen sichtbar werden, zeigte das zusätzliche Signal bei 4.15 ppm kein Kopplungssignal zu den tieffeldverschobenen olefinischen Protonen oder dem Proton H-9. Die verbliebene mögliche allylische Hydroxylierungsposition war Position C-5, die in Nachbarschaft zum nicht protonierten Kohlenstoffatom C-4 lag. ^1H - ^1H -COSY-Kopplungssignale zwischen dem zusätzlichen Signal bei 4.15 ppm und den eindeutig zuordnungsbaaren Methylenprotonen an C-6 bestätigten, dass Produkt **11** eine Alkoholgruppe an C-5 besaß. Das Produkt **11** konnte somit als (3*E*,7*E*,11*E*)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester identifiziert werden. Die absolute Konfiguration des gebildeten Stereozentrums an Position C-5 wurde nicht bestimmt.

5.3 Diskussion

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der diterpenoide Makrozyklus **3d** von der P450-BM3-Mutante F87G zu vier verschiedenen Produkten oxidiert werden kann (Kapitel 2). In einer weiterführenden Studie sollte untersucht werden, ob die Selektivität dieser Reaktion über Enzymmutagenese weiter erhöht werden kann.

Für das Enzymscreening wurde eine Auswahl aus insgesamt acht verschiedenen P450-BM3-Mutanten erstellt. Die erste Mutantengeneration besaß eine Alanin- oder Glycinsubstitution an Position F87, während die zweite Generation eine zusätzliche Alanin- oder Glycinsubstitution an Position L75 oder V78 hatte. F87A-basierte Mutanten zeigten im Vergleich zu F87G-basierten Mutanten höhere Selektivitäten und bildeten dabei hauptsächlich das an Position C-5 hydroxylierte Produkt **11**. Im Gegensatz zur Einführung eines Alanins an Position 87, ermöglichte die Einführung eines Glycins an Position 87 dem Substrat **3d** eine höhere Flexibilität, sodass es im aktiven Zentrum des Enzyms mehrere Orientierungen relativ zum Hämeisen einnehmen konnte. Während die in Vorarbeiten angewendete P450-BM3-Mutante F87G eine Selektivität von 55 % für Produkt **11** zeigte, konnte die höchste Selektivität (90 %) mit der P450-BM3-Mutante V78G/F87A bei einem Umsatz von 88 % erreicht werden. Vorkenntnisse über relevante Aminosäurereste in P450-BM3-katalysierten Oxidationen von 14-gliedrigen Diterpenoiden ermöglichten somit bei minimalem Aufwand, aus einem nicht-aktiven Wildtypenzym Mutanten mit sehr guten Aktivitäten und Selektivitäten von bis zu 90 % zu entwickeln.

Der Makrozyklus **3d** enthält aufgrund seiner diterpenoiden Struktur eine Vielzahl an potentiellen Oxidationspositionen. Neben sieben allylischen und drei nicht-allylischen möglichen Hydroxylierungspositionen besitzt **3d** als Trien drei mögliche Epoxidierungspositionen (Abbildung 28). Eine chemo- und regioselektive Oxidation von **3d** stellte somit eine große Herausforderung dar. Dennoch gelang es mittels Enzymmutagenese die Zahl der gebildeten Produkte von vier auf ein Hauptprodukt zu reduzieren und das Diterpenoid **3d** mit einer Chemo- und Regioselektivität von 90 % an Position C-5 zu oxidieren. Über die Stereoselektivität dieser Oxidationsreaktion kann bisher keine Aussage getroffen werden.

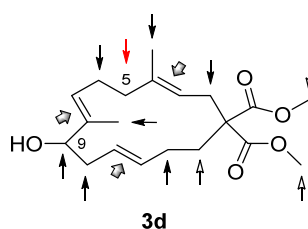


Abbildung 28. Potentielle Oxidationspositionen von 3d. Mögliche Positionen, an denen **3d** epoxidiert werden kann sind mit einem breiten Pfeil gezeigt. Mögliche Positionen an denen **3d** hydroxyliert werden kann sind mit dünnen Pfeilen markiert, wobei allylische Positionen mit einem ausgefülltem Pfeil und nicht-allylische Positionen mit einem nicht-ausgefülltem Pfeil dargestellt sind. Der rote Pfeil markiert die Oxidationsposition des detektierten Produkts **11**. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte abweichend von der IUPAC-Nomenklatur.

Das Substrat **3d** lag mit seinem Stereozentrum an Position C-9 als racemisches Gemisch vor. Mit der Hydroxylierung an Position C-5 wurde ein weiteres Stereozentrum eingeführt, demzufolge abhängig von der Stereoselektivität der Reaktion unterschiedliche stereoisomere Produkt(-gemische) erwartet wurden. Hierbei ist sowohl eine mögliche Stereoselektivität der Oxyfunktionalisierung selbst als auch eine mögliche Stereoselektivität gegenüber einem der enantiomeren Substrate zu berücksichtigen. Letzteres schien jedoch nicht vorzuliegen, da sonst bei einem maximal möglichen Umsatz von 50 % das verbliebene **3d**-Enantiomer detektiert worden wäre. Da die NMR- sowie HPLC-Analysen der **3d**-Oxidation keine Hinweise auf ein diastereomeres Produktgemisch ergaben, sind weitere Studien zur Bestimmung der absoluten Konfiguration an Position C-5 von **11** erforderlich. In weiteren Untersuchungen sollte die NMR-basierte Mosherester-Analyse durchgeführt werden.¹⁶⁰ Hierbei werden aus einem sekundären Alkohol mit Hilfe von chiralen Derivatisierungsreagenzien, wie z. B. α -Methoxy- α -(trifluormethyl)-phenyl-essigsäure, diastereomere Ester hergestellt, deren chemische Verschiebung sich deutlich voneinander unterscheiden. Die Veresterung eines Enantiomers mit chiralen Derivatisierungsreagenzien beider Konfigurationen, stellt eine Möglichkeit dar die absolute Konfiguration aufzuklären.^{161,162}

In dem vorliegenden Projekt konnte im Anschluss an eine chemisch katalysierte Totalsynthese des Makrozyklus **3d** eine enzymatisch katalysierte chemo- und regioselektive Einführung einer Alkoholgruppe realisiert werden. Die Synthese des oxyfunktionalisierten Makrozyklus **11** kann somit als erfolgreiches Beispiel für eine chemoenzymatische Synthese eines Cembranoid-Analogen betrachtet werden.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

14-Gliedrige Makrozyklen sind unter Naturstoffen weit verbreitete Verbindungen, die häufig eine diterpenoide Struktur mit mehreren nicht-konjugierten Doppelbindungen besitzen.⁹¹ Cembranoide bilden unter den 14-gliedrigen Makrozyklen eine spezifische Naturstoffklasse, die meist zusätzliche Sauerstoff enthaltende funktionelle Gruppen tragen und für eine Vielzahl an biologischen Aktivitäten bekannt sind.⁶⁰ Da Cembranoide im Allgemeinen schwer zugänglich sind, besteht ein fortwährendes Interesse an neuen Strategien zur Synthese dieser Verbindungen.

Inspiziert vom Terpenoid-Biosyntheseweg, haben organische Chemiker ein neues biomimetisches Syntheseverfahren für Terpenoide entwickelt. Im Gegensatz zu klassischen Syntheseverfahren, sollen dabei funktionelle Gruppen erst zu einem späten Zeitpunkt in der Synthese – im Anschluss an eine Zyklisierungsreaktion – eingeführt werden. Da hier ausgehend von einem zyklischen Gerüst verschiedene Zielprodukte erstellt werden sollen, ermöglicht dieses Syntheseprinzip eine einfache Generierung von Diversität.¹⁰¹ Die Durchführbarkeit dieser Strategie mit chemischen Methoden wird nach Baran und Mitarbeiter durch wenige vorhandene Möglichkeiten einer kontrollierbaren Oxidation von C-H-Bindungen eingeschränkt.¹⁰¹ Die Anwendung von Biokatalysatoren für die Funktionalisierung von Ringstrukturen, die im Vergleich zu chemischen Methoden höhere Regio-, Chemo- und Stereoselektivitäten vorweisen,^{192,193} stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit dar. In der vorliegenden Arbeit wurden Cytochrom-P450-Monooxygenasen für die Oxyfunktionalisierung von 14-gliedrigen Makrozyklen und Diterpenoiden eingesetzt werden.

In einem ersten Schritt konnte die P450-BM3-katalysierte Oxidation verschiedener 14-gliedriger Makrozyklen gezeigt werden (Kapitel 2). Neben synthetischen Derivaten der Zyklen Cyclotetradec-11-en (**1**), (3*E*,7*E*)-4,8-Dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien (**2**) oder (3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien (**3**) sind auch die Naturstoffe Isocembrol (**4**) und β -Cembrendiol (**5**) zu jeweils fünf bis über sechzehn verschiedenen Oxidationsprodukten umgesetzt worden. Die hohe Anzahl der gebildeten Produkte zeigte, dass die Oxidation eines wenig funktionalisierten Moleküls und der damit einhergehenden hohen Anzahl an möglichen energetisch gleichwertigen Oxidationspositionen eine Herausforderung darstellt und weitere Strategien zur Verbesserung der Selektivität erfordert. Die Oxidation von Substratvarianten unterschiedlicher Polarität zeigte, dass Sauerstoffatome einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität der Reaktion haben. Um ein grundlegendes Verständnis von der Funktion von polaren Gruppen zu erhalten, könnte in weiteren Studien über eine Kokristallisation die Wechselwirkungen von Enzym und Substrat identifiziert werden. Ebenfalls müsste in weiteren Studien ein möglicher Einfluss der (*E/Z*)-Konfiguration der Doppelbindung(en) auf die Selektivität genauso wie die Aktivität der Reaktion untersucht werden. Baran und Mitarbeiter haben in ihrem biomimetischen Syntheseverfahren das Zyklisierungsprodukt nach der synthetischen Zugänglichkeit genauso wie nach der Eigenschaft, als Grundgerüst für möglichst viele Oxidationsprodukte zu fungieren, ausgewählt.¹⁰¹ Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten vergleichenden Makrozyklusoxidationen zeigten, dass mit Substraten, die zusätzliche

funktionelle Gruppen besitzen und eine dirigierende Funktion übernehmen, höhere Selektivitäten erreicht werden können.

Der aus *Nicotiana tabacum* stammende Naturstoff β -Cembrenndiol (**5**) wurde für weitere Studien zur P450-BM3-katalysierten Oxyfunktionalisierung ausgewählt (Kapitel 3). Semirationales Proteindesign ermöglichte die Entwicklung von verschiedenen chemo-, regio- und stereoselektiven P450-BM3-Mutanten. In Abhängigkeit der verwendeten P450-BM3-Mutante konnten unterschiedliche oxidierte β -Cembrenndiol-Derivate hergestellt werden. Aufgrund der vielfältigen biologischen Aktivität von β -Cembrenndiol (**5**), besteht ein grundsätzliches Interesse an oxyfunktionalisierten Analoga.

Die in dieser Arbeit hergestellten 9- und 10-OH- β -Cembrentriolen (**6** und **8**) wurden bereits auf ihre neuroprotektive Wirkung gegenüber dem neurotoxischen Diisopropylfluorophosphat¹³⁸ und **6** ebenfalls auf ihre anti-proliferative Wirkung in den humanen metastasierenden Prostatazellen PC-3M getestet.¹³³ Wenngleich die 9- und 10-OH- β -Cembrentriolen (**6** und **8**) bei den getesteten Aktivitäten keine Verbesserung gegenüber dem β -Cembrenndiol (**5**) zeigten, konnte für **6** eine geringere Cytotoxizität gegenüber gesunden Zellen detektiert werden.^{133,138} Dies zeigt, dass Derivate, die selbst keine verbesserte biologische Aktivität vorweisen, dennoch aufgrund von modifizierten Eigenschaften eine Verbesserung darstellen können. Ebenso stellen neu eingeführte Alkoholgruppen Ausgangspunkt für verschiedene chemisch synthetisierbare Funktionalitäten und damit potentielle weiterentwickelte Derivate dar. Die biologischen Aktivitäten des hier produzierten (7*S*,8*S*)-Epoxy- β -cembrenndiols (**9**), genauso wie von den erstmals hergestellten 9,10-OH- β -Cembrenntetraolen (**10a-b**) ist bisher nicht untersucht worden.

Über geringfügige Unterschiede in der P450-BM3 Substratbindetasche gelang es die Selektivität der Reaktion entscheidend zu kontrollieren. Dennoch könnte die strukturelle Aufklärung von Enzym-Substrat-Komplexen zum grundlegenden Verständnis der Substrat dirigierenden Aminosäurereste beitragen. Darauf basierend könnte in weiteren Mutagenesestudien zum einen die Stereoselektivität der Hydroxylierungsreaktionen an Position C-9 und C-10 verbessert und zum anderen die Regioselektivität zu Gunsten anderer Position verschoben werden, um das Produktspektrum der P450-BM3-katalysierten β -Cembrenndiol-Oxidation zu erweitern.

Aufbauend auf diesen Studien gelang in einem nächsten Schritt die zweifache Hydroxylierung des Naturstoffs β -Cembrenndiol (**5**) in einer sequentiellen P450-P450-Kaskadenreaktion (Kapitel 4). Da Terpenoide häufig eine hohe Anzahl an Sauerstoffunktionalitäten aufweisen ist in dem biomimetischen Synthesekonzept eine Abfolge von Oxidationsreaktionen an verschiedenen Positionen vorgesehen. Neben den synthetisierten 9,10-OH- β -Cembrenntetraolen (**10a-b**) wäre auch die Herstellung von weiteren zweifach hydroxylierten Produkten denkbar gewesen. Auch hier könnten weitere Mutagenesestudien helfen, die Selektivität für die gebildeten Produkte, deren Strukturen nicht aufgeklärt werden konnte, zu verbessern und somit das Produktspektrum der P450-BM3-Biokatalysatoren zu erweitern. Die bereits realisierte zweifache Hydroxylierungsreaktion zeigt, dass selektive Biokatalysatoren für verschiedene Zielprodukte entwickelt werden können und

diese in einem einfach zu handhabenden Eintopfprozess mit hohen Ausbeuten kombiniert werden können. Maßgeschneiderte Cytochrom-P450-Enzyme stellen somit geeignete Biokatalysatoren für späte Oxyfunktionalisierungen dar und können erfolgreich in der biomimetischen Synthese von komplexen Terpenoiden angewendet werden.

Unter allen getesteten 14-gliedrigen Makrozyklen war das chemisch synthetisierte Diterpenoid **3d**, das eine polare Diester- sowie eine Alkoholgruppe besitzt, eines der am selektivsten umgesetzten Zyklen und wurde daher als geeignetes Zielprodukt der chemisch katalysierten Synthese ausgewählt. In einem weiteren Schritt wurde die Selektivität der anschließenden P450-BM3-katalysierten Hydroxylierung über Enzymmutagenese erhöht (Kapitel 5). So konnte das Diterpenoid **11** chemoenzymatisch über eine metallkatalysierte Ringschlussmetathesereaktion¹²⁷ mit anschließender selektiver Hydroxylierung, die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87A katalysiert wurde, hergestellt werden. Um dem diversitätsorientierten Syntheseprinzip der späten C-H-Oxyfunktionalisierung gerecht zu werden, wäre es wünschenswert, weitere P450-BM3 Mutanten mit anderer hoher Chemo- und Regioselektivität zu identifizieren und somit weitere oxidierte Analoga von **3d** herstellen zu können. Wenngleich bereits eine P450-BM3-Mutante (V78G/F87G) gefunden wurde, die neben dem Produkt **11** hauptsächlich die Bildung zwei weiterer Produkte katalysierte, muss die Chemo-, Regio und Stereoselektivität dieser P450-BM3-Mutante noch bestimmt werden. In weiterführenden Experimenten könnte über Enzymmutagenese die Selektivität für diese Produkte optimiert werden, um somit eine Produktidentifizierung zu ermöglichen.

7 Material und Methoden

Teile des folgenden Kapitels sind in ähnlicher Form bereits publiziert worden.

Abgedruckt mit Genehmigung von Le-Huu, P., Heidt, T., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Chemo-, regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid β -cembrenediol by P450 BM3. *ACS Catal.* 5, 1772-1780 (2015). Copyright 2015 American Chemical Society.

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien, Enzyme, Puffer

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth, Sigma-Aldrich, VWR, AppliChem, Merck, GERBU Biotechnik oder Carbosynth bezogen. Lösungsmittel für die LC/MS-Analyse wurden von Fisher Scientific (Methanol, Optima™ LC/MS) und Sigma Aldrich (Wasser, LC/MS Ultra Chromasolv®) erworben. β -Cembrenediol (**5**) wurde von LKT Laboratories und Cembren von ABCR bezogen. Die Makrozyklen 5-(Prop-1-en-2-yl)-cyclotetradec-1-en (**1a**), 1-(Cyclotetradec-4-en-1-yl)ethano-1-ol (**1b**), Cyclotetradec-4-en-1,1-diyldimethanol (**1c**), Dimethyl-cyclotetradec-4-en-1,1-dicarboxylat (**1d**), Dimethyl-(3*E*,7*E*)-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dicarboxylat (**2d**), ((3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-diyldimethanol (**3c**), Dimethyl-(3*E*,7*E*,11*E*)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dicarboxylat (**3d**), der interne Standard Cyclotetradec-4-en-1,1-diyldis(methylene)diacetat sowie die Referenzverbindungen (15-Oxabicyclo[12.1.0]pentadecan-4,4-diyldimethanol und Dimethyl-15-oxabicyclo[12.1.0]pentadecan-4,4-dicarboxylat wurden von unseren Kooperationspartnern – Frau Prof. Dr. Sabine Laschat und ihren Mitarbeitern (Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart) – synthetisiert und mir zur Verfügung gestellt.^{125–128} Isocembrol (**4**) habe ich dankend von Herrn Prof. Dr. Thomas Brück (Fachgebiet Industrielle Biokatalyse, Technische Universität München) erhalten.

Enzyme

Die Restriktionsendonuklease *DpnI* und die Q5®-DNA-Polymerase wurden von New England Biolabs, die Phusion®-DNA-Polymerase und die *Pfu*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific erworben. Katalase aus Rinderleber wurde von Sigma Aldrich bezogen. Die P450-BM3-Mutanten F87L, F87V, A74G/F87A, V78A/F87A/I263G waren bereits am Institut für Biochemie (Lehrstuhl II) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorhanden.

Puffer

TAE-Puffer (50x)	242 g	Tris
	57 ml	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	ad 1 l	dH ₂ O

DNA-Probenpuffer	2 g	Saccharose
	10 mg	Orange G
	ad 5 ml	dH ₂ O
TfbI	0,59 g	Kaliumacetat
	2,42 g	RbCl
	0,29 g	CaCl ₂
	2 g	MnCl ₂ x 5 H ₂ O
	30 ml	Glycerin
	ad 200 ml	dH ₂ O
	pH 5,8	mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren
TfbII	0,21 g	MOPS
	1,1 g	CaCl ₂
	0,12 g	RbCl
	15 ml	Glycerin
	ad 100 ml	dH ₂ O
	pH 6,5	mit NaOH einstellen, steril filtrieren

7.1.2 Stämme, Plasmide, Oligonukleotide

Bakterienstämme

Es wurden die Bakterienstämme *E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21(DE3) verwendet (Tabelle 10).

Tabelle 10. Charakteristika der hier verwendeten Bakterienstämme *E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21(DE3).

Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	F ⁻ supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1	Clontech
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)	Novagen

Plasmide¹⁵⁰

Die verwendeten Plasmide sind schematisch dargestellt (Abbildung 29 und Abbildung 30).

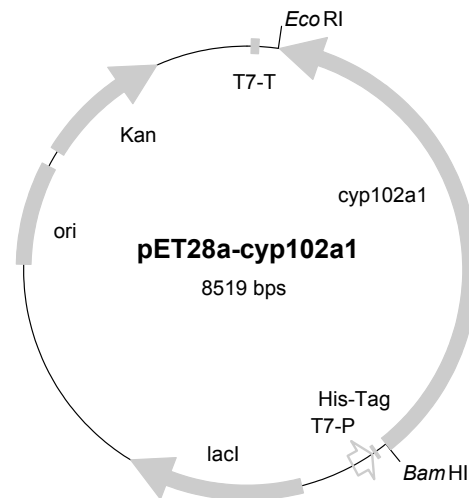


Abbildung 29. Plasmidkarte von pET-28a, der das P450-BM3 codierende *cyp102a1*-Gen aus *Bacillus megaterium* (GenBank J04832) enthält. Die Klonierung in den Vektor pET-28a zwischen den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* mit einem N-terminalen His-Tag wurde bereits beschrieben.¹⁹⁴ Der für die rekombinante Proteinexpression notwendige IPTG-induzierbare T7-Promotor (T7-P), der T7-Terminator (T7-T) sowie das Lactoserepressor codierende Gen (*lacI*) sind schematisch dargestellt. Die Plasmidselektion wird über das eingefügte Kanamycinresistenzgen (Kan) sichergestellt. Der Startpunkt für die Replikation (*ori*) ist gekennzeichnet.

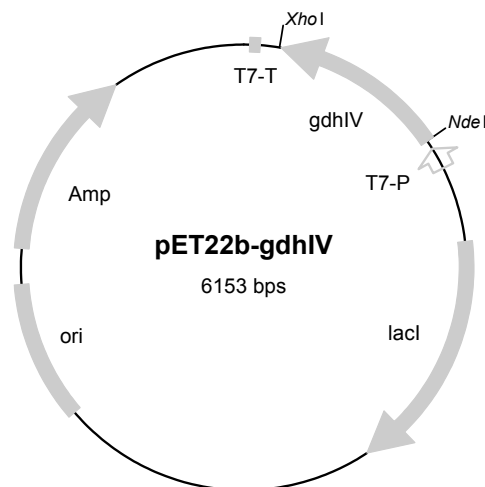


Abbildung 30. Plasmidkarte von pET-22b, der das Glucose-Dehydrogenase codierende *gdhIV*-Gen aus *Bacillus megaterium* (GenBank D10626)¹⁹⁵ enthält. Die Klonierung in den Vektor pET-22b zwischen den Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *NdeI* wurde bereits beschrieben.¹⁹⁶ Der für die rekombinante Proteinexpression notwendige IPTG induzierbare T7-Promotor (T7-P), der T7-Terminator (T7-T) sowie das den Lactoserepressor codierende Gen (*lacI*) sind schematisch dargestellt. Die Plasmidselektion wird über das eingefügte Ampicillinresistenzgen (Amp) sichergestellt. Der Startpunkt für die Replikation (*ori*) ist gekennzeichnet.

Oligonukleotide

Oligonukleotide, die für die ortsspezifische Mutagenese verwendet wurden sind in Tabelle 11 und solche, die für die Sequenzierung verwendet wurden in Tabelle 12 aufgelistet sind.

Tabelle 11. Für die ortsspezifische Mutagenese von P450-BM3 verwendeten synthetischen Oligonukleotide. Es wurden zusätzlich die entsprechenden revers-komplementären Oligonukleotide verwendet. Die veränderten Nukleobasen sind in rot dargestellt, während das geänderte Codon durch einen Unterstrich markiert ist.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
BM3_F87A	CAGGAGACGGGTTA <u>GCT</u> TACAAGCTGGACGC
BM3_F87G	GCAGGAGACGGGTTA <u>GGT</u> TACAAGCTGGACGCATG
BM3_L75A	CTTAAGTCAAGCG <u>GCT</u> AAAATTTGTACGTG
BM3_L75A(V78A)	CTTAAGTCAAGCG <u>GCT</u> AAAATTTGCACGTG
BM3_L75G	CTTAAGTCAAGCG <u>GGT</u> AAAATTTGTACGTG
BM3_L75S	CTTAAGTCAAGCG <u>AGT</u> AAAATTTGTACGTG
BM3_V78A	CAAGCGCTTAAATTT <u>GCA</u> CGTGATTTTGCAGG
BM3_V78G	CAAGCGCTTAAATTT <u>GGA</u> CGTGATTTTGCAGG
BM3_I263A	CTATCAAATTATTACATTCTTA <u>GCT</u> IGCGGGACACGAAACAACAAG
BM3_I263L	CTATCAAATTATTACATTCTTA <u>CTT</u> IGCGGGACACGAAACAACAAG
BM3_I263F	CTATCAAATTATTACATTCTTA <u>TTT</u> IGCGGGACACGAAACAACAAG
BM3_A264G	CATTCTTAATT <u>G</u> GGGACACGAAAC
BM3_A264V	CAAATTATTACATTCTTAATT <u>G</u> TGGGACACGAAACAACAAG
BM3_L437A	GCTGGATATTAAGAAACT <u>GCA</u> ACGTTAAAACCTGAAGGC
BM3_L437F	GCTGGATATTAAGAAACT <u>TTT</u> ACGTTAAAACCTGAAGGC
BM3_L437N	GAGCTGGATATTAAGAAACT <u>AAT</u> ACGTTAAAACCTGAAGGC

Tabelle 12. Für die Sequenzierung von P450-BM3 verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG
R2	GGAAAAGATCCAGAAACGGG
R3-5	CTTGGCGGTATTCCTTCAC
R-5	TTCAATTTGTCGACAGCGCC

7.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

7.2.1 Agarosegelelektrophorese und Bestimmung der DNA-Konzentration

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Proben in Abhängigkeit ihrer Größe wurde mit Hilfe eines Agarosegels (0,8 % (g/v) in TAE Puffer) durchgeführt. Zur späteren Visualisierung der DNA wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0,0001 % (g/v) versetzt. Zu 3 µl der DNA-Probe wurden 1 µl des DNA-Probenpuffers und 1 µl ddH₂O gegeben und neben dem Größenstandard GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus (Fermentas) auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 120 V für 35 min. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung eines UV-Transilluminators visualisiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte densitometrisch über die Bildanalyse-Software GeneTools (Syngene).

7.2.2 Ortsspezifische Mutagenese¹⁵⁰

Die ortsspezifische Mutagenese von P450-BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* wurde nach der Methode des QuikChange[®] Mutagenese Kits (Stratagene) durchgeführt. Als Matrize diente das Gen *cyp102a1* (GenBank J04832) zwischen den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI. Die gewünschten Mutationen wurden über zueinander komplementäre Oligonukleotide eingeführt (Tabelle 11). Für die Mutagenese-PCR wurde die Phusion-DNA-Polymerase[®], Q5[®]-DNA-Polymerase oder *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Der Standardreaktionsansatz sowie das in Abhängigkeit von der Polymerase verwendete Temperatur-Programm sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 13. Standardreaktionsansatz einer QuikChange[®]-PCR.

Komponente	Menge
Matrize	1 µl
Sinn-Oligonukleotid	10 pmol
Anti-Sinn-Oligonukleotid	10 pmol
Desoxyribonukleosidtriphosphat	je 20 µmol
DMSO	0-5 % (v/v)
Phusion –DNA-Polymerase [®] / Q5 [®] -DNA-Polymerase / <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	1 U / 1 U / 1,25 U
5x HF-Puffer / 5x Q5 [®] -Puffer / 10x <i>Pfu</i> -Puffer mit MgSO ₄	10 µl / 10 µl / 5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 14. Temperaturprogramm einer QuikChange[®]-PCR in Abhängigkeit der verwendeten Polymerasen.

Reaktionsschritt	Phusion Polymerase [®]		Q5 [®] -Polymerase		<i>Pfu</i> Polymerase	
	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)
1. Initiale Denaturierung	98	00:30	98	00:30	95	00:30
2. Denaturierung	98	00:30	98	00:10	95	00:30
3. Anlagerung	50-60	01:00	50-60	00:30	50-60	01:00
4. Elongation	72	04:20	72	04:20	72	16:20
5. Finale Elongation	72	10:00	72	02:00	72	10:00
Zyklische Wiederholung der Schritte 2-4	16-18 x		16-18 x		16 x	

Im Anschluss an die PCR wurde die parentale DNA durch Zugabe von 20 U der Restriktionsendonuklease *Dpn*I für 1 h bei 37 °C verdaut. RbCl-kompetente *E. coli*-DH5α-Zellen wurden mit 5 µl des *Dpn*I-behandelten PCR-Ansatzes transformiert. Die korrekte Einführung der Punktmutationen wurde durch eine Sequenzierung bei GATC Biotech bestätigt. Für eine vollständige Sequenzierung der Gen-Varianten von *cyp102a1* wurden die in Tabelle 12 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet.

7.2.3 Kultivierung von *E.-coli*-Zellen

Für die Anzucht von *E.-coli*-Zellen wurden Übernachtskulturen angesetzt. Zu 5 ml LB-Medium wurde je nach Resistenz des Plasmids 150 µg Kanamycin oder 500 µg Ampicillin gegeben, mit einer Kolonie einer Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

7.2.4 Herstellung chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E.-coli*-Zellen wurde mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. In einem 0,5-l-Kolben wurden 50 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur (1 % (v/v)) inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer O.D.₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (3220 g, 4 °C, 10 min). Das Zellpellet wurde in 20 ml TfbI-Lösung resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3220 g, 4 °C, 10 min) wurde das Zellpellet in 2 ml TfbII-Lösung resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte in Aliquots bei -80 °C.

7.2.5 Transformation von *E.-coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E.-coli*-Zellen wurden 0,5-1,0 µl Plasmid zu 10-50 µl chemisch-kompetenten *E.-coli*-Zellen gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 42 s wurden 70 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 1,0-1,5 h inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf einer LB-Agarplatte, die das entsprechende Antibiotika enthielt, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

7.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Übernachtskulturen aus *E.-coli*-DH5α-Zellen angefertigt. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem ZR Plasmid Miniprep™ – Classic Kit (ZymoResearch) nach Herstellerangaben. Abweichend davon wurde die Elution des Plasmids mit 50 µl ddH₂O durchgeführt.

7.2.7 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*¹⁵⁰

P450-BM3

Die heterologe Expression von P450-BM3-Wildtyp und Mutanten erfolgte in *E.coli*-BL21(DE3)-Zellen mit Hilfe des pET-28a-Expressionsvektor. Für eine Übernachtskultur wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie einer Agarplatte inokuliert und nach Zugabe von Kanamycin (30 µg/ml) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für das Screening von P450-BM3-Mutanten wurde die Proteinexpression im 50 ml Maßstab durchgeführt. In einem 0,5-l-Erlenmeyerkolben wurden 50 ml TB-Medium mit 1 % (v/v) einer Übernachtskultur inokuliert, mit Kanamycin (30 µg/ml) versetzt und bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (100 µM) induziert, mit FeSO₄ (100 µM) und 5-Aminolävulinsäure (500 µM) versetzt und für weitere 18-20 h bei 30 °C und 140 rpm geschüttelt. Für eine Reinigung der Proteine wurde die Expression bei gleichen

Bedingungen in einem Maßstab von 400 ml TB-Medium unter Verwendung von 2-l-Erlenmeyerkolben durchgeführt.

Glucose-Dehydrogenase (GDH)

Die heterologe Expression von GDH in *E.-coli*-BL21(DE3)-Zellen wurde mit dem pET-22b-Expressionsvektor unter Selektion durch Ampicillin ausgeführt. Die Proteinexpression erfolgte in 400 ml TB-Medium in 2-l-Erlenmeyerkolben. Nach Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) und einer Inokulation mit 1 % (v/v) einer Übernachtskultur wurden die Zellen bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (100 µM) induziert und weitere 16-22 h bei 25 °C und 140 rpm inkubiert.

7.2.8 Zellernte und Zellaufschluss¹⁵⁰

Die *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 11.325 g, 20 min) geerntet und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert. Nach Resuspension in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) und Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (100 µM) wurden die Zellen im Eisbad per Ultraschall aufgeschlossen (6 Zyklen einer Ultraschallsequenz von 45 s mit anschließender Ruhesequenz von mindestens 60 s). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (58.545 g, 30 min, 4 °C) entfernt. Für die Verwendung der Enzyme als zellfreies Extrakt wurde die lösliche Proteinfraction in Aliquots bei -20°C gelagert.

7.3 Biochemische Methoden

7.3.1 Proteinreinigung¹⁵⁰

Die Reinigung der Proteine erfolgte per FPLC (*fast protein liquid chromatography*) mit Hilfe des Gerätes ÄKTApurifier 100 (GE Healthcare Life Science). Es wurde eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC) mit zwei konsekutiven Nickel-Sepharose-Säulen (2x 5 ml His-Trap FF Crude, GE Healthcare) durchgeführt. Nachdem die Säulen mit 3 Säulenvolumen des Bindepuffers (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 500 mM NaCl) äquilibriert wurden, wurde die gefilterte (0,45 µm) lösliche Proteinfraction aufgetragen. Es folgten zwei Waschschrte mit je fünf Säulenvolumen des Bindepuffers sowie des Waschpuffers (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol). Das Zielprotein eluierte nach Durchlauf von fünf Säulenvolumen des Elutionspuffers I (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol). Die Detektion des Zielproteins P450-BM3 erfolgte über die Absorption bei 280 nm. Die gewünschten Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration über eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa bei 3.200 g und 4 °C konzentriert (Vivaspin (Turbo) 15, Sartorius). Es folgte eine Größenausschlusschromatografie über eine Sephadex-Säule (G-25, HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare). Nach Äquilibration der Säule mit 3 Säulenvolumen wurde die Proteinlösung aufgetragen und mit 1,5 Säulenvolumen des Elutionspuffers II (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin) eluiert.

7.3.2 Bestimmung der P450-Konzentration¹⁵⁰

Die P450-Konzentration wurde mittels CO-Differenzspektroskopie nach der Methode von Omura und Sato bestimmt.^{6,7} Die Proteinprobe wurde in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) verdünnt und auf zwei Küvetten (Referenz und Probe) aufgeteilt. Nach dem Nullabgleich im Zweistrahlphotometer, wurde die Probenküvette mit Kohlenstoffmonoxid begast. Unmittelbar vor der Absorptionsmessung wurde das Hämeisen sowohl der Probe als auch der Referenz durch Zugabe von Natriumdithionit (50 mM) reduziert. Anschließend wurden fünf konsekutive CO-Differenzspektren zwischen 400 und 500 nm aufgenommen und die P450-Konzentration nach Formel 1 berechnet. Da einige P450-BM3-Mutanten sensitiv gegenüber dem Reduktionsmittel waren und hauptsächlich einen Peak bei 420 nm zeigten, wurde die P450-Konzentration aus der Summe der Absorptionsdifferenzen zwischen 450 und 490 nm sowie zwischen 420 und 490 nm berechnet.

$$c(P450) = \frac{A_{450-490} \cdot F}{\varepsilon(450) \cdot d} + \frac{A_{420-490} \cdot F}{\varepsilon(420) \cdot d}$$

F = Verdünnungsfaktor
 ε = Extinktionskoeffizient
 (ε₄₅₀ = 91 mM⁻¹ cm⁻¹;
 ε₄₂₀ = 111 mM⁻¹ cm⁻¹)
 d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

(1)

7.3.3 Bestimmung der volumetrischen GDH-Aktivität¹⁵⁰

Die zur Kofaktorregenerierung eingesetzte GDH wurde hinsichtlich ihrer NADP⁺-Reduktase-Aktivität analysiert. Dabei wurde die NADPH-Bildung spektrophotometrisch durch die Absorptionsänderung bei 340 nm detektiert. In einem Gesamtvolumen von 1 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) wurde eine Reaktionslösung aus 100 mM Glucose und 100 µl zellfreiem *E.-coli*-Extrakt entsprechender Verdünnung verwendet. Durch Zugabe von NADP⁺ (0,1 mM finale Konzentration) wurde die Reaktion gestartet und über einen Zeitraum von 2 min verfolgt. Basierend auf der initialen Absorptionsänderung pro Zeit wurde die volumetrische Aktivität der GDH nach Formel 2 berechnet. Die Messungen wurden in mindestens 3-facher Bestimmung ausgeführt.

$$V = \frac{\Delta A \cdot F}{\varepsilon \cdot d}$$

V = volumetrische Aktivität [U/ml]
 F = Verdünnungsfaktor
 ΔA = Absorptionsänderung bei 340 nm [min⁻¹]
 ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm
 (ε₃₄₀ = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹)
 d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

(2)

7.3.4 Bestimmung der Kopplungseffizienz und der Substratoxidationsrate¹⁵⁰

Die Kopplungseffizienzen der P450-BM3-Mutanten wurden in einem Reaktionsvolumen von 200 µl in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) bei 25 °C bestimmt. Die Reaktionen enthielten 93-116 µM β-Cembrendiol (5), 0,13-1,75 µM gereinigtes P450-BM3 und 86-171 µM NADPH. Der NADPH-Verbrauch wurde photometrisch durch die Absorptionsänderung bei 340 nm verfolgt. Die exakte Menge des verbrauchten NADPHs wurde über die Absorptionsdifferenz zwischen dem Beginn und dem Ende der Reaktion bestimmt (ε₃₄₀ = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹). Nachdem das NADPH

vollständig verbraucht war, wurde der interne Standard Cyclotetradec-4-en-1,1-diylbis(methylene)diacetat (50 μM finale Konzentration) zugegeben und der Reaktionsansatz zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter reduziertem Druck konzentriert und die erhaltenen Rückstände für die LC/MS-Analyse in Methanol gelöst. Die exakte eingesetzte Substratkonzentration wurde in einer Kontrollreaktion ohne NADPH bestimmt. Nach jeder Oxidationsreaktion wurde die verbliebene absolute Konzentration von β -Cembrendiol (**5**) über eine Kalibrierung mittels internem Standard bestimmt. Die Kopplungseffizienz wurde über das Verhältnis zwischen der Stoffmenge des verbrauchten Substrates und der Stoffmenge des verbrauchten NADPHs berechnet. Die Substratoxidationsrate berechnete sich über die Stoffmenge des verbrauchten Substrates pro Stoffmenge der eingesetzten P450 und der Dauer, die für den NADPH-Verbrauch benötigt wurde. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf dreifach durchgeführten Experimenten.

7.4 P450-katalysierte Reaktionen

7.4.1 Reaktionen im analytischen Maßstab

Screening von P450-BM3-Varianten¹⁵⁰

Das Screening der P450-BM3-Mutantenkollektion wurde mit zellfreiem *E.-coli*-Extrakt durchgeführt. Als potentielle Substrate wurden die in Ethanol gelösten Substanzen β -Cembrendiol (**5**), 9-OH- β -Cembrentriol (**8a**) und der Makrozyklus **3d** getestet, wobei der Ethanolgehalt in der Reaktion maximal 2 % (v/v) betrug. Die Reaktionen wurden in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml (Substrat **5** und **3d**) oder 0,25 ml (**8a**) für 17 h bei 25 °C durchgeführt. Es wurden 2,5 μM P450-BM3, 100-200 μM NADPH und Substrat in einer Konzentration von 100 μM (**5** und **8a**) bzw. 200 μM (**3d**) eingesetzt. Zur Kofaktorregenerierung wurden 20 mM Glucose sowie 3-5 U/ml GDH eingesetzt. Ebenso wurden 600 U/ml Katalase verwendet, um Wasserstoffperoxid zu entfernen, das sich aufgrund von P450-Entkopplungsreaktionen bilden kann. Im Anschluss an die Reaktion wurde gegebenenfalls der interne Standard Cyclotetradec-4-en-1,1-diylbis(methylene)-diacetat (50 μM) zugegeben und die Reaktionslösung mit Ethylacetat (2x 300 μl) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter reduziertem Druck konzentriert und die Rückstände für die LC/MS-Analyse in Methanol gelöst. Gebildete Oxidationsprodukte wurden über ihre m/z-Werte identifiziert. Die Umsatzwerte basieren auf der Abnahme der Substratkonzentration relativ zu Kontrollreaktionen mit zellfreiem Extrakt von *E.-coli*-Zellen, die mit einem Leervektor transformiert wurden. Bei allen Kontrollreaktionen konnten keine Produkte detektiert werden. Die Analyse der Substratumsätze **5** und **3d** erfolgte ohne einen internen Standard, während für die Umsatzberechnung des Substrates **8a** ein interner Standard zur Normierung von Extraktionsfehlern verwendet wurde. Produktverteilungen wurden aufgrund der detektierten Peakflächen berechnet. Die Experimente wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt.

Zeitabhängige Oxidationen¹⁵⁰

Für die zeitabhängige Detektion der P450-BM3-katalysierten Oxidationen wurde im Unterschied zu den Screeningexperimenten gereinigtes Enzym verwendet. Die Standardreaktionslösung enthielt 1 μM P450-BM3, 200 μM Substrat, 200 μM NADPH, 600 U/ml Katalase, 20 mM Glucose und 3-5 U/ml GDH. Die Reaktionen wurden in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) bei 25 °C durchgeführt. Nach Abschluss der Reaktion wurde ein interner Standard zugegeben und die Reaktionen mit Ethylacetat extrahiert (2x 300 μl). Die vereinigten organischen Phasen wurden unter reduziertem Druck konzentriert und die erhaltenen Rückstände für die LC/MS- bzw. GC/MS-Analyse in Methanol gelöst.

Für die vergleichenden Oxidationen der Makrozyklen **1a-d**, **2d**, **3c-d**, **4** und **5** wurde die P450-BM3-Mutante F87G verwendet. Die Substrate wurden in Ethanol gelöst, wobei der finale Ethanolgehalt maximal 2 % (v/v) betrug. Je Substrat wurde eine Reaktionslösung angesetzt, der an den gewählten Reaktionszeitpunkten (0,5 und 23 h) ein Reaktionsvolumen von 500 μl entnommen wurde. Für die Substrate **1a-b** und **4** wurde Cembren (200 μM) und für die Substrate **1c-d**, **2d**, **3c-d** und **5** Cyclotetradec-4-en-1,1-diylbis(methylene)diacetat (50 μM) als interner Standard verwendet. Die Umsatzwerte basieren auf der Abnahme der Substratkonzentration relativ zu einer Kontrollreaktion mit Puffer statt P450. Die Experimente wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt.

Die Stereoselektivität der β -Cembrendiol-Oxidationen wurde ebenfalls bei unterschiedlichen Reaktionszeiten (0,5-24 h) untersucht. Für jede der P450-BM3-Mutanten F87A/I263L, V78A/F87A, L75A/F87G, L75S/F87G, und L75A/V78A/F87G wurde eine Reaktionslösung angesetzt, der zu definierten Zeitpunkten jeweils ein Volumen von 0,2 ml entnommen wurde. Es wurde der interne Standard Cyclotetradec-4-en-1,1-diylbis(methylene)diacetat (50 μM) verwendet. Nach jeder Oxidationsreaktion wurde die verbliebene absolute Konzentration von β -Cembrendiol (**5**) über eine Kalibrierung mittels internem Standard bestimmt, während die exakte eingesetzte Substratkonzentration in einer Kontrollreaktion ohne P450 bestimmt wurde. Aus der eingesetzten und verbliebenen Konzentration von **5** wurde der Umsatz berechnet. Produktverteilungen wurden auf Grundlage der detektierten Peakflächen berechnet. Die Experimente wurden in zweifacher Bestimmung durchgeführt.

P450-P450-Kaskadenreaktion

Eine Standardreaktion enthielt je 2,5 μM gereinigtes P450-BM3, 150 μM β -Cembrendiol (**5**), 200 μM NADPH, 600 U/ml Katalase, 20 mM Glucose und 3 U/ml GDH. Das Substrat **5** wurde in Ethanol gelöst, wobei der finale Ethanolgehalt maximal 2 % (v/v) betrug. Die Reaktionen wurden in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) bei 25 °C durchgeführt und mit Hilfe eines Wippschüttlers durchmischt. Die Kaskadenreaktionen wurden mit den beiden P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und V78A/F87G oder F87A/I263L und L75A/V78A/F87G durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Reaktionsmodi getestet, wobei die P450-BM3-Mutanten beide am Beginn der Reaktion (simultan) oder nacheinander (sequentiell) zu Beginn der Reaktion und nach 17 h zugefügt wurden. Der sequentielle Reaktionsmodus wurde mit beiden möglichen Enzymreihenfolgen untersucht. Es wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt, die nur mittels der P450-BM3-Mutante F87A/I263L über

einen Zeitraum von 24 h katalysiert wurde. Zu allen Reaktionen wurde nach 17 h erneut 20 mM Glucose und 3 U/ml GDH hinzugefügt. Für jeden Reaktionsmodus wurde eine Reaktionslösung angesetzt, der zu definierten Zeitpunkten (0 h (vor Zugabe des ersten Enzyms), 17 h (vor Zugabe des zweiten Enzyms) und 24 h) ein Reaktionsvolumen von 250 μ l entnommen wurde. Nach Zugabe des internen Standards Cyclotetradec-4-en-1,1-diylbis(methylene)diacetat (50 μ M finale Konzentration) wurden die Reaktionen mit Ethylacetat (2x 300 μ l) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter reduziertem Druck konzentriert und die erhaltenen Rückstände für die LC/MS-Analyse in Methanol gelöst. Die P450-P450-Kaskadenreaktionen wurden in zwei- bis dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Substrat-Produkt-Verteilung (Abbildung 24) basiert auf den detektierten Peakflächen, wobei die Summe aus Substrat- und Produktsignalen 100 % gesetzt wurde. Der Umsatz der Einzelschritte sowie die Einzelausbeuten wurden relativ zur Probe des vorangegangenen Zeitpunktes berechnet.

7.4.2 Reaktionen im präparativen Maßstab zur Produktisolierung

Einfache Oxidation von β -Cembreniol (**5**)¹⁵⁰

Für die einfache Oxidation von β -Cembreniol (**5**) im präparativen Maßstab wurden 1-2,5 μ M gereinigtes P450-BM3, 200 μ M NADPH, 200 μ M β -Cembreniol (**5**), 20 mM Glucose, 3-5 U/ml GDH und 600 U/ml Katalase eingesetzt. Es wurden mehrere Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von je 8 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) in 50 ml Plastikreaktionsgefäßen angesetzt. Die Reaktionen wurden für 6 h (P450-BM3-Mutante V78A/F87G) oder 19 h (P450-BM3-Mutante V78A/F87A und F87A/I263L) bei 25 °C durchgeführt und mit Hilfe eines Wippschüttlers durchmischt. Anschließend wurden die Reaktionen jeweils mit Ethylacetat extrahiert (3 x 5 ml) und die organischen Phasen aller Reaktionen vereinigt. Vor der Trocknung unter reduziertem Druck wurde den Rohextrakten eine Probe für eine LC/MS-Analyse entnommen. Für die chromatographische Umkehrphasentrennung im Methanol-Wasser-Gradienten, wurden die Rohprodukte in einer Methanolkonzentration von 83-100 % gelöst. Die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87G katalysierte Umsetzung von 19 mg β -Cembreniol (**5**) ergab **6a** als farblosen Feststoff (9,0 mg; 45 %) und **6b** als farbloses Öl (4 mg; 21 %). Die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87A katalysierte Umsetzung von 19 mg β -Cembreniol (**5**) ergab **9** als farbloses Öl (1,6 mg; 8 %) und **8a** als farbloses Öl (6 mg; 31 %). Die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87A katalysierte Reaktion wurde zweifach durchgeführt, um zusammen **9** in einer Menge von 3 mg zu erhalten. Die von der P450-BM3-Mutante F87A/I263L katalysierte Umsetzung von 17 mg β -Cembreniol (**5**) ergab **8b** als farbloses Öl (10 mg; 57 %).

Zweifache Hydroxylierung von β -Cembreniol (**5**)

Für die präparative P450-P450-Kaskadenreaktion zur zweifachen Hydroxylierung von β -Cembreniol (**5**) wurden je 2,0 μ M gereinigtes P450-BM3, 150 μ M NADPH, 150 μ M β -Cembreniol (**5**), 600 U/ml Katalase, 20 mM Glucose und 3-5 U/ml GDH verwendet. Es wurden mehrere Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von je 20 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) in 50 ml Plastikreaktionsgefäßen angesetzt. Die Reaktionen wurde nach Zugabe der P450-BM3-

Mutante F87A/I263L gestartet, bei 25 °C durchgeführt und mit Hilfe eines Wippschüttlers durchmischt. Nach 17 h wurden den Reaktionslösungen die P450-BM3-Mutante V78A/F87G sowie erneut 20 mM Glucose und 3-5 U/ml GDH zugegeben. Im Anschluss wurde die Reaktion für weitere 24 h inkubiert. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 41 h wurden die Reaktionen jeweils mit Ethylacetat extrahiert (4x 10 ml) und die organischen Phasen aller Reaktionen vereinigt. Vor der Trocknung unter reduziertem Druck wurde dem Rohextrakt eine Probe für eine LC/MS-Analyse entnommen. Für die chromatografische Trennung auf einer Normalphasensäule wurde das Rohprodukt in einem Heptan-Butanol-Gemisch (1:1) gelöst. Die zweifache Hydroxylierung von 40 mg β -Cembreniol (**5**) ergab **10a** als gelbes Öl (17 mg; 38 %) und **10b** (11 mg; 25 %; mit einer LC/MS-Reinheit von 84 %). Das Produkt **10b** wurde erneut per Chromatographie auf einer Umkehrphasensäule gereinigt und hierzu in einem Methanol-Wasser-Gemisch gelöst (80 % Methanol, 20 % Wasser). Nach der zweiten chromatografischen Trennung konnte **10b** als farbloses Öl (5 mg; 11 %) in hoher Reinheit (> 99 % per LC/MS) isoliert werden.

Oxidation von (3E,7E,11E)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (3d)

Für die Oxidation des synthetischen makrozyklischen Diterpenoids **3d** im präparativen Maßstab wurde 1 mM **3d**, 2,5-5,0 μ M gereinigtes P450-BM3-V78A/F87A, 200 μ M NADPH, 20 mM Glucose, 3-5 U/ml GDH und 600 U/ml Katalase verwendet. Es wurden mehrere Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von je 8 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) jeweils in 50 ml Plastikreaktionsgefäßen angesetzt. Die Reaktionen wurden für 16,0-17,8 h bei 25 °C durchgeführt und mit Hilfe eines Wippschüttlers durchmischt. Anschließend wurden die Reaktionen jeweils mit Ethylacetat extrahiert (3x 5 ml) und die organischen Phasen aller Reaktionen vereinigt. Vor der Trocknung unter reduziertem Druck wurde dem Rohextrakt eine Probe für eine LC/MS-Analyse entnommen. Für die chromatografische Trennung auf einer Umkehrphasensäule, wurde das Rohprodukt in einem Methanol-H₂O-Gemisch (67 % Methanol / 33 % H₂O) gelöst. Die von der P450-BM3-Mutante V78A/F87A katalysierte Umsetzung von 16,8 mg **3d** ergab **11** (9,0 mg; 51 %) als farblosen Feststoff.

7.5 Chemisch-analytische Methoden

7.5.1 LC/PDA-Analyse

Die Produktisolierung erfolgte mittels HPLC auf dem Gerät Prominence (Shimadzu). Die Substanzen wurden per UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 190 nm detektiert. Für die Umkehrphasenchromatographie wurde eine semipräparative Säule (Eurospher II C18, Knauer) mit einer Länge von 300 mm, einem Durchmesser von 8,0 mm, einer Porengröße von 100 Å und einer Partikelgröße von 10,0 μ m verwendet. Die Trennung wurde bei einer Flussrate von 5 ml/min durchgeführt. Es wurde ein Lösungsmittelgradient aus H₂O (A) und Methanol (B) verwendet (Tabelle 15).¹⁵⁰

Tabelle 15. Gradienten der Umkehrphasen-HPLC. Als Laufmittel wurden Methanol und H₂O verwendet, wobei nachfolgend nur die Methanolkonzentration angegeben wurde. Methode 1 wurde für die Chromatografie der einfachen Oxidation von β -Cembrenliol (5) und (3E,7E,11E)-9-Hydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (3d) verwendet, während Methode 2 für die Chromatografie der P450-P450-Kaskadenreaktion zur zweifachen Hydroxylierung von β -Cembrenliol (5) angewendet wurde.

Methode 1		Methode 2	
Zeit [min]	Methanol (%)	Zeit [min]	Methanol (%)
0,0	30	0,0	50
60,0	100	25,0	70
65,0	100	25,0	100
66,0	30	28,5	100
80,0	30	28,6	50
		34,0	50
Säulentemperatur: 30 °C		Säulentemperatur: 15 °C	

Für die Normalphasenchromatographie wurde eine MultoHigh[®]-Säule (CS Chromatographie Service) mit einer Länge von 250 mm, einem Durchmesser von 10 mm, einer Porengröße von 100 Å und einer Partikelgröße von 10 μ m verwendet. Die Trennung wurde bei einer Flussrate von 7 ml/min und einer Säulentemperatur von 25 °C durchgeführt. Es wurde ein Lösungsmittelgradient aus Heptan (A) und Butanol (B) verwendet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Gradient der Normalphasen-HPLC. Als Laufmittel wurde Heptan und Butanol verwendet, wobei nachfolgend nur die Butanolkonzentration angegeben wurde. Methode 1 wurde für die Chromatografie der zweifachen Hydroxylierung von β -Cembrenliol (5) verwendet.

Methode 1	
Zeit [min]	Butanol (%)
0,00	0
20,00	35
24,00	35
24,01	70
26,00	70
26,01	0
31,00	0

Die aufgetrennten Substanzen wurden automatisiert fraktioniert und gesammelt. Die gewünschten Fraktionen der Trennläufe wurden jeweils vereinigt, unter reduziertem Druck konzentriert und am Hochvakuum (Institut für Organische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) getrocknet.

7.5.2 LC/MS-Analyse¹⁵⁰

LC/MS-Analysen wurden auf dem Gerät Prominence/LC/MS 2020 (Shimadzu) und einer Chromolith[®]-Säule (RP-18e, Merck) mit einer Länge von 100 mm und einem Durchmesser von 4,6 mm gemessen. Die Analysen wurden bei einer Säulentemperatur von 30 °C und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Es wurden Lösungsmittelgradienten aus 0,1 % Ameisensäure (A) und Methanol (B) mit unterschiedlichen Verläufen verwendet (Tabelle 17).

Tabelle 17. Gradienten der LC/MS-Analysen. Als Laufmittel wurde Methanol und 0,1 % Ameisensäure verwendet, wobei hier nur die Methanolkonzentration angegeben wurde.

Methode 1		Methode 2	
Zeit [min]	Methanol (%)	Zeit [min]	Methanol (%)
0,0	30	0,0	50
20,0	100	25,0	70
22,5	100	35,0	100
23,5	30	37,0	100
28,0	30	37,5	50
		45,0	50

Die Massenspektrometrie erfolgte im dualen Ionisierungsmodus, bei der die Ionisation durch Elektrospray (ESI) mit einer chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) kombiniert wurde. In der ESI-Quelle betragen die Heizblocktemperatur 400 °C, die Desolvatisierungstemperatur 275 °C, die Spannung der Schnittstelle (Interface) 4,5 kV, während das Zerstäubergas mit einem Fluss von 1,5 l/min und das Trocknungsgas mit einem Fluss von 15 l/min eingestellt wurden. Es wurde sowohl der positive als auch der negative Scanmodus in einem Bereich von 200-500 m/z detektiert.

Die Kalibrierung von β -Cembrendiol wurde mit bekannten Analytkonzentrationen im Bereich von 10-200 μ M durchgeführt. Das Signal des Analyten wurde als Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des internen Standards ausgewertet. Hierbei ergab sich eine quadratische Abhängigkeit des Signals zur Analytkonzentration mit einem R^2 -Wert von 0,988.

Hochauflösende Massenspektrometrie-Analysen wurden auf dem Spektrometer UHR-TOF maXis 4G (Bruker Daltonik) im Analytik-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA) durchgeführt.

7.5.3 GC/MS-Analyse

Für die GC/MS-Analyse wurde das Gerät QP-2010 Plus (Shimadzu) und die Säule FS-Supreme-5ms (CS Chromatographie Service) mit einer Länge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 μ m verwendet. Als Trägergas kam Helium zum Einsatz. Die Injektor- sowie Interfacetemperatur betrug 300 °C, während die Temperatur der Ionenquelle 200 °C betrug. Es wurde wechselnd im SIM- sowie Scan-Modus im Bereich von 40-400 m/z gemessen, wobei die Analyse des Substratverbrauches über den SIM-Modus durchgeführt wurde. In Abhängigkeit der zu analysierenden Substanzen wurden unterschiedliche Temperaturprogramme verwendet (Tabelle 18).

Tabelle 18. Temperaturprogramm der GC/MS-Analysen. Die Methode 1 wurde zur Analyse der Oxidationen von **1a-b** und Methode 2 für die Analyse der Oxidationen von **4** verwendet.

Methode 1		Methode 2	
Zeit [min]	Temperatur (°C)	Zeit [min]	Temperatur (°C)
0,0	80	0,0	180
31,25	330	3,0	180
33,25	330	18,0	330
		23,0	330

7.5.4 NMR-Spektroskopie¹⁵⁰

1D- und 2D-NMR-Analysen wurden mit dem Spektrometer Avance III (Bruker) bei einer Messfrequenz von 150 MHz (¹³C-NMR) oder 600 MHz (¹H-NMR) durchgeführt. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm relativ zum Lösungsmittelsignal (¹H-NMR: $\delta = 7,26$ ppm; ¹³C-NMR: $\delta = 77,16$ ppm) oder zum internen Standard TMS angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von ¹H-¹H-COSY-, ¹H-¹³C-HSQC- und ¹H-¹³C-HMBC-Analysen. Kopplungskonstanten (J) sind in Hz aufgeführt. Für die Beschreibung der Multiplizität wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett). Alle NMR-Analysen wurden im Analytik-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA) durchgeführt.

7.5.5 Bestimmung der optischen Rotation¹⁵⁰

Die optische Rotation wurde mit dem Polarimeter 241 (Perkin Elmer) bei 589 nm (Natrium-D-Linie) in einem auf 20 °C temperierten Zylinder von 1 dm Länge durch Mehrfachbestimmung ermittelt. Die Analysen wurden an der Universität Stuttgart in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie durchgeführt.

7.6 Strukturaufklärung

7.6.1 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**)¹⁵⁰

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.80 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 17-H), 0.82 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 16-H), 1.25-1.32 (m, 1H, 14-H_a), 1.39 (s, 3H, 18-H), 1.45-1.49 (m, 1H, 15-H), 1.50 (s, 3H, 20-H), 1.52-1.60 (m, 2H, 1-H, 14-H_b), 1.70 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 19-H), 1.86 (dd, $J = 14.2, 8.9$ Hz, 1H, 5-H_a), 1.88-1.94 (m, 1H, 13-H_a), 1.99-2.06 (m, 2H, 5-H_b, 13-H_b), 2.07-2.25 (m, 4H, 9-H, 10-H), 4.77-4.81 (m, 1H, 6-H), 4.97-5.02 (m, 1H, 11-H), 5.21 (dd, $J = 15.6, 9.3$ Hz, 1H, 2-H), 5.26 (dq, $J = 9.6, 1.2$ Hz, 1H, 7-H), 5.39 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, 3-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 15.0 (C-20), 15.9 (C-19), 19.4 (C-17), 20.6 (C-16), 23.1 (C-10), 27.7 (C-14), 28.7 (C-18), 32.9 (C-15), 36.5 (C-13), 38.8 (C-9), 46.3 (C-1), 52.5 (C-5), 64.5 (C-6), 71.5 (C-4), 124.4 (C-11), 130.4 (C-2), 131.4 (C-7), 133.0 (C-12), 136.1 (C-3), 136.5 (C-8).

7.6.2 (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6a)¹⁵⁰

HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₃₄NaO₃ [M+Na]⁺ m/z: 345,2400; gefunden: 345,2397.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 0.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.27-1.36 (m, 1H, 14-H_a), 1.39 (s, 3H, 18-H), 1.42-1.48 (m, 1H, 1-H), 1.48-1.53 (m, 1H, 15-H), 1.60-1.67 (m, 1H, 14-H_b), 1.68 (s, 6H, 19-H, 20-H), 1.85 (dd, *J* = 14.4, 8.3 Hz, 1H, 5-H_a), 1.92 (td, *J* = 13.2, 4.0 Hz, 1H, 13-H_a), 2.02 (dd, *J* = 14.4, 1.3 Hz, 1H, 5-H_b), 2.05-2.15 (m, 2H, 9-H_a, 13-H_b), 2.57 (dd, *J* = 12.2, 5.2 Hz, 1H, 9-H_b), 4.46-4.53 (m, 1H, 10-H), 4.76 (ddd, *J* = 9.7, 8.3, 1.3 Hz, 1H, 6-H), 5.16-5.19 (m, 1H, 11-H), 5.21 (dd, *J* = 15.4, 9.1 Hz, 1H, 2-H), 5.31-5.33 (m, 1H, 7-H), 5.34 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, 3-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.6 (C-20), 16.3 (C-19), 19.4 (C-17), 20.4 (C-16), 27.1 (C-14), 28.5 (C-18), 33.0 (C-15), 36.2 (C-13), 46.4 (C-1), 48.8 (C-9), 52.2 (C-5), 64.1 (C-6), 64.6 (C-10), 71.4 (C-4), 128.0 (C-11), 130.3 (C-2), 133.1 (C-8), 133.4 (C-7), 136.2 (C-3), 140.3 (C-12).

7.6.3 (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6b)¹⁵⁰

[α]_D²⁰ +73 (c 0.1, CHCl₃).

HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₃₄NaO₃ [M+Na]⁺ m/z: 345,2400; gefunden: 345,2398.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.22 (brs, 1H, 4-OH), 1.25 (brs, 1H, 10-OH), 1.30 (brs, 1H, 6-OH), 1.37 (s, 3H, 18-H), 1.35-1.41 (m, 1H, 14-H_a), 1.47-1.53 (m, 1H, 15-H), 1.57-1.62 (m, 1H, 14-H_b), 1.69 (s, 3H, 20-H), 1.69-1.75 (m, 2H, 1-H, 5-H_a), 1.85 (s, 3H, 19-H), 1.95-2.02 (m, 1H, 13-H_a), 2.02-2.09 (m, 2H, 5-H_b, 13-H_b), 2.25 (dd, *J* = 15.4, 8.1 Hz, 1H, 9-H_a), 2.37-2.43 (m, 1H, 9-H_b), 4.63-4.68 (m, 1H, 10-H), 4.83 (ddd, *J* = 9.9, 9.1, 1.8 Hz, 1H, 6-H), 5.03-5.07 (m, 1H, 7-H), 5.22 (dd, *J* = 15.7, 9.4 Hz, 1H, 2-H), 5.30 (dq, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, 11-H), 5.40 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, 3-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 16.9 (C-20), 19.40 (C-19), 19.41 (C-17), 20.3 (C-16), 28.0 (C-14), 29.3 (C-18), 33.4 (C-15), 38.2 (C-13), 45.6 (C-9), 47.0 (C-1), 52.2 (C-5), 64.4 (C-6), 66.6 (C-10), 71.4 (C-4), 127.4 (C-11), 130.3 (C-2), 131.0 (C-7), 135.5 (C-8), 136.1 (C-3), 138.5 (C-12).

7.6.4 (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (8a)¹⁵⁰

[α]_D²⁰ +103 (c 0.1, CHCl₃).

HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₃₄NaO₃ [M+Na]⁺ m/z: 345,2400; gefunden: 345,2397.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 0.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.24-1.32 (m, 1H, 14-H_a), 1.39 (s, 3H, 18-H), 1.50 (s, 3H, 20-H), 1.45-1.59 (m, 3H, 1-H, 14-H_b, 15-H), 1.71 (s, 3H, 19-H), 1.89-1.96 (m, 3H, 5-H_a, 13-H_a, OH), 1.99-2.04 (m, 1H, 13-H_b), 2.05-2.10 (m, 1H, 5-H_b), 2.33-2.44 (m, 2H, 10-H), 4.17-4.23 (m, 1H, 9-H), 4.83-4.88 (m, 1H, 6-H), 4.97-5.03 (m, 1H, 11-H), 5.20 (dd, *J* = 15.6, 9.2 Hz, 1H, 2-H), 5.34 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, 3-H), 5.59-5.64 (m, 1H, 7-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 15.1 (C-19), 15.2 (C-20), 19.4 (C-17), 20.6 (C-16), 27.6 (C-14), 28.7 (C-18), 30.8 (C-10), 32.9 (C-15), 36.6 (C-13), 46.2 (C-1), 52.7 (C-5), 64.0 (C-6), 71.5 (C-4), 73.1 (C-9), 119.3 (C-11), 128.7 (C-7), 130.6 (C-2), 134.9 (C-12), 136.0 (C-3), 137.9 (C-8).

7.6.5 (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (8b)¹⁵⁰

$[\alpha]_D^{20} +149$ (c 0.1, CHCl₃).

HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₃₄NaO₃ [M+Na]⁺ m/z: 345,2400; gefunden: 345,2399.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.23-1.31 (m, 1H, 14-H_a), 1.38 (s, 3H, 18-H), 1.51 (s, 3H, 20-H), 1.45-1.60 (m, 3H, 1-H, 14-H_b, 15-H), 1.70 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, 19-H), 1.76-1.91 (m, 3H, 5-H_a, 13-H_a, OH), 1.99-2.07 (m, 2H, 5-H_b, 13-H_b), 2.21-2.29 (m, 1H, 10-H_a), 2.31-2.38 (m, 1H, 10-H_b), 2.53 (brs, 2H, 2 x OH), 4.13 (dd, *J* = 11.3, 5.5 Hz, 1H, 9-H), 4.64-4.71 (m, 1H, 11-H), 4.81 (ddd, *J* = 10.0, 8.3, 1.2 Hz, 1H, 6-H), 5.22 (dd, *J* = 15.7, 9.1 Hz, 1H, 2-H), 5.34 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, 3-H), 5.39 (dq, *J* = 9.7, 1.4 Hz, 1H, 7-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.9 (C-19), 15.3 (C-20), 19.4 (C-17), 20.5 (C-16), 27.5 (C-14), 28.5 (C-18), 31.5 (C-10), 32.8 (C-15), 36.2 (C-13), 46.2 (C-1), 52.2 (C-5), 63.9 (C-6), 71.9 (C-4), 78.5 (C-9), 120.7 (C-11), 130.8 (C-2), 132.9 (C-7), 134.4 (C-12), 135.8 (C-3), 137.5 (C-8).

7.6.6 (1S,2E,4R,6R,7S,8S,11E)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (9)¹⁵⁰

$[\alpha]_D^{20} +71$ (c 0.1, CHCl₃).

HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₃₄NaO₃ [M+H]⁺ m/z: 345,2400; gefunden: 345,2400.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.35 (s, 3H, 19-H), 1.45 (s, 3H, 18-H), 1.36-1.47 (m, 2H, 9-H_a, 14-H_a), 1.53 (s, 3H, 20-H), 1.47-1.54 (m, 1H, 15-H), 1.56-1.65 (m, 2H, 1-H, 14-H_b), 1.88 (dd, *J* = 14.9, 4.9 Hz, 1H, 5-H_a), 1.90-1.95 (m, 1H, 13-H_a), 1.99-2.05 (m, 1H, 9-H_b), 2.05-2.08 (m, 1H, 13-H_b), 2.08-2.12 (m, 2H, 5-H_b, 10-H_a), 2.16-2.25 (m, 1H, 10-H_b), 2.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 7-H), 3.99 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 3.7 Hz, 1H, 6-H), 4.99-5.06 (m, 1H, 11-H), 5.26 (dd, *J* = 15.7, 9.4 Hz, 1H, 2-H), 5.49 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, 3-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.6 (C-20), 17.4 (C-19), 19.9 (C-17), 20.4 (C-16), 22.9 (C-10), 28.3 (C-14), 28.8 (C-18), 32.2 (C-15), 36.0 (C-13), 36.7 (C-9), 46.6 (C-1), 50.0 (C-5), 63.4 (C-8), 64.9 (C-6), 68.9 (C-7), 71.5 (C-4), 123.5 (C-11), 131.3 (C-2), 135.2 (C-12), 136.9 (C-3).

Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.¹⁵²

7.6.7 (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10a)

HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₃₄NaO₄ [M+Na]⁺ m/z: 361,2349; gefunden, 361,2354.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.33 (s, 3H, 18-H), 1.36-1.45 (m, 1H, 14_a-H), 1.55-1.48 (m, 1H, 15-H), 1.59-1.66 (m, 1H, 14-H_b), 1.68 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, 20-H), 1.72 (dd, *J* = 13.8, 9.6 Hz, 1H, 5-H_a), 1.80-1.74 (m, 1H, 1-H), 1.89 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, 19-H), 1.98-2.01 (m, 1H, 5-H_b), 1.97-2.04 (m, 1H, 13-H_a), 2.14-2.06 (m, 1H, 13-H_b), 3.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, 9-H), 4.39 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 1H, 10-H), 4.78 (td, *J* = 9.6, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 5.20 (dq, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H, 11-H), 5.23 (dd, *J* = 15.7, 9.1 Hz, 1H, 2-H), 5.36-5.39 (m, 1H, 7-H), 5.38 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, 3-H).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 17.39 (C-20), 18.27 (C-19), 19.85 (C-17), 20.74 (C-16), 29.31 (C-18/C-14), 29.34 (C-14/C-18), 34.88 (C-15), 39.46 (C-13), 48.02 (C-1), 54.19 (C-5), 64.97 (C-6), 71.53 (C-10), 72.04 (C-4), 79.13 (C-9), 125.06 (C-11), 131.23 (C-2), 132.33 (C-7), 137.53 (C-3), 137.77 (C-8), 140.54 (C-12).

7.6.8 (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10b)

HRMS (ESI) berechnet für $C_{20}H_{34}NaO_4$ $[M+Na]^+$ m/z: 361,2349; gefunden, 361,2345.

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 0.84 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 17-H), 0.86 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 16-H), 1.27-1.35 (m, 1H, 14- H_a), 1.36 (s, 3H, 18-H), 1.48-1.54 (m, 2H, 15-H, 1-H), 1.67 (s, 6H, 19-H, 20-H), 1.65-1.71 (m, 1H, 14- H_b), 1.84 (dd, J = 14.1, 8.6 Hz, 1H, 5- H_a), 1.97 (td, J = 13.4, 4.1 Hz, 1H, 13- H_a), 2.02 (dd, J = 14.1, 1.6 Hz, 1H, 5- H_b), 2.09-2.15 (m, 1H, 13- H_b), 4.12 (dq, J = 3.3, 0.8 Hz, 1H, 9-H), 4.41 (dd, J = 7.3, 3.3 Hz, 1H, 10-H), 4.75 (ddd, J = 10.1, 8.5, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 5.21 (dd, J = 15.6, 9.0 Hz, 1H, 2-H), 5.25 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 11-H), 5.35 (d, J = 15.6 Hz, 1H, 3-H), 5.73 (d, J = 10.1 Hz, 1H, 7-H).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 14.89 (C-19/C-20), 15.09 (C-20/19), 20.01 (C-17), 20.83 (C-16), 28.41 (C-14), 29.01 (C-18), 34.67 (C-15), 37.59 (C-13), 47.84 (C-1), 54.38 (C-5), 64.59 (C-6), 68.40 (C-10), 72.02 (C-4), 77.62 (C-9), 124.68 (C-11), 130.54 (C-7), 130.77 (C-2), 135.38 (C-8), 137.96 (C-3), 141.32 (C-12).

7.6.9 (3E,7E,11E)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäure-dimethyl-ester (11)

$[\alpha]_D^{20}$ -16 (c 1, $CHCl_3$).

HRMS (ESI) berechnet für $C_{20}H_{30}NaO_6$ $[M+Na]^+$ m/z: 389,1935; gefunden: 389,1934.

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.52-1.57 (m, 1H, 14- H_a), 1.61 (s, 6H, 15-H, 16-H), 1.61-1.65 (m, 1H, 13- H_a), 1.68-1.76 (m, 1H, 13- H_b), 2.06-2.12 (m, 1H, 14- H_b), 2.12-2.17 (m, 1H, 10- H_a), 2.23-2.29 (m, 1H, 10- H_b), 2.29-2.35 (m, 1H, 6- H_a), 2.49-2.57 (m, 1H, 6- H_b), 2.57-2.62 (m, 1H, 2- H_a), 2.91 (dd, J = 15.8, 10.6 Hz, 1H, 2- H_b), 3.72 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.74 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.90 (dd, J = 10.4, 5.2 Hz, 1H, 9-H), 4.15 (dd, J = 10.6, 4.6 Hz, 1H, 5-H), 4.93-4.98 (m, 1H, 11-H), 4.98-5.02 (m, 1H, 7-H), 5.05-5.09 (m, 1H, 3-H), 5.43 (ddd, J = 15.3, 8.7, 4.5 Hz, 1H, 12-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 10.3 (C-16), 10.5 (C-15), 26.4 (C-13), 29.8 (C-2), 32.0 (C-14), 32.7 (C-6), 36.0 (C-10), 52.7 (CO_2CH_3), 52.8 (CO_2CH_3), 56.1 (C-1), 78.0 (C-5), 79.6 (C-9), 122.7 (C-3), 123.0 (C-7), 126.8 (C-11), 131.4 (C-12), 136.4 (C-8), 139.8 (C-4), 172.0 (CO_2CH_3), 173.3 (CO_2CH_3).

8 Literatur

1. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 6th ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2011).
2. Bornscheuer, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185-194 (2012).
3. Turner, N. J. & O'Reilly, E. Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 285-288 (2013).
4. Podust, L. M. & Sherman, D. H. Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1251-1266 (2012).
5. Roduner, E. *et al.* Selective catalytic oxidation of C-H Bonds with molecular oxygen. *ChemCatChem* **5**, 82-112 (2013).
6. Omura, T. & Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378 (1964).
7. Omura, T. & Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379-2385 (1964).
8. Guengerich, F. P. & Munro, A. W. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *J. Biol. Chem.* **288**, 17065-17073 (2013).
9. McIntosh, J. A., Farwell, C. C. & Arnold, F. H. Expanding P450 catalytic reaction space through evolution and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 126-134 (2014).
10. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. & Dawson, J. H. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, 2841-2887.
11. McLean, K. J., Luciakova, D., Belcher, J., Tee, K. L. & Munro, A. W. Biological diversity of cytochrome P450 redox partner systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **851**, 299-317 (2015).
12. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. & Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1770**, 330-344 (2007).
13. Katagiri, M., Ganguli, B. N. & Gunsalus, I. C. A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **243**, 3543-3546 (1968).
14. Hawkes, D. B. Cytochrome P450cin (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 27725-27732 (2002).
15. Wang, M. *et al.* Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8411-8416 (1997).
16. Urlacher, V. B. & Girhard, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* **30**, 26-36 (2012).

17. Narhi, L. O. & Fulco, A. J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by Barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **261**, 7160-7169 (1986).
18. Narhi, L. O. & Fulco, A. J. Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450_{BM-3}, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **262**, 6683-6690 (1987).
19. Sligar, S. G. Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry-US* **15**, 5399-5406 (1976).
20. Krest, C. M. *et al.* Reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis. *J. Biol. Chem.* **288**, 17074-17081 (2013).
21. Rittle, J. & Green, M. T. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* **330**, 933-937 (2010).
22. Groves, J. T. & McClusky, G. A. Aliphatic hydroxylation via oxygen rebound. Oxygen transfer catalyzed by iron. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 859-861 (1976).
23. Ogliaro, F. *et al.* A model "rebound" mechanism of hydroxylation by cytochrome P450: stepwise and effectively concerted pathways, and their reactivity patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8977-8989 (2000).
24. Stone, K. L., Behan, R. K. & Green, M. T. Resonance Raman spectroscopy of chloroperoxidase compound II provides direct evidence for the existence of an iron(IV)-hydroxide. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12307-12310 (2006).
25. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. in *Cytochrome P450*, edited by Ortiz de Montellano, Paul R. Springer International Publishing, Vol. 4, pp. 69-109 (2015).
26. Ortiz de Montellano, Paul R. in *Cytochrome P450*, edited by Ortiz de Montellano, Paul R. Springer International Publishing, Vol. 4, pp. 111-176 (2015).
27. Vaz, A. D. N., McGinnity, D. F. & Coon, M. J. Epoxidation of olefins by cytochrome P450: evidence from site-specific mutagenesis for hydroperoxo-iron as an electrophilic oxidant. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3555-3560 (1998).
28. Jin, S., Makris, T. M., Bryson, T. A., Sligar, S. G. & Dawson, J. H. Epoxidation of olefins by hydroperoxo-ferric cytochrome P450. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3406-3407 (2003).
29. Kumar, D., Karamzadeh, B., Sastry, G. N. & de Visser, S. P. What factors influence the rate constant of substrate epoxidation by compound I of cytochrome P450 and analogous iron(IV)-oxo oxidants? *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7656-7667 (2010).
30. de Visser, S. P., Ogliaro, F. & Shaik, S. Stereospecific oxidation by compound I of cytochrome P450 does not proceed in a concerted synchronous manner. *Chem. Commun.*, 2322-2323 (2001).

31. Bellucci, G., Chiappe, C., Pucci, L. & Gervasi, P. G. The Mechanism of oxidation of allylic alcohols to α,β -unsaturated ketones by cytochrome P450. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 871-874 (1996).
32. Vaz, A. D. N. & Coon, M. J. On the mechanism of action of cytochrome P450: evaluation of hydrogen abstraction in oxygen-dependent alcohol oxidation. *Biochemistry-US* **33**, 6442-6449 (1994).
33. Karuzina, I. I. & Archakov, A. I. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions. *Free Radical Bio. Med.* **17**, 557-567 (1994).
34. Karuzina, I. I. & Archakov, A. I. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. *Free Radical Bio. Med.* **16**, 73-97 (1994).
35. Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A. & Deisenhofer, J. Structure and function of cytochrome P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **2**, 41-62 (1995).
36. Poulos, T. L. & Johnson, H. E. in *Cytochrome P450*, edited by Ortiz de Montellano, Paul R. Springer International Publishing, Vol. 4, pp. 3-32 (2015).
37. Sirim, D., Widmann, M., Wagner, F. & Pleiss, J. Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Struct. Biol.* **10**, 34 (2010).
38. Hegde, A. *et al.* Interactions of substrates at the surface of P450s can greatly enhance substrate potency. *Biochemistry-US* **46**, 14010-14017 (2007).
39. Gotoh, O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* **267**, 83-90 (1992).
40. Graham, S. E. & Peterson, J. A. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 24-29 (1999).
41. Miura, Y. & Fulco, A. J. ω -1, ω -2 and ω -3 Hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta.* **338**, 305-317 (1975).
42. Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G. & Wong, L.-L. P450BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chem. Soc. Rev* **41**, 1218-1260 (2012).
43. Noble, M. A. *et al.* Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochem. J.* **339**, 371 (1999).
44. Jung, S. T., Lauchli, R. & Arnold, F. H. Cytochrome P450: taming a wild type enzyme. *Curr. Opin. Biotech.* **22**, 809-817 (2011).

45. Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A. & Deisenhofer, J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**, 731-736 (1993).
46. Li, H. & Poulos, T. L. The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 140-146 (1997).
47. Maurer, S. C. *et al.* Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1090-1098 (2005).
48. Weber, E. *et al.* Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. *Chem. Commun.* **47**, 944 (2011).
49. Watanabe, Y. *et al.* Oxidation of acyclic monoterpenes by P450 BM-3 monooxygenase: influence of the substrate E/Z-isomerism on enzyme chemo- and regioselectivity. *Tetrahedron* **63**, 9413-9422 (2007).
50. Seifert, A. *et al.* Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *ChemBioChem* **10**, 853-861 (2009).
51. Seifert, A., Antonovici, M., Hauer, B. & Pleiss, J. An efficient route to selective bio-oxidation catalysts: an iterative approach comprising modeling, diversification, and screening, based on CYP102A1. *ChemBioChem* **12**, 1346-1351 (2011).
52. Zhang, K., Shafer, B. M., Demars, M. D., Stern, H. A. & Fasan, R. Controlled oxidation of remote sp³ C–H bonds in artemisinin via P450 catalysts with fine-tuned regio- and stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18695-18704 (2012).
53. Kolev, J. N., O'Dwyer, K. M., Jordan, C. T. & Fasan, R. Discovery of potent parthenolide-based antileukemic agents enabled by late-stage P450-mediated C–H functionalization. *ACS Chem. Biol.* **9**, 164-173 (2014).
54. Carmichael, A. B. & Wong, L. L. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3117-3125 (2001).
55. Vottero, E. *et al.* Role of residue 87 in substrate selectivity and regioselectivity of drug-metabolizing cytochrome P450 CYP102A1 M11. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 899-912 (2011).
56. Lewis, J. C. *et al.* Combinatorial alanine substitution enables rapid optimization of cytochrome P450BM3 for selective hydroxylation of large substrates. *ChemBioChem* **11**, 2502-2505 (2010).
57. van Vugt-Lussenburg, Barbara M A, Damsten, M. C., Maasdijk, D. M., Vermeulen, N. P. E. & Commandeur, J. N. M. Heterotropic and homotropic cooperativity by a drug-metabolising mutant of cytochrome P450 BM3. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **346**, 810-818 (2006).

58. Kille, S., Zilly, F. E., Acevedo, J. P. & Reetz, M. T. Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution. *Nature Chem.* **3**, 738-743 (2011).
59. Reinen, J. *et al.* Selective whole-cell biosynthesis of the designer drug metabolites 15- or 16-betahydroxynorethisterone by engineered Cytochrome P450 BM3 mutants. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **121**, 64-74 (2015).
60. Wahlberg, I. & Eklund, A. in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, edited by Herz, W., Kirby, G., Moore, R. E., Steglich, W. & Tamm, C. H. Springer-Verlag Wien, New York, pp. 142-293 (1992).
61. Weinheimer, A. J., Chang, C. W. J. & Matson, J. A. in *Progress in the chemistry of organic natural products*, edited by Herz, W., Grisebach, H. & Kirby, G. W. Springer-Verlag, Wien, pp. 285-387 (1979).
62. Badria, F. A. *et al.* Sarcophytonolide: a new neuroprotective compound from the soft coral *Sarcophyton glaucum*. *Toxicology* **131**, 133-143 (1998).
63. Francis, J. A., Raja, S. N. & Nair, M. G. Bioactive terpenoids and guggulsteroids from *Commiphora mukul* gum resin of potential anti-inflammatory interest. *Chem. Biodivers.* **1**, 1842-1853 (2004).
64. Lai, D. *et al.* Cembranoids from the soft coral *Sinularia rigida* with antifouling activities. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 4585-4592 (2013).
65. Narisawa, T., Takahashi, M., Niwa, M., Fukaura, Y. & Fujiki, H. Inhibition of methylnitrosourea-induced large bowel cancer development in rats by sarcophytol A, a product from a marine soft coral *Sarcophyton glaucum*. *Cancer Res.* **49**, 3287-3289 (1989).
66. Pudhom, K. *et al.* Furanocembranoids from the stem bark of *Croton oblongifolius*. *J. Nat. Prod.* **70**, 659-661 (2007).
67. Rashid, M. A., Gustafson, K. R. & Boyd, M. R. HIV-inhibitory cembrane derivatives from a philippines collection of the soft coral *Lobophytum* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 531-533 (2000).
68. Yang, B. *et al.* Cembrane diterpenes chemistry and biological properties. *Curr. Org. Chem.* **16**, 1512-1539 (2012).
69. Dauben, W. G., Thiessen, W. E. & Resnick, P. R. Cembrene, a 14-membered ring diterpene hydrocarbon. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2015-2016 (1962).
70. Kobayashi, H. & Akiyoshi, S. Thunbergene, a macrocyclic diterpene. *Bull. Chem. Soc. Japan* **35**, 1044-1045 (1962).
71. Roberts, D. L. & Rowland, R. L. Macrocyclic diterpenes. α - and β -4,8,13-Duvatriene-1,3-diols from tobacco. *J. Org. Chem.* **27**, 3989-3995 (1962).
72. Wahlberg, I. & Enzell, C. R. Tobacco cembranoids. *Beitr. Tabakforsch.* **12**, 93-104 (1984).

73. Patil, V. D., Nayak, U. R. & Dev, S. Chemistry of ayurvedic crude drugs - II. *Tetrahedron* **29**, 341-348 (1973).
74. McDowell, P. & Oloo, G. W. Isolation, identification, and biological activity of trail-following pheromone of termite. *J. Chem. Ecol.* **10**, 835-851 (1984).
75. Chen, W.-t., Li, Y. & Guo, Y.-W. Terpenoids of *Simularia* soft corals: chemistry and bioactivity. *Acta. Pharm. Sinic.* **2**, 227-237 (2012).
76. Liang, L.-F. & Guo, Y.-W. Terpenes from the soft corals of the genus *Sarcophyton*: chemistry and biological activities. *Chem. Biodivers.* **10**, 2161-2196 (2013).
77. Olsson, E., Holth, A., Kumlin, E., Bohlin, L. & Wahlberg, I. Structure-related inhibiting activity of some tobacco cembranoids on the prostaglandin synthesis *in vitro*. *Planta Med.* **59**, 293-295 (1993).
78. Zhang, C. *et al.* Cytotoxic diterpenoids from the soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *J. Nat. Prod.* **69**, 1476-1480 (2006).
79. Al-Lihaibi, S. S. *et al.* Three new cembranoid-type diterpenes from Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*: isolation and antiproliferative activity against HepG2 cells. *Eur. J. Med. Chem.* **81**, 314-322 (2014).
80. Sawant, S. S. *et al.* Biocatalytic and antimetastatic studies of the marine cembranoids sarcophine and 2-epi-16-deoxysarcophine. *J. Nat. Prod.* **69**, 1010-1013 (2006).
81. Ferchmin, P. *et al.* Tobacco cembranoids protect the function of acute hippocampal slices against NMDA by a mechanism mediated by $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors. *J. Neurosci. Res.* **82**, 631-641 (2005).
82. Eterović, V. A. *et al.* A cembranoid protects acute hippocampal slices against paraoxon neurotoxicity. *Toxicol. In Vitro* **25**, 1468-1474 (2011).
83. Ferchmin, P. *et al.* 4R-cebranoid protects against diisopropylfluorophosphate-mediated neurodegeneration. *Neurotoxicology* **44**, 80-90 (2014).
84. Ferchmin, P. *et al.* *Therapeutic application of cembranoids against HIV virus replication, HIV-associated neurocognitive disorders and HIV virus-induced inflammation*. US 20140107225 A1, April 17 (2014).
85. Liang, L.-F., Gao, L.-X., Li, J., Taglialatela-Scafati, O. & Guo, Y.-W. Cembrane diterpenoids from the soft coral *Sarcophyton trocheliophorum* marenzeller as a new class of PTP1B inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem.* **21**, 5076-5080 (2013).
86. Tello, E., Castellanos, L., Arévalo-Ferro, C. & Duque, C. Disruption in quorum-sensing systems and bacterial biofilm inhibition by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1637-1642 (2012).

87. Wang, E. *et al.* Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat. Biotechnol.* **19**, 371-374 (2001).
88. Wang, E., Hall, J. T. & Wagner, G. J. Transgenic *Nicotiana Tabacum* L. with enhanced trichome exudate cembratrieneols has reduced aphid infestation in the field. *Mol. Breeding* **13**, 49-57 (2004).
89. McGarvey, D. J. & Croteau, R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026 (1995).
90. MacMillan, J. & Beale, M. H. in *Comprehensive natural products chemistry*, edited by Barton, D., Nakanishi, K. & Metho-Cohn, O. Elsevier, Oxford, pp. 217-243 (1999).
91. Wessjohann, L. A., Ruijter, E., Garcia-Rivera, D. & Brandt, W. What can a chemist learn from nature's macrocycles? - A brief, conceptual view. *Mol. Divers.* **9**, 171-186 (2005).
92. Guo, Z. & Wagner, G. J. Biosynthesis of cembratrienols in cell-free extracts from trichomes of *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci.* **110**, 1-10 (1995).
93. Carey, F. A. & Sundberg, R. J. *Advanced organic chemistry. Part B: reactions and synthesis.* 5th ed. Springer US, New York (2007).
94. Astles, P. C. & Thomas, E. J. Syntheses of thunbergols and α - and β -cembra-2,7,11-triene-4,6-diols. *J. Chem. Soc. Perk. T. I* **1**, 845-856 (1997).
95. Tang, B., Bray, C. D., Pattenden, G. & Rogers, J. Total synthesis of (+)-Z-deoxypukalide, a furanobutenolide-based cembranoid isolated from the pacific octocoral *Leptogorgia* spp. *Tetrahedron* **66**, 2492-2500 (2010).
96. Saitman, A., Sullivan, S. D. E. & Theodorakis, E. A. A strategy toward the synthesis of C13-oxidized cembrenolides. *Tetrahedron Lett.* **54**, 1612-1615 (2013).
97. Takamura, H., Iwamoto, K., Nakao, E. & Kadota, I. Total synthesis of two possible diastereomers of (+)-sarcophytonolide C and its structural elucidation. *Org. Lett.* **15**, 1108-1111 (2013).
98. Wahlberg, I. *et al.* Tobacco Chemistry 62. Five new cembranoids from Tobacco. *J. Org. Chem.* **50**, 4527-4538 (1985).
99. Tietze, L. F., Brazel, C. C., Hölsken, S., Magull, J. & Ringe, A. Total synthesis of polyoxygenated cembrenes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **47**, 5246-5249 (2008).
100. Razzak, M. & de Brabander, J. K. Lessons and revelations from biomimetic syntheses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 865-875 (2011).
101. Chen, K. & Baran, P. S. Total synthesis of eudesmane terpenes by site-selective C-H oxidations. *Nature* **459**, 824-828 (2009).
102. Ishihara, Y. & Baran, P. S. Two-phase terpene total synthesis: historical perspective and application of the Taxol® problem. *Synlett* **12**, 1733-1745 (2010).

103. Ishihara, Y., Mendoza, A. & Baran, P. S. Total synthesis of taxane terpenes: cyclase phase. *Tetrahedron* **69**, 5685-5701 (2013).
104. Wilde, N. C., Isomura, M., Mendoza, A. & Baran, P. S. Two-phase synthesis of (-)-taxuyunnanine D. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4909-4912 (2014).
105. McKerrall, S. J., Jørgensen, L., Kuttruff, C. A., Ungeheuer, F. & Baran, P. S. Development of a concise synthesis of (+)-ingenol. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5799-5810 (2014).
106. White, M. C. C-H bond functionalization and synthesis in the 21st century: a brief history and prospectus. *Synlett* **23**, 2746-2748 (2012).
107. Stang, E. M. & White, M. C. Total synthesis and study of 6-deoxyerythronolide B by late-stage C-H oxidation. *Nat Chem* **1**, 547-551 (2009).
108. Lee, S. K. *et al.* Neopikromycin and novapikromycin from the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J. Nat. Prod.* **69**, 847-849 (2006).
109. Xue, Y., Wilson, D., Zhao, L., Liu, H. & Sherman, D. H. Hydroxylation of macrolactones YC-17 and narbomycin is mediated by the pikC-encoded cytochrome P450 in *Streptomyces venezuelae*. *Chem. Biol.* **5**, 661-667 (1998).
110. Betlach, M. C., Kealey, J. T., Ashley, G. W. & McDaniel, R. Characterization of the macrolide P-450 hydroxylase from *Streptomyces venezuelae* which converts narbomycin to picromycin. *Biochemistry* **37**, 14937-14942 (1998).
111. Shafiee, A. & Hutchinson, C. R. Purification and reconstitution of the electron transport components for 6-deoxyerythronolide B hydroxylase, a cytochrome P-450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis. *J. Bacteriol.* **170**, 1548-1553 (1988).
112. Andersen, J. F., Tatsuta, K., Gunji, H., Ishiyama, T. & Hutchinson, C. R. Substrate specificity of 6-deoxyerythronolide B hydroxylase, a bacterial cytochrome P450 of erythromycin A biosynthesis. *Biochemistry* **32**, 1905-1913 (1993).
113. Stassi, D., Donadio, S., Staver, M. J. & Katz, L. Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**, 182-189 (1993).
114. Rodriguez, A. D., Olano, C., Méndez, C., Hutchinson, C. R. & Salas, J. A. A cytochrome P450-like gene possibly involved in oleandomycin biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 117-120 (1995).
115. Wang, E., Gan, S. & Wagner, G. J. Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* **53**, 1891-1897 (2002).
116. Wang, E. & Wagner, G. J. Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. *Planta* **216**, 686-691 (2003).

117. Li, S. *et al.* Selective oxidation of carbolide C-H bonds by an engineered macrolide P450 monooxygenase. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 18463-18468 (2009).
118. Fasan, R. Tuning P450 enzymes as oxidation catalysts. *ACS Catal.* **2**, 647-666 (2012).
119. Polic, V. & Auclair, K. Controlling substrate specificity and product regio- and stereo-selectivities of P450 enzymes without mutagenesis. *Bioorgan. Med. Chem.* **22**, 5547-5554 (2014).
120. Shoji, O. & Watanabe, Y. Bringing out the potential of wild-type cytochrome P450s using decoy molecules: oxygenation of nonnative substrates by bacterial cytochrome P450s. *Isr. J. Chem.* **55**, 32-39 (2015).
121. Raadt, A. de & Griengl, H. The use of substrate engineering in biohydroxylation. *Curr. Opin. Biotech.* **13**, 537-542 (2002).
122. Sherman, D. H. The structural basis for substrate anchoring, active site selectivity, and product formation by P450 PikC from *Streptomyces venezuelae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26289-26297 (2006).
123. Negretti, S. *et al.* Directing group-controlled regioselectivity in an enzymatic C-H bond oxygenation. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4901-4904 (2014).
124. Narayan, A. R. H. *et al.* Enzymatic hydroxylation of an unactivated methylene C-H bond guided by molecular dynamics simulations. *Nature Chem.* **7**, 653-660 (2015).
125. Heidt, T. Strategien zur Kontrolle der Regioselektivität bei Ringschlussmetathesen für den chemoenzymatischen Aufbau diterpenoider Makrocyclen. *Dissertation*, Universität Stuttgart (2015).
126. Heidt, T. Ringschlussmetathese zum Aufbau von Cembranolid-Analoga. *Diplomarbeit*, Universität Stuttgart (2011).
127. Heidt, T., Baro, A., Köhn, A. & Laschat, S. Synthesis of cembranoid analogues through ring-closing metathesis of terpenoid precursors: a challenge regarding ring-size selectivity. *Chem. Eur. J.* (2015).
128. Schaubach, S. Synthese von Cembranolid-Derivaten als potentielle Chemotaxis-Substanzen bei Korallen und Schwämmen. *Masterarbeit*, Universität Stuttgart (2013).
129. Hoveyda, A. H. & Zhugralin, A. R. The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction. *Nature* **450**, 243-251 (2007).
130. Li, Q. S., Ogawa, J., Schmid, R. D. & Shimizu, S. Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 5735-5739 (2001).
131. Saito, Y., Takizawa, H., Konishi, S., Yoshida, D. & Mizusaki, S. Identification of cembratriene-4,6-diol as antitumor-promoting agent from cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* **6**, 1189-1194 (1985).

132. Saito, Y., Tsujino, Y., Kaneko, H., Yoshida, D. & Mizusaki, S. Inhibitory effects of cembratriene-4,6-diol derivatives on the induction of Epstein-Barr virus early antigen by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 941-943 (1987).
133. El Sayed, K. A. *et al.* Biocatalytic and semisynthetic optimization of the anti-invasive tobacco (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cebratriene-4,6-diol. *Bioorgan. Med. Chem.* **16**, 2886-2893 (2008).
134. Eterović, V. A. *et al.* Tobacco cembranoids block the expression of the behavioral sensitization to nicotine and inhibit neuronal acetylcholine receptors. US 6489357 B1, December 03 (2002).
135. Ferchmin, P. *et al.* Tobacco cembranoids block behavioral sensitization to nicotine and inhibit neuronal acetylcholine receptor function. *J. Neurosci. Res.* **64**, 18-25 (2001).
136. Pagán, O. R. *et al.* A cembranoid from tobacco prevents the expression of nicotine-induced withdrawal behavior in planarian worms. *Eur. J. Pharmacol.* **615**, 118-124 (2009).
137. Eaton, M. J., Ospina, C. A., Rodríguez, A. D. & Eterović, V. A. Differential inhibition of nicotine- and acetylcholine-evoked currents through $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors by tobacco cembranoids in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* **366**, 97-102 (2004).
138. Eterović, V. A. *et al.* Protective activity of (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cebratriene-4,6-diol analogues against diisopropylfluorophosphate neurotoxicity: preliminary structure–activity relationship and pharmacophore modeling. *Bioorgan. Med. Chem.* **21**, 4678-4686 (2013).
139. Ford, B. D., Ferchmin, P. & Eterović, V. A. *Methods and compositions for protecting and treating neuroinjury*. WO 2011008585 A3, May 19 (2011).
140. Ferchmin, P., Eterović, V. A. & Maldonado, H. M. *Neuronal circuit-dependent neuroprotection by interaction between nicotinic receptors*. WO 2008002594 A8, March 27 (2008).
141. Martins, A. H. *et al.* Neuroprotective activity of (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cebratriene-4,6-diol (4*R*) *in vitro* and *in vivo* in rodent models of brain ischemia. *Neuroscience* **291**, 250-259 (2015).
142. Ferchmin, P. *et al.* Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon* **54**, 1174-1182 (2009).
143. Baraka, H. N., Khanfar, M. A., Williams, J. C., El-Giar, E. M. & El Sayed, K. A. Bioactive natural, biocatalytic, and semisynthetic tobacco cembranoids. *Planta Med.* **77**, 467-476 (2011).
144. El Sayed, K. A. *et al.* Semisynthetic and biotransformation studies of (1*S*,2*E*,4*S*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-cebratriene-4,6-diol. *J. Nat. Prod.* **71**, 117-122 (2008).

145. Yamazaki, Y. & Mikami, Y. *Cembratrienetriol and production thereof*. JP62126146, June 08 (1987).
146. Yamazaki, Y. & Mikami, Y. *2,7,11-cembratriene-4,6,20-triol, production thereof and flavor and taste improver consisting of said compound for tobacco*. JP62234037, October 14 (1987).
147. El Sayed, K. A. & Sylvester, P. W. Biocatalytic and semisynthetic studies of the anticancer tobacco cembranoids. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 877-887 (2007).
148. Arnarp, J. *et al.* Tobacco chemistry 76. Biotransformations of tobacco isoprenoids using plant cell cultures of *Tripterygium Wilfordii*. *Acta. Chem. Scand.* **47**, 683-668 (1993).
149. Arnarp, J. *et al.* Tobacco chemistry 77. Biotransformations of a major tobacco cembratrienediol using plant cell cultures of *Nicotiana Sylvestris*. *Acta. Chem. Scand.* **47**, 689-694 (1993).
150. Le-Huu, P., Heidt, T., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Chemo-, regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid β -cembrenediol by P450 BM3. *ACS Catal.* **5**, 1772-1780 (2015).
151. Wahlberg, I., Olsson, E. & Berg, J. in *Progress in Flavour Precursor Studies Proceedings of International Conference*, edited by Schreier, P. & Winterhalter, P. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, pp. 83-95 (1993).
152. Wahlberg, I., Eklund, A., Vogt, C., Enzell, C. R. & Berg, J. Two new 7,8-epoxycembranoids from tobacco. *Acta. Chem. Scand.* **B 40**, 855-860 (1986).
153. Roiban, G.-D. & Reetz, M. T. Expanding the toolbox of organic chemists: directed evolution of P450 monooxygenases as catalysts in regio- and stereoselective oxidative hydroxylation. *Chem. Commun.* **51**, 2208-2224 (2015).
154. Zhang, K., El Damaty, S. & Fasan, R. P450 fingerprinting method for rapid discovery of terpene hydroxylating P450 catalysts with diversified regioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3242-3245 (2011).
155. Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D. & Vogel, A. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angew. Chem., Int. Ed.* **44**, 4192-4196 (2005).
156. Reetz, M. T., Wang, L.-W. & Bocola, M. Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew. Chem., Int. Ed.* **45**, 1236-1241 (2006).
157. Roiban, G.-D., Agudo, R. & Reetz, M. T. Cytochrome P450 catalyzed oxidative hydroxylation of achiral organic compounds with simultaneous creation of two chirality centers in a single C-H activation step. *Angew. Chem., Int. Ed.* **53**, 8659-8663 (2014).

-
158. Cohen, S., Kozuch, S., Hazan, C. & Shaik, S. Does substrate oxidation determine the regioselectivity of cyclohexene and propene oxidation by cytochrome P450? *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11028-11029 (2006).
159. Branco, Ricardo J F *et al.* Anchoring effects in a wide binding pocket: the molecular basis of regioselectivity in engineered cytochrome P450 monooxygenase from *B. megaterium*. *Proteins* **73**, 597-607 (2008).
160. Hoye, T. R., Jeffrey, C. S. & Shao, F. Mosher ester analysis for the determination of absolute configuration of stereogenic (chiral) carbinol carbons. *Nat. Protoc.* **2**, 2451-2458 (2007).
161. Seco, J. M., Quinoà, E. & Riguera, R. in *Structure elucidation in organic chemistry: the search for the right tools.*, edited by Cid, M.-H. & Bravo, J. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 241-277 (2015).
162. Seco, J. M., Quiñoá, E. & Riguera, R. Assignment of the absolute configuration of polyfunctional compounds by NMR using chiral derivatizing agents. *Chem. Rev.* **112**, 4603-4641 (2012).
163. Paddon, C. J. *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **496**, 528-532 (2013).
164. Peplow, M. Sanofi launches malaria drug production. Available at <http://www.rsc.org/chemistryworld/2013/04/sanofi-launches-malaria-drug-production> (2013).
165. García-Junceda, E., Lavandera, I., Rother, D. & Schrittwieser, J. H. (Chemo)enzymatic cascades – nature's synthetic strategy transferred to the laboratory. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **114**, 1-6 (2015).
166. Brown, S., Clastre, M., Courdavault, V. & O'Connor, S. E. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 3205-3210 (2015).
167. Bruggink, A., Schoevaart, R. & Kieboom, T. Concepts of nature in organic synthesis: cascade catalysis and multistep conversions in concert. *Org. Process Res. Dev.* **7**, 622-640 (2003).
168. Ricca, E., Brucher, B. & Schrittwieser, J. H. Multi-enzymatic cascade reactions: overview and perspectives. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2239-2262 (2011).
169. Kroutil, W. & Rueping, M. Introduction to ACS catalysis virtual special issue on cascade catalysis. *ACS Catal.* **4**, 2086-2087 (2014).
170. Mayer, S. F., Kroutil, W. & Faber, K. Enzyme-initiated domino (cascade) reactions. *Chem. Soc. Rev.* **30**, 332-339 (2001).
171. Muschiol, J. *et al.* Cascade catalysis – strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. *Chem. Commun.* **51**, 5798-5811 (2015).

172. Urlacher, V. B. & Schulz, S. in *Cascade biocatalysis: integrating stereoselective and environmentally friendly reactions*, edited by Riva, S. & Fessner, W.-D. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 87-132 (2014).
173. WHO. *Guidelines for the treatment of malaria*. World Health Organization, Geneva (2006).
174. Ro, D.-K. *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**, 940-943 (2006).
175. Berteau, C. M. *et al.* Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* **71**, 40-47 (2005).
176. Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E. & Pompon, D. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat. Biotechnol.* **16**, 186-189 (1998).
177. Szczebara, F. M. *et al.* Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat. Biotechnol.* **21**, 143-149 (2003).
178. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* **32**, 81-151 (2011).
179. Jones, G., Prosser, D. E. & Kaufmann, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J. Lipid Res.* **55**, 13-31 (2014).
180. Sawada, N. *et al.* Conversion of vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **320**, 156-164 (2004).
181. Hayashi, K. *et al.* Three-step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1: enzymes and catalysis. *FEBS J.* **277**, 3999-4009 (2010).
182. Sakaki, T. *et al.* Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 249-256 (2011).
183. Fujii, Y. *et al.* Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **385**, 170-175 (2009).
184. Sugimoto, H. *et al.* Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry* **47**, 4017-4027 (2008).
185. Hayashi, K. *et al.* Structure-based design of a highly active vitamin D hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1. *Biochemistry* **47**, 11964-11972 (2008).
186. Yasutake, Y. *et al.* Structural evidence for enhancement of sequential vitamin D3 hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 vitamin D3 hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **285**, 31193-31201 (2010).
187. Arndt, R., Berg, J. & Wahlberg, I. Tobacco chemistry. 71. Structure determination and biomimetic studies of five new tobacco cembranoids. *Acta. Chem. Scand.* **44**, 814-825 (1990).

-
188. Wahlberg, I. & Enzell, C. R. Tobacco isoprenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 237-276 (1987).
189. Gradillas, A. & Pérez-Castells, J. Macrocyclization by ring-closing metathesis in the total synthesis of natural products: reaction conditions and limitations. *Angew. Chem., Int. Ed.* **45**, 6086-6101 (2006).
190. Maimone, T. J. & Baran, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 396-407 (3).
191. Grubbs, R. H. *Handbook of Metathesis*. 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim (2003).
192. Nakamura, A. & Nakada, M. Allylic oxidations in natural product synthesis. *Synthesis* **45**, 1421-1451 (2013).
193. Schulz, S., Girhard, M. & Urlacher, V. B. Biocatalysis: key to selective oxidations. *ChemCatChem* **4**, 1889-1895 (2012).
194. Maurer, S. C., Schulze, H., Schmid, R. D. & Urlacher, V. Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP⁺ cofactor recycling system: towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **345**, 802-810 (2003).
195. Nagao, T. *et al.* Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.* **174**, 5013-5020 (1992).
196. Khatri, Y. *et al.* A natural heme-signature variant of CYP267A1 from *Sorangium cellulosum* So ce56 executes diverse ω -hydroxylation. *FEBS J.* **282**, 74-88 (2015).

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

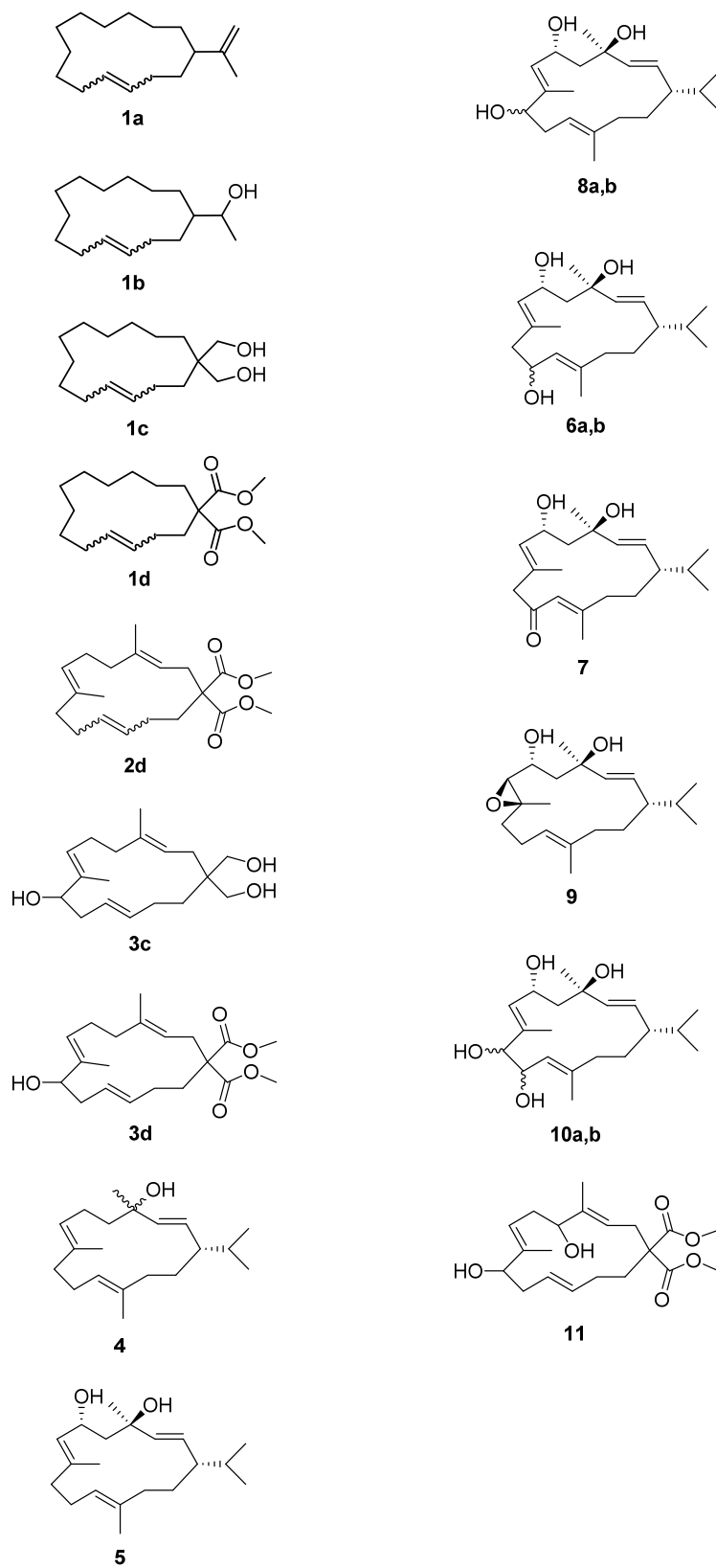
AChR	Acetylcholinrezeptoren
Amp	Ampicillin
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
bps	<i>base pairs</i>
CAST	<i>combinatorial active-site saturation test</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPR	Cytochrom-P450-Reduktase
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
δ	chemische Verschiebung
(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dr	Diastereomerenverhältnis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EryF	CYP107A1 aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GC/MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
GDH	Glucose-Dehydrogenase
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GGPPS	Geranylgeranyldiphosphat-Synthase
g/v	Gewicht pro Volumen
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	interner Standard
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kan	Kanamycin
<i>k_{cat}</i>	katalytische Konstante
kDa	Kilodalton
<i>lacI</i>	Lactoserepressor codierendes Gen
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
LC/PDA	Flüssigkeitschromatographie mit gekoppeltem Photodiodenarray

LRMS	<i>low resolution mass spectrometry</i>
MEP	Methylerythritolphosphat-Stoffwechselweg
MEV	Mevalonat-Stoffwechselweg
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektierbar
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OleP	CYP107D1 aus <i>Streptomyces antibioticus</i>
ori	Replikationsursprung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
P450-BM3	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i>
P450cam	CYP101A1 aus <i>Pseudomonas putida</i>
P450cin	CYP176A1 aus <i>Citrobacter braakii</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PdR	Putidaredoxin-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>
Pdx	Putidaredoxin aus <i>Pseudomonas putida</i>
PikC	CYP107L1 aus <i>Streptomyces venezuelae</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RCM	Ringschlussmetathese
rpm	<i>revolutions per minute</i>
R _t	Retentionszeit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
<i>sp.</i>	<i>species</i>
SRS	<i>substrate recognition sites</i>
T7-P	T7-Promotor
T7-T	T7-Terminator
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tfb	<i>transformation buffer</i>
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
Vdh	Vitamin-D-Hydroxylase
v/v	Volumen pro Volumen

Ein- und Dreibuchstabencode von Aminosäuren

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

9.2 Formelregister



9.3 Zweifache Hydroxylierung von β -Cembrenndiol

Tabelle 19. Substrat-Produkt-Verteilung der P450-P450-Kaskadenreaktionen zur zweifachen Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (5). Im Reaktionsmodus A wurde die Reaktion durch simultane (sim.) Zugabe der P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und V78A/F87G (0-24h) katalysiert. Im Reaktionsmodus B wurden die Reaktionen sequentiell (seq.) durch die P450-BM3-Mutante V78A/F87G (0-17h) und die P450-BM3-Mutante F87A/I263L (17-24 h) katalysiert, während in C die Reaktion sequentiell durch die P450-BM3-Mutante F87A/I263L (0-17 h) und die P450-BM3-Mutante V78A/F87G (17-24 h) katalysiert wurde. In der Kontrolle (Kontr.) D wurde die Reaktion nur mit der P450-BM3-Mutante F87A/I263L (0-24 h) durchgeführt. Es wurden die Produkte 9-OH- β -Cembrentriol (**8a-b**), 10-OH- β -Cembrentriol (**6a-b**), 9,10-OH- β -Cembrenntetraol (**10a-b**) sowie mehrere andere Produkte (Prod.) detektiert. Die Diastereomerenverhältnisse (dr) der Hauptprodukte sind angegeben. Abweichungen, bei denen die Summe aus Substrat und allen Produkten ungleich 100 % ist, sind auf Rundungen zurückzuführen. In A sind die Mittelwerte und Abweichungen von drei Experimenten, in B-D von zwei Experimenten dargestellt.

Reaktionsmodus	Reaktionszeit (h)	Substrat-Produkt-Verteilung (%)								
		5	8b	8a	6b	6a	10b	10a	andere Prod.	dr
A (sim.)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	2 ± 1	-	1 ± 1	13 ± 1	39 ± 0	7 ± 1	8 ± 1	30 ± 0	25:75 (6b:6a)
	24	-	-	1 ± 0	13 ± 1	40 ± 0	6 ± 1	8 ± 0	31 ± 0	25:75 (6b:6a)
B (seq. Ia)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	2 ± 0	-	-	17 ± 1	46 ± 0	-	3 ± 0	33 ± 1	27:73 (6b:6a)
	24	1 ± 1	-	-	17 ± 1	47 ± 2	-	3 ± 0	32 ± 1	27:73 (6b:6a)
C (seq. IIa)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	3 ± 1	9 ± 0	80 ± 0	6 ± 0	2 ± 0	-	-	-	10:90 (8b:8a)
	24	-	-	9 ± 3	5 ± 1	8 ± 5	34 ± 4	32 ± 2	12 ± 2	52:48 (10b:10a)
D (Kontr.)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	3 ± 1	9 ± 0	80 ± 1	7 ± 0	2 ± 0	-	-	-	10:90 (8b:8a)
	24	3 ± 0	9 ± 0	80 ± 0	6 ± 0	2 ± 0	-	-	2 ± 0	10:90 (8b:8a)

Tabelle 20. Substrat-Produkt-Verteilung der P450-P450-Kaskadenreaktionen zur zweifachen Hydroxylierung von β -Cembrenndiol (5). Im Reaktionsmodus A wurde die Reaktion durch simultane (sim.) Zugabe der P450-BM3-Mutanten F87A/I263L und L75A/V78A/F87G (0-24h) katalysiert. In B wurde die Reaktion sequentiell (seq.) durch die P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G (0-17h) und die P450-BM3-Mutante F87A/I263L (17-24 h) katalysiert, während in C die Reaktion sequentiell durch die P450-BM3-Mutante F87A/I263L (0-17 h) und die P450-BM3-Mutante L75A/V78A/F87G (17-24 h) katalysiert wurde. Es wurden die Produkte 9-OH- β -Cembrentriol (**8a-b**), die 10-OH- β -Cembrentriol (**6a-b**), 9,10-OH- β -Cembrentetraol (**10a-b**) sowie mehrere andere Produkte (Prod.) detektiert. Die Diastereomerenverhältnisse (dr) der Hauptprodukte sind angegeben. Abweichungen, bei denen die Summe aller Produkte ungleich 100 % ist, sind auf Rundungen zurückzuführen. In A sind die Mittelwerte und Abweichungen von drei Experimenten, in B und C von zwei Experimenten dargestellt.

Reaktionsmodus	Reaktionszeit (h)	Substrat-Produkt-Verteilung (%)								dr
		5	8b	8a	6b	6a	10b	10a	andere Prod.	
A (sim.)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	2 ± 0	-	4 ± 4	5 ± 3	50 ± 3	5 ± 1	1 ± 0	33 ± 12	9:91 (6b:6a)
	24	2 ± 0	-	7 ± 5	5 ± 3	50 ± 4	5 ± 0	1 ± 0	30 ± 13	9:91 (6b:6a)
B (seq. Ib)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	2 ± 0	-	-	7 ± 4	57 ± 5	-	-	35 ± 9	11:89 (6b:6a)
	24	2 ± 1	-	2 ± 0	6 ± 3	56 ± 5	-	-	34 ± 8	11:89 (6b:6a)
C (seq. IIb)	0	100 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	4 ± 0	8 ± 0	79 ± 0	6 ± 0	2 ± 0	-	-	-	10:90 (8b:8a)
	24	-	1 ± 2	18 ± 10	1 ± 1	12 ± 6	45 ± 11	5 ± 1	18 ± 5	90:10 (10b:10a)

9.4 MS-Spektren

9.4.1 14-Gliedrige Makrozyklen (1-5) und ihre Oxidationsprodukte

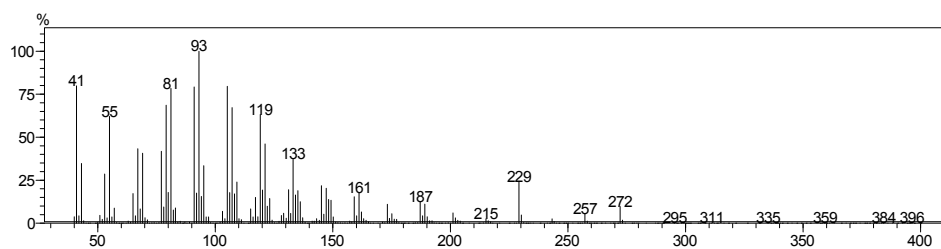


Abbildung 31. EI-MS Spektrum vom Substrat 1a (234 g/mol).

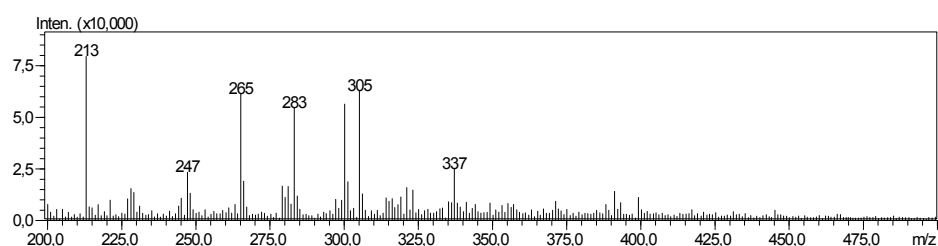


Abbildung 32. ESI-MS Spektrum eines (1a)-H Produktes (282 g/mol).

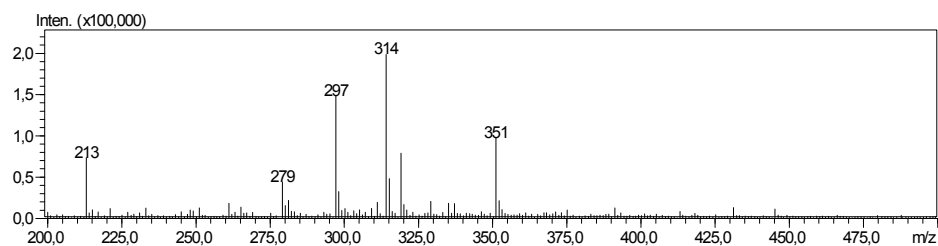


Abbildung 33. ESI-MS Spektrum eines (1a)-I Produktes (296 g/mol).

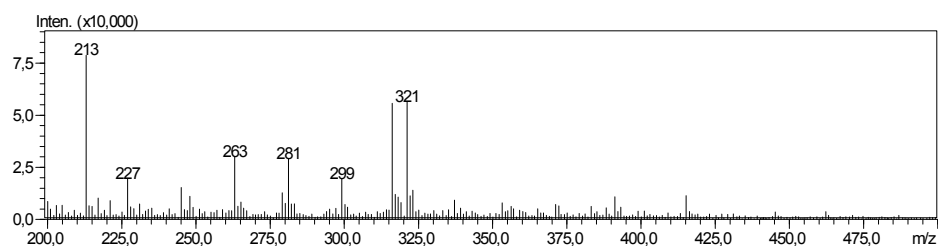


Abbildung 34. ESI-MS Spektrum eines (1a)-K Produktes (298 g/mol).

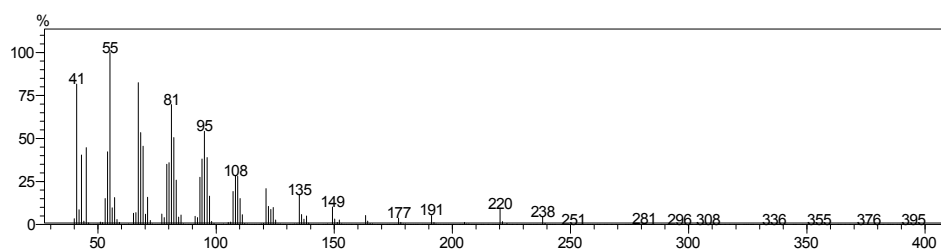


Abbildung 35. EI-MS Spektrum vom Substrat 1b (238 g/mol).

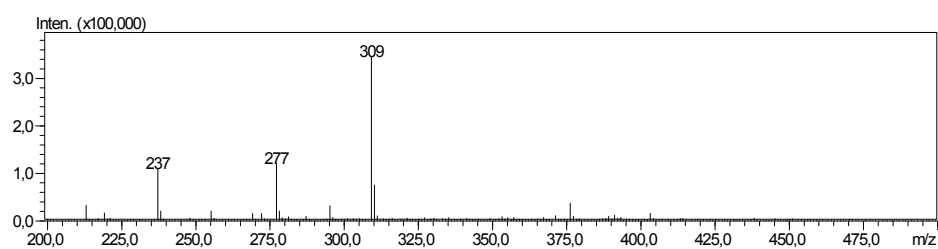


Abbildung 36. ESI-MS Spektrum eines (1b)-D Produktes (254 g/mol).

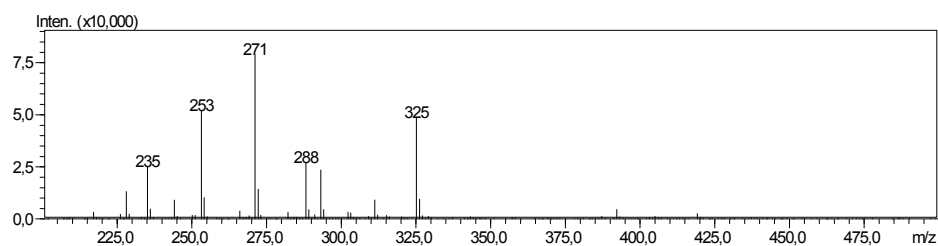


Abbildung 37. ESI-MS Spektrum eines (1b)-F Produktes (270 g/mol).

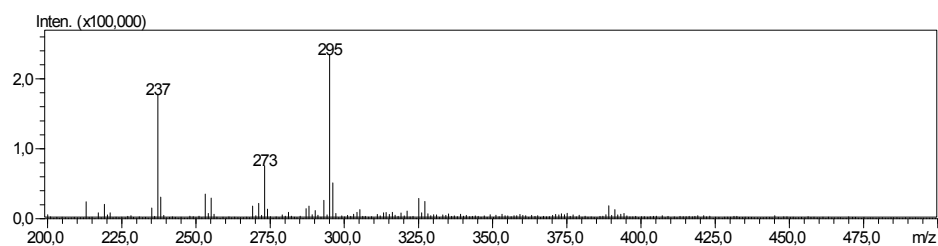


Abbildung 38. ESI-MS Spektrum eines (1b)-G Produktes (272 g/mol).

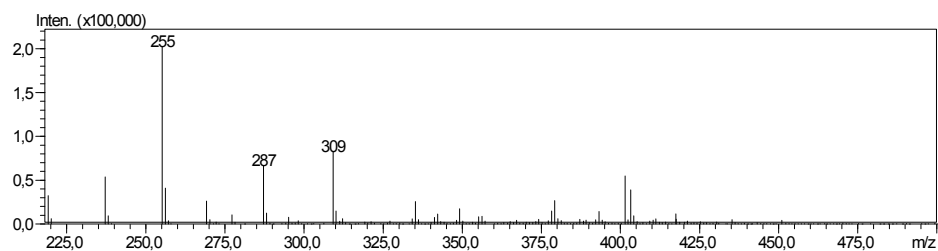


Abbildung 39. ESI-MS Spektrum vom Substrat 1c (254 g/mol).

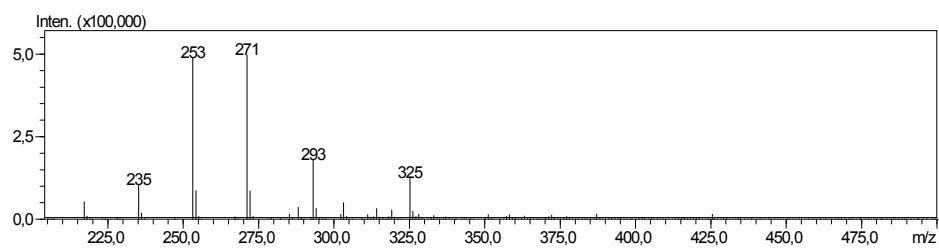


Abbildung 40. ESI-MS Spektrum eines (1c)-D Produktes (270 g/mol).

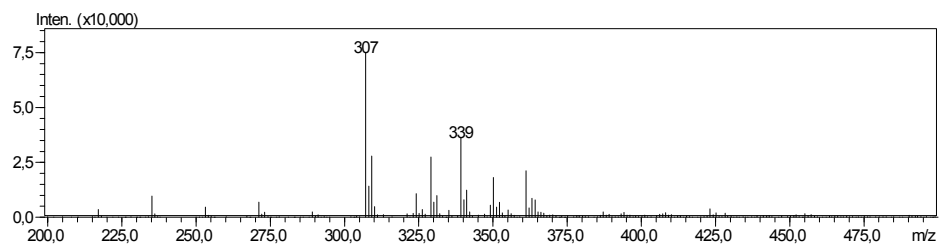


Abbildung 41. ESI-MS Spektrum eines (1c)-E Produktes (284 g/mol).

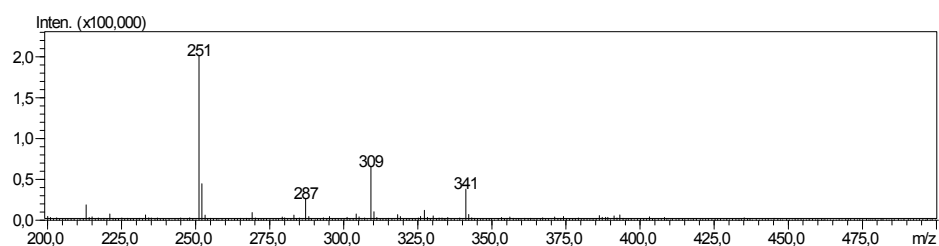


Abbildung 42. ESI-MS Spektrum eines (1c)-F Produktes (286 g/mol).

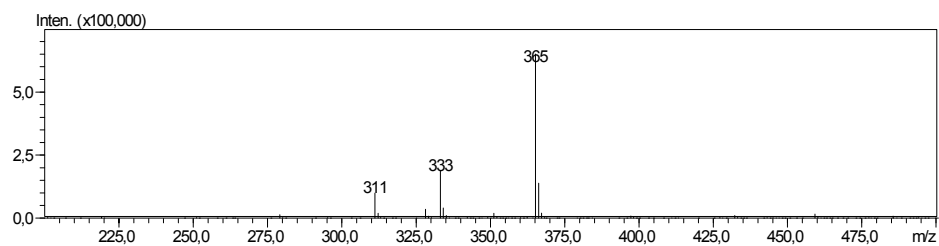


Abbildung 43. ESI-MS Spektrum vom Substrat 1d (310 g/mol).

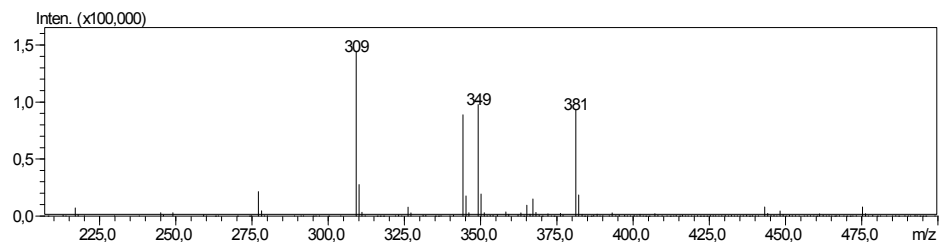


Abbildung 44. ESI-MS Spektrum eines (1d)-D Produktes (326 g/mol).

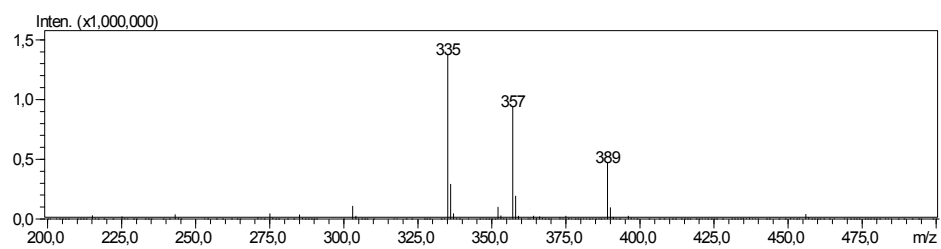


Abbildung 45. ESI-MS Spektrum vom Substrat 2d (334 g/mol).

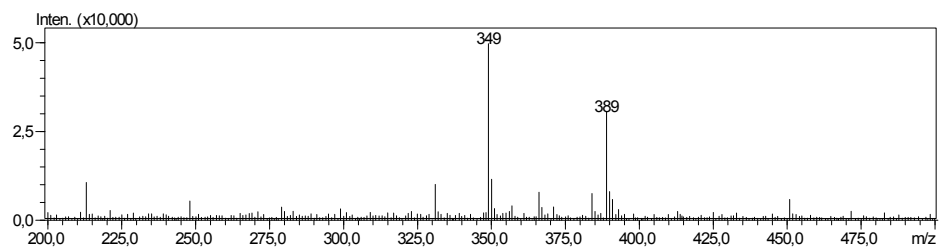


Abbildung 46. ESI-MS Spektrum eines (2d)-C Produktes (348 g/mol).

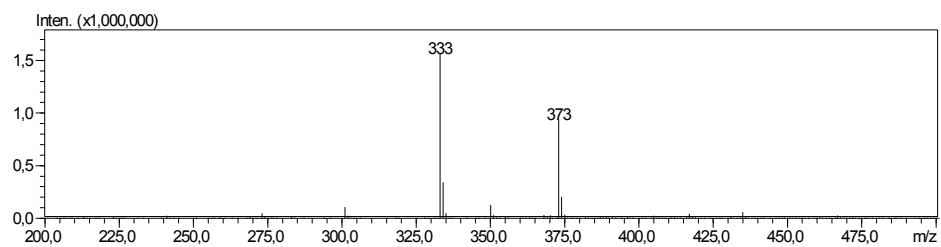


Abbildung 47. ESI-MS Spektrum eines (2d)-D Produktes (350 g/mol).

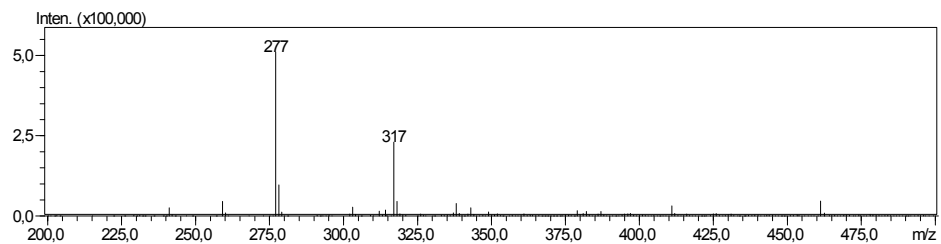


Abbildung 48. ESI-MS Spektrum vom Substrat 3c (294 g/mol).

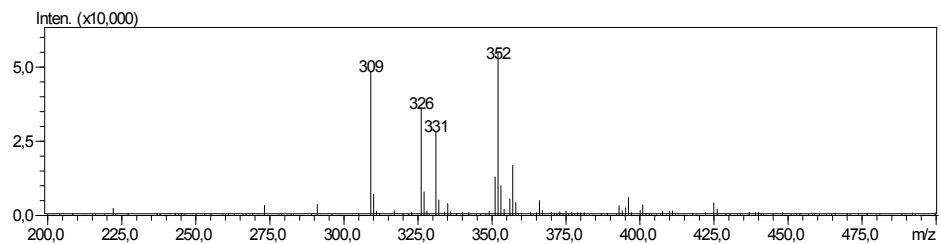


Abbildung 49. ESI-MS Spektrum eines (3c)-C Produktes (308 g/mol).

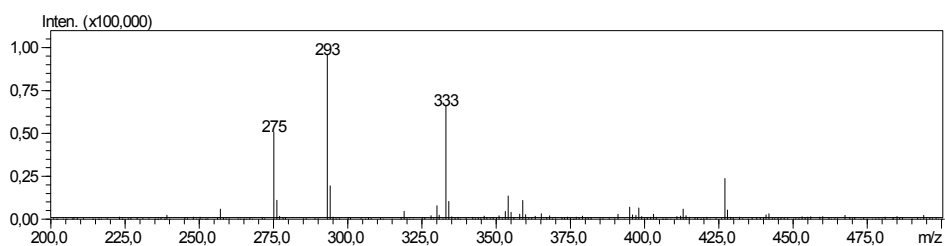


Abbildung 50. ESI-MS Spektrum eines (3c)-D Produktes (310 g/mol).

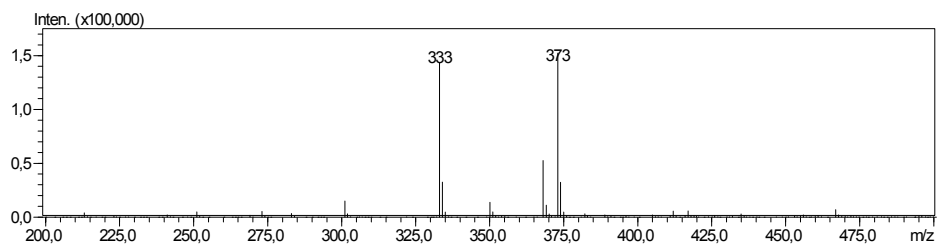


Abbildung 51. ESI-MS Spektrum vom Substrat 3d (350 g/mol).

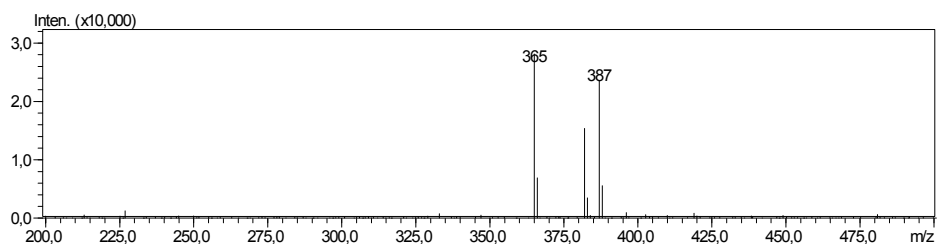


Abbildung 52. ESI-MS Spektrum eines (3d)-C Produktes (364 g/mol).

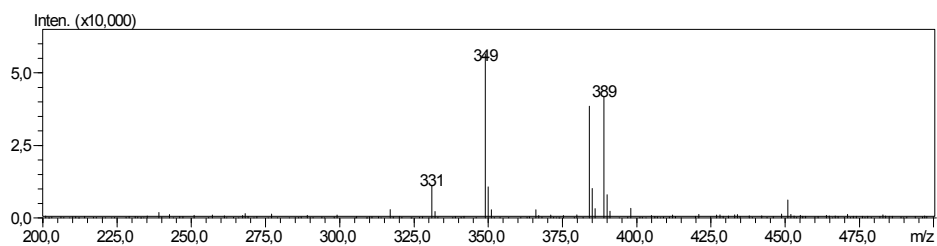


Abbildung 53. ESI-MS Spektrum eines (3d)-D Produktes (366 g/mol).

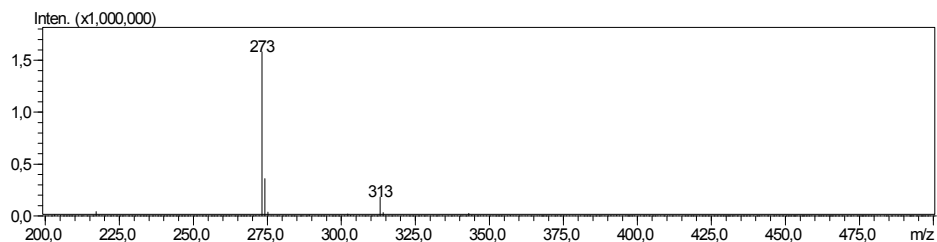


Abbildung 54. ESI-MS Spektrum vom Substrat 4 (290 g/mol).

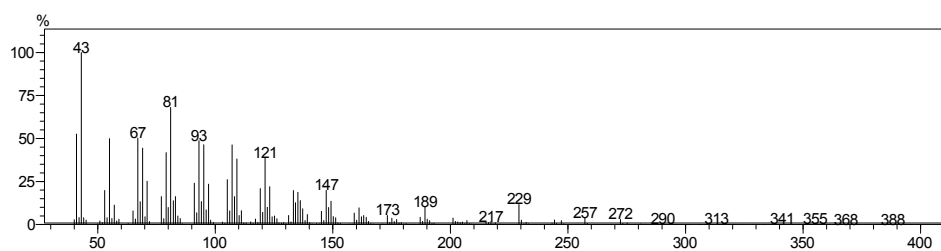


Abbildung 55. EI-MS Spektrum vom Substrat 4 (290 g/mol).

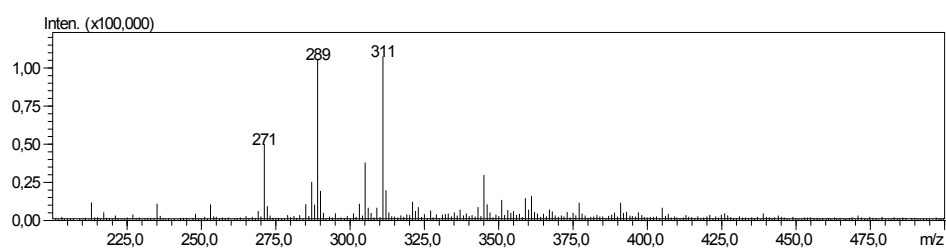


Abbildung 56. ESI-MS Spektrum eines (4)-B Produktes (288 g/mol).

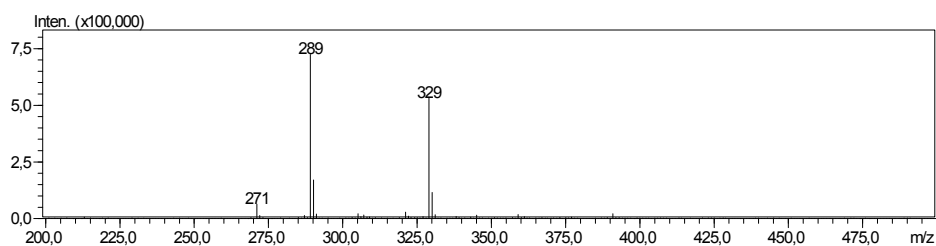


Abbildung 57. ESI-MS Spektrum eines (4)-D Produktes (306 g/mol).

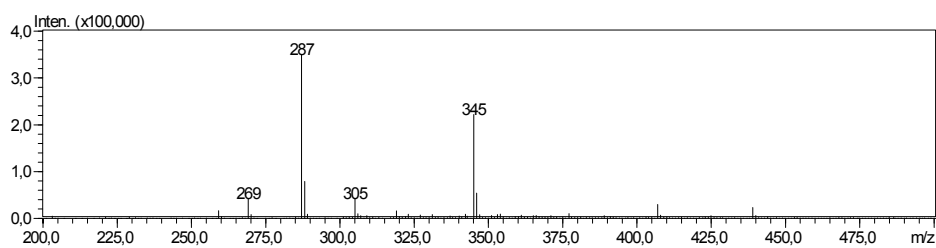


Abbildung 58. ESI-MS Spektrum eines (4)-F Produktes (322 g/mol).

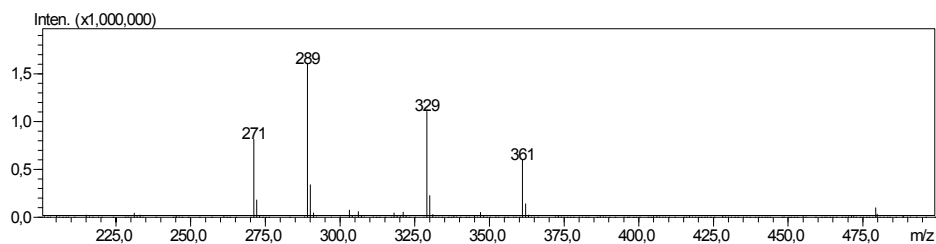


Abbildung 59. ESI-MS Spektrum vom Substrat 5 (306 g/mol).

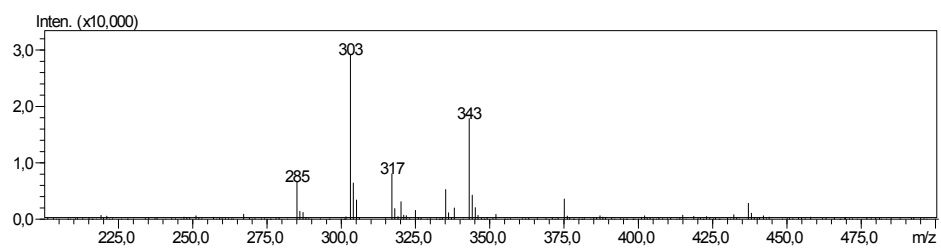


Abbildung 60. ESI-MS Spektrum eines (5)-C Produktes (320 g/mol).

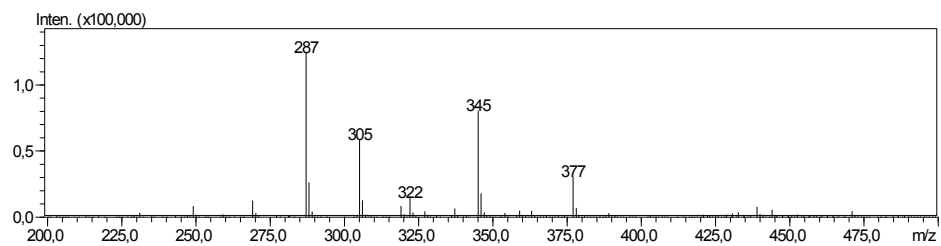


Abbildung 61. ESI-MS Spektrum eines (5)-D Produktes (322 g/mol).

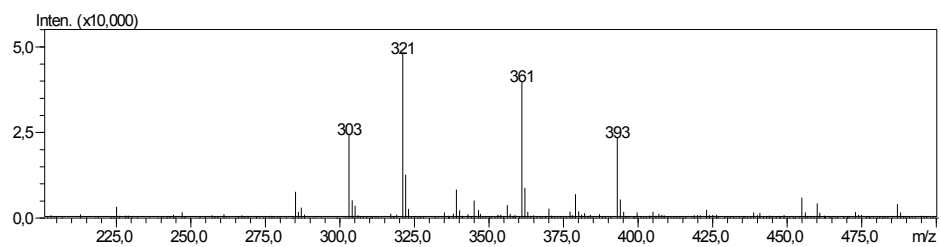


Abbildung 62. ESI-MS Spektrum eines (5)-F Produktes (338 g/mol).

9.5 1D- und 2D-NMR-Spektren

9.5.1 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**)

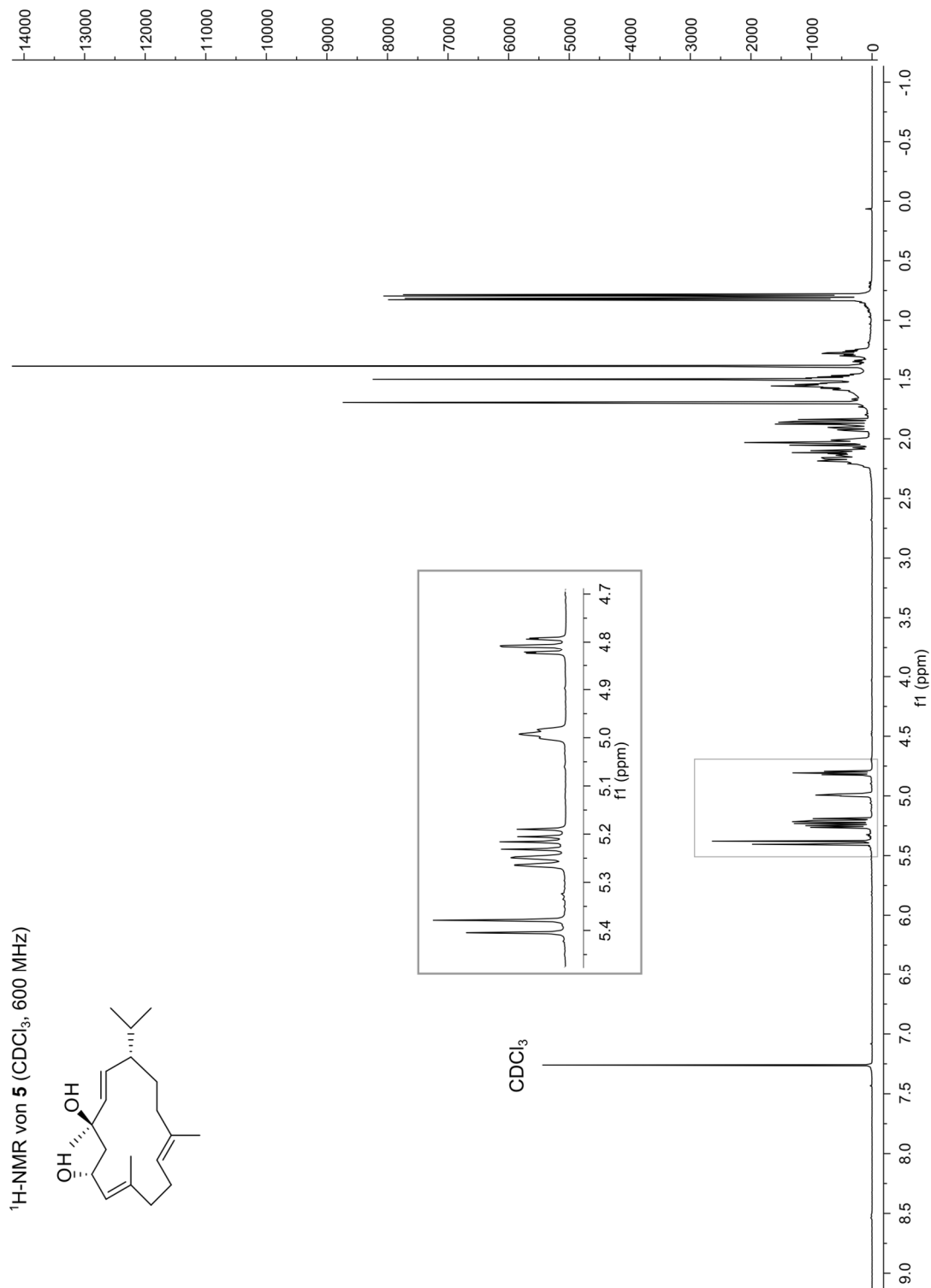
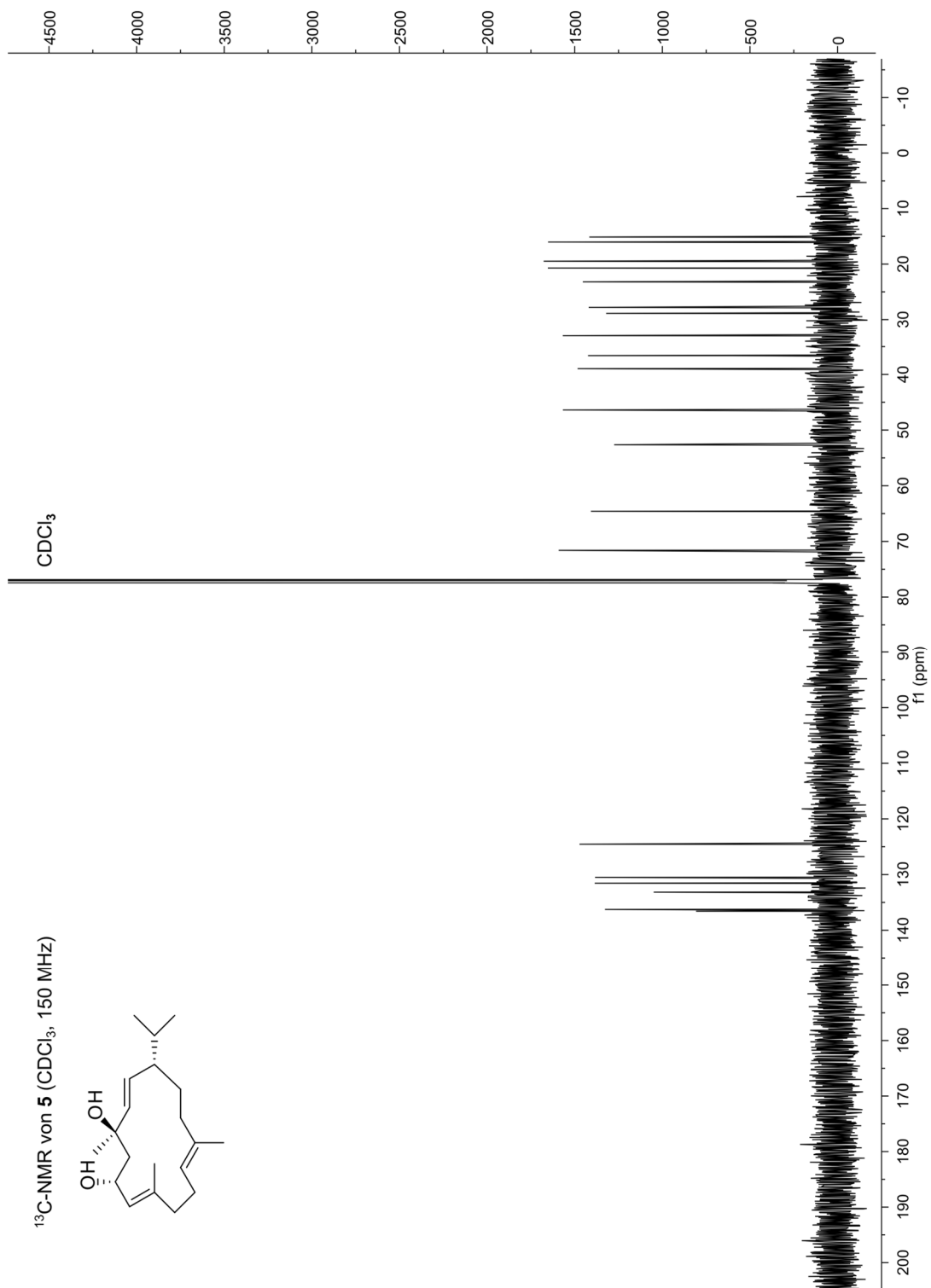
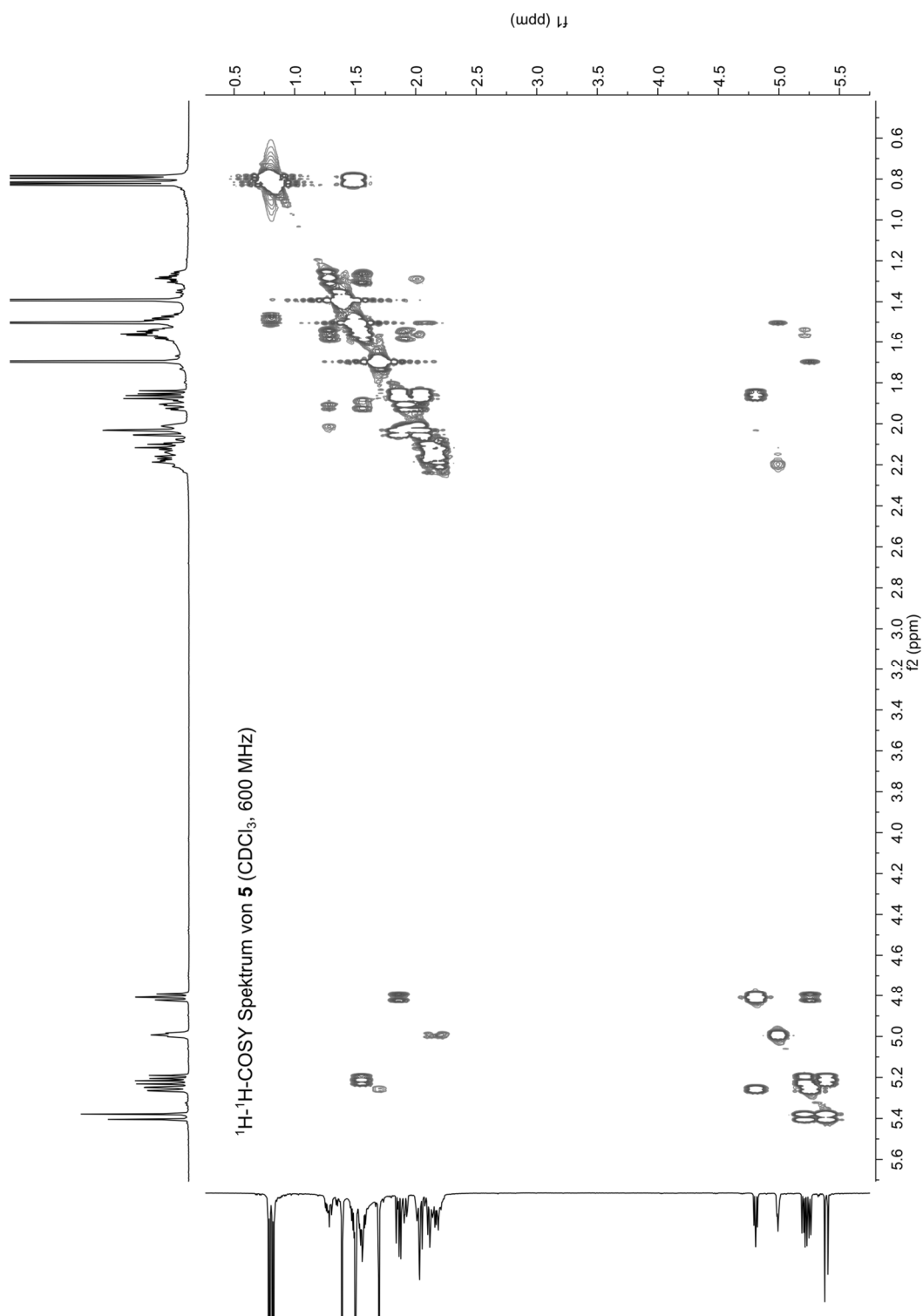
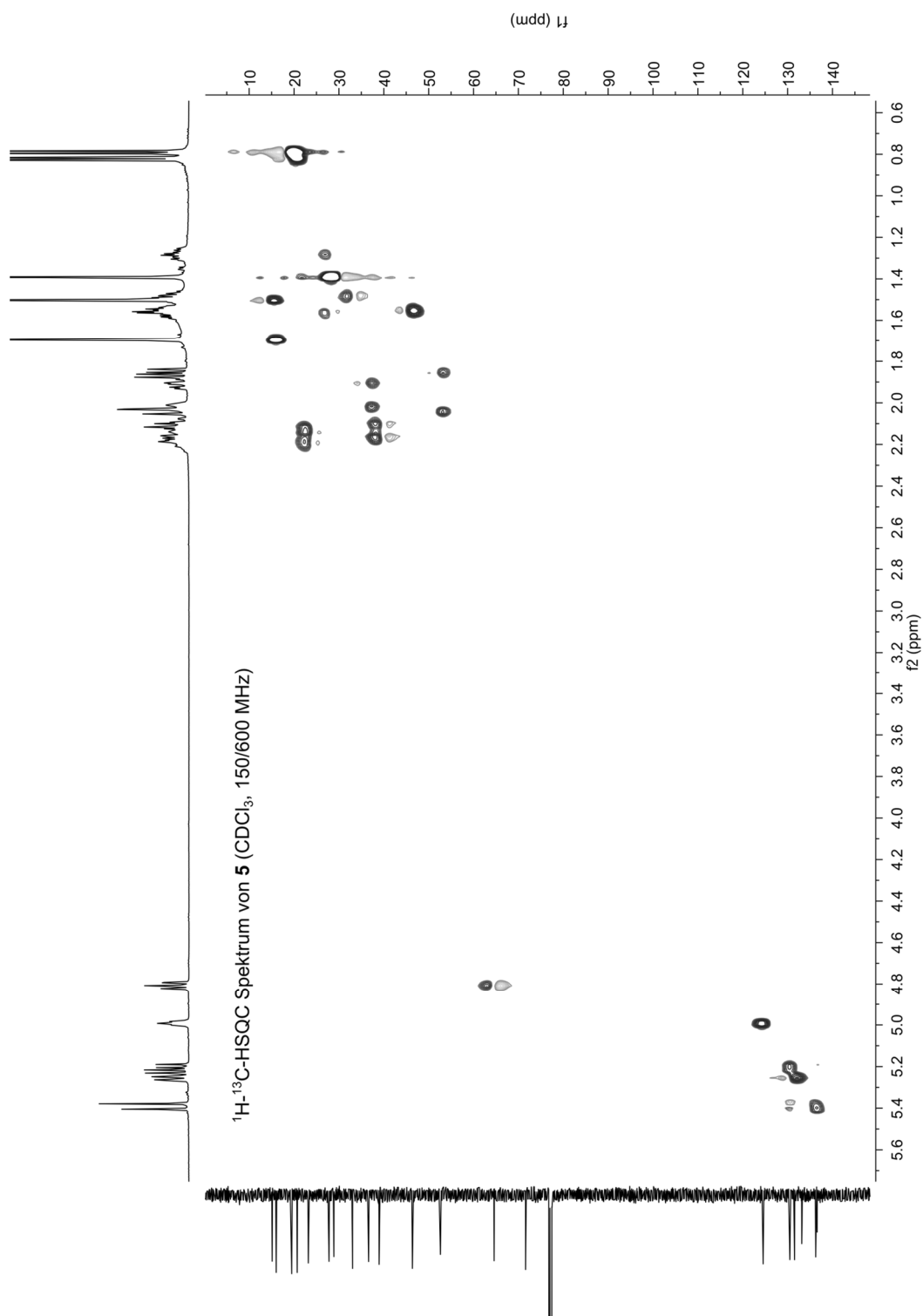
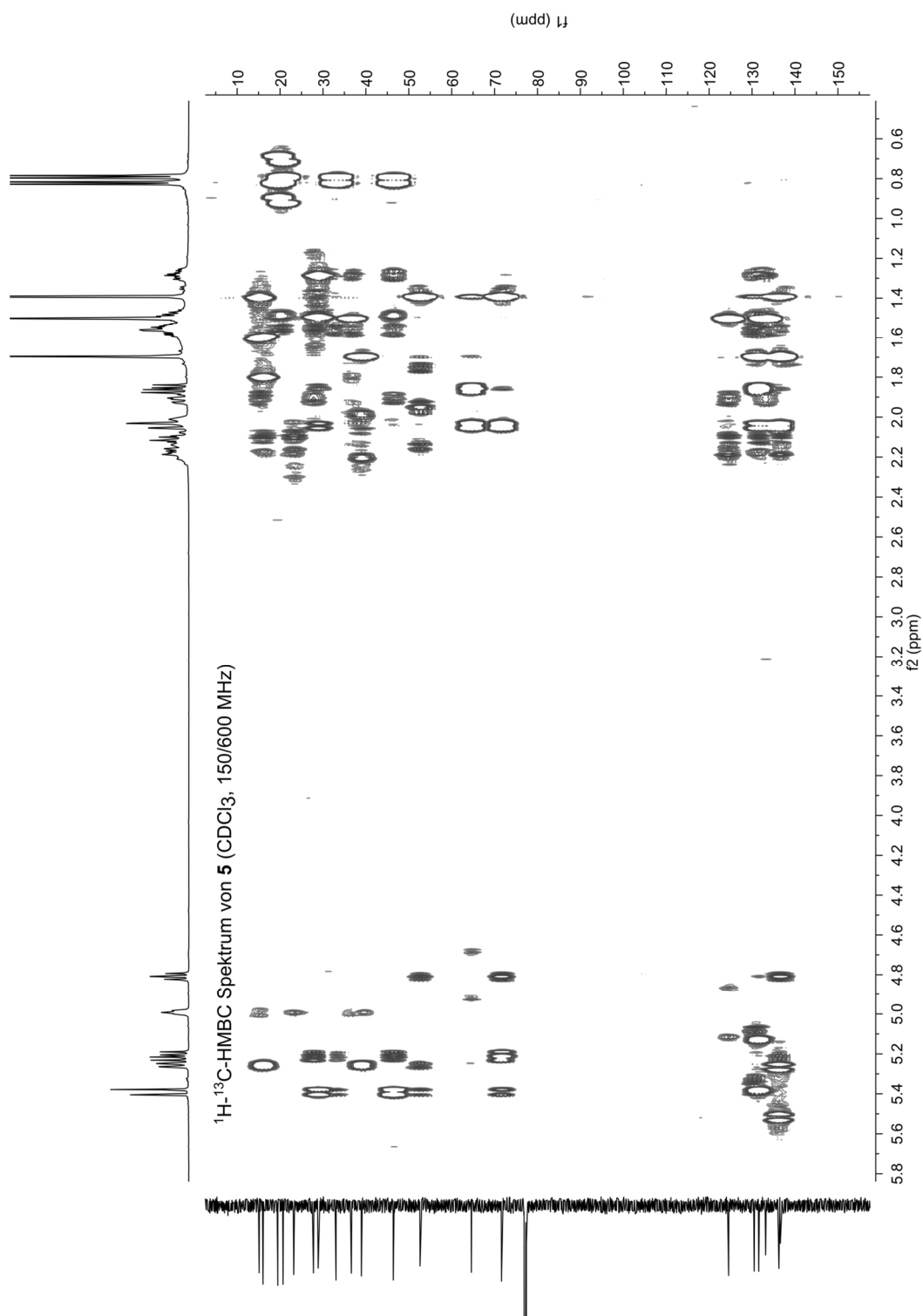


Abbildung 63. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**) in CDCl₃. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

Abbildung 64. ¹³C-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**) in CDCl₃.

Abbildung 65. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**) in CDCl_3 .

Abbildung 66. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**) in CDCl_3 .

Abbildung 67. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6-diol (**5**) in CDCl_3 .

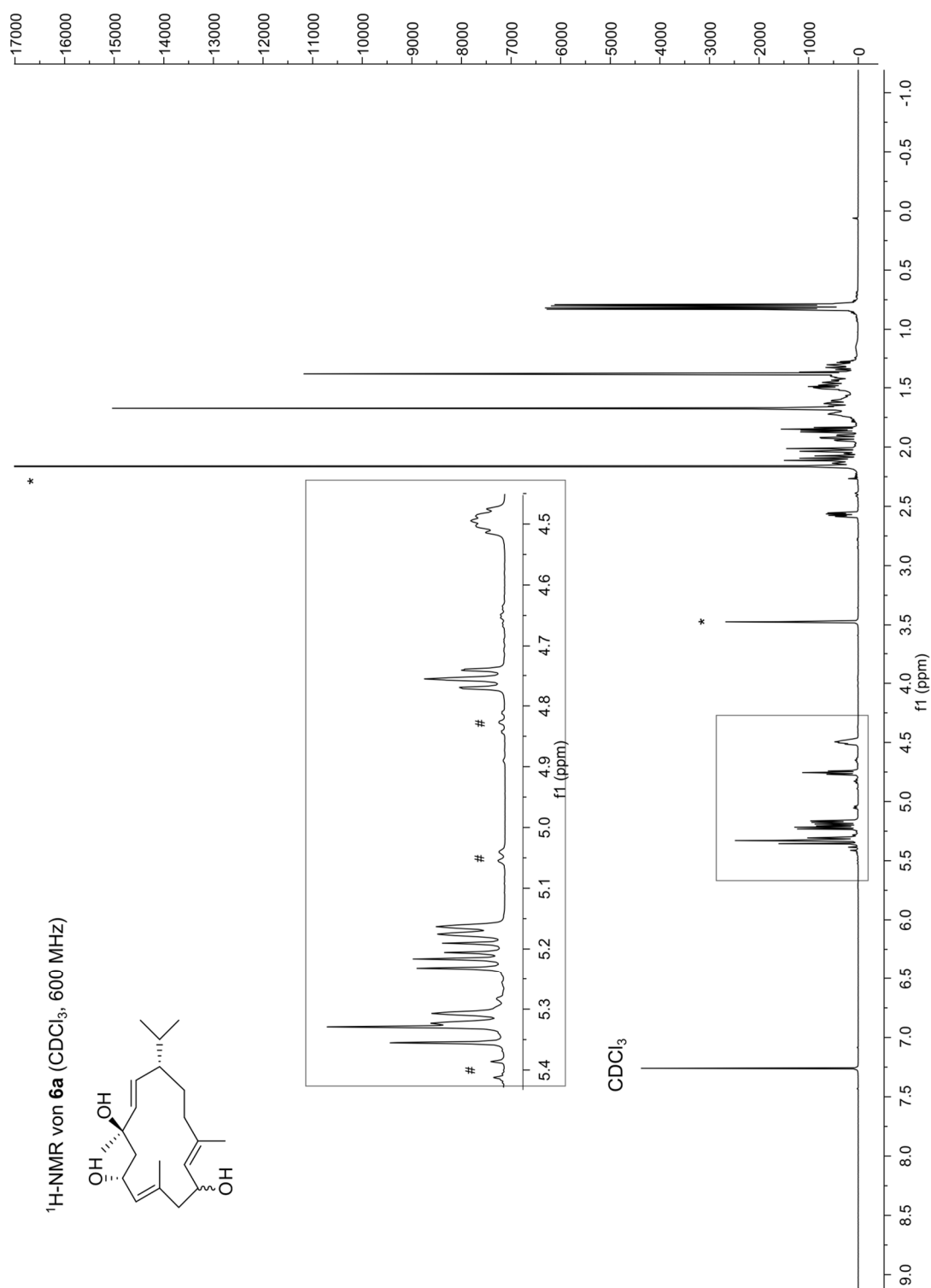
9.5.2 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6a)

Abbildung 68. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6a**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. #Geringe Verunreinigungen durch **6b**. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

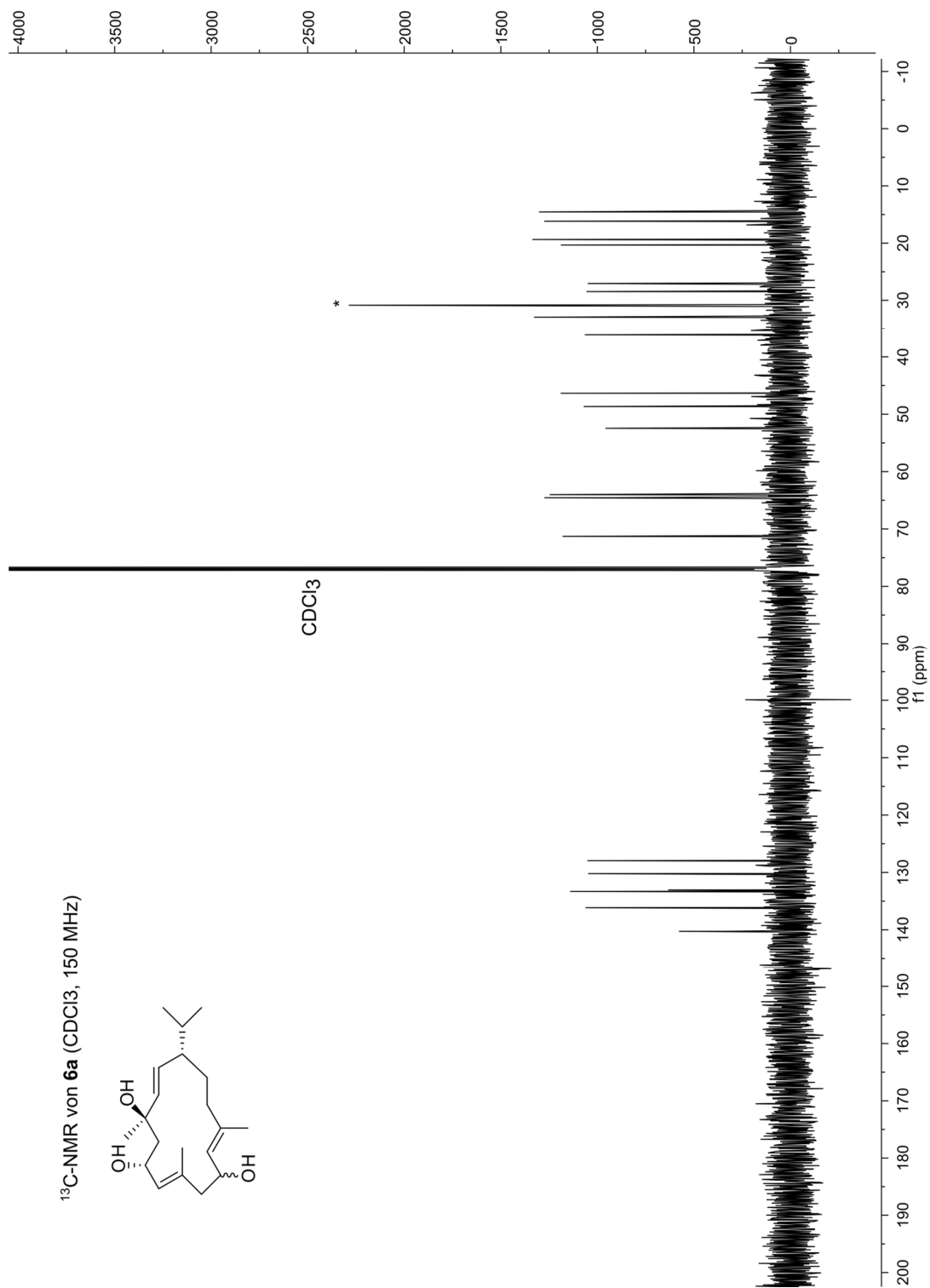
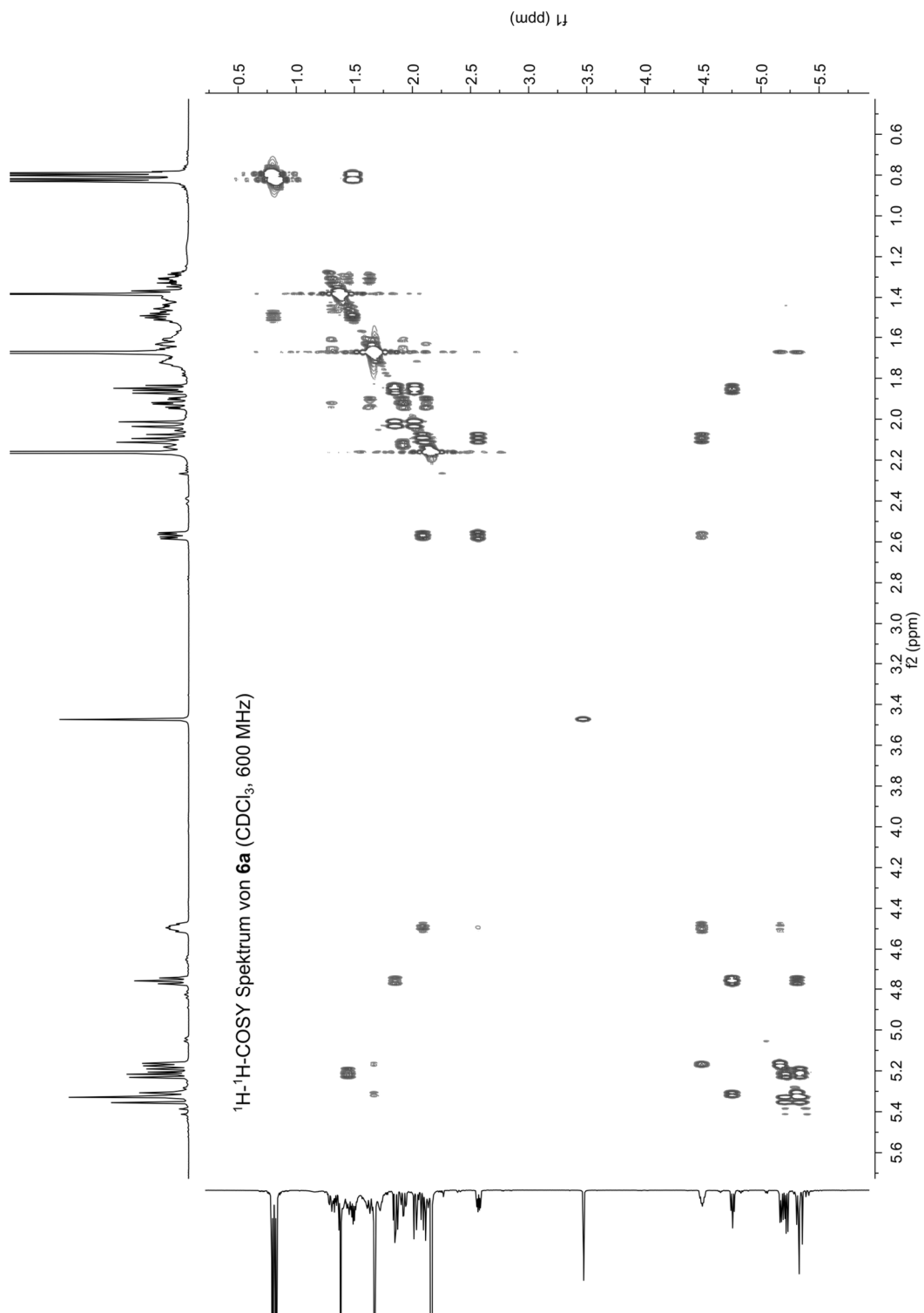
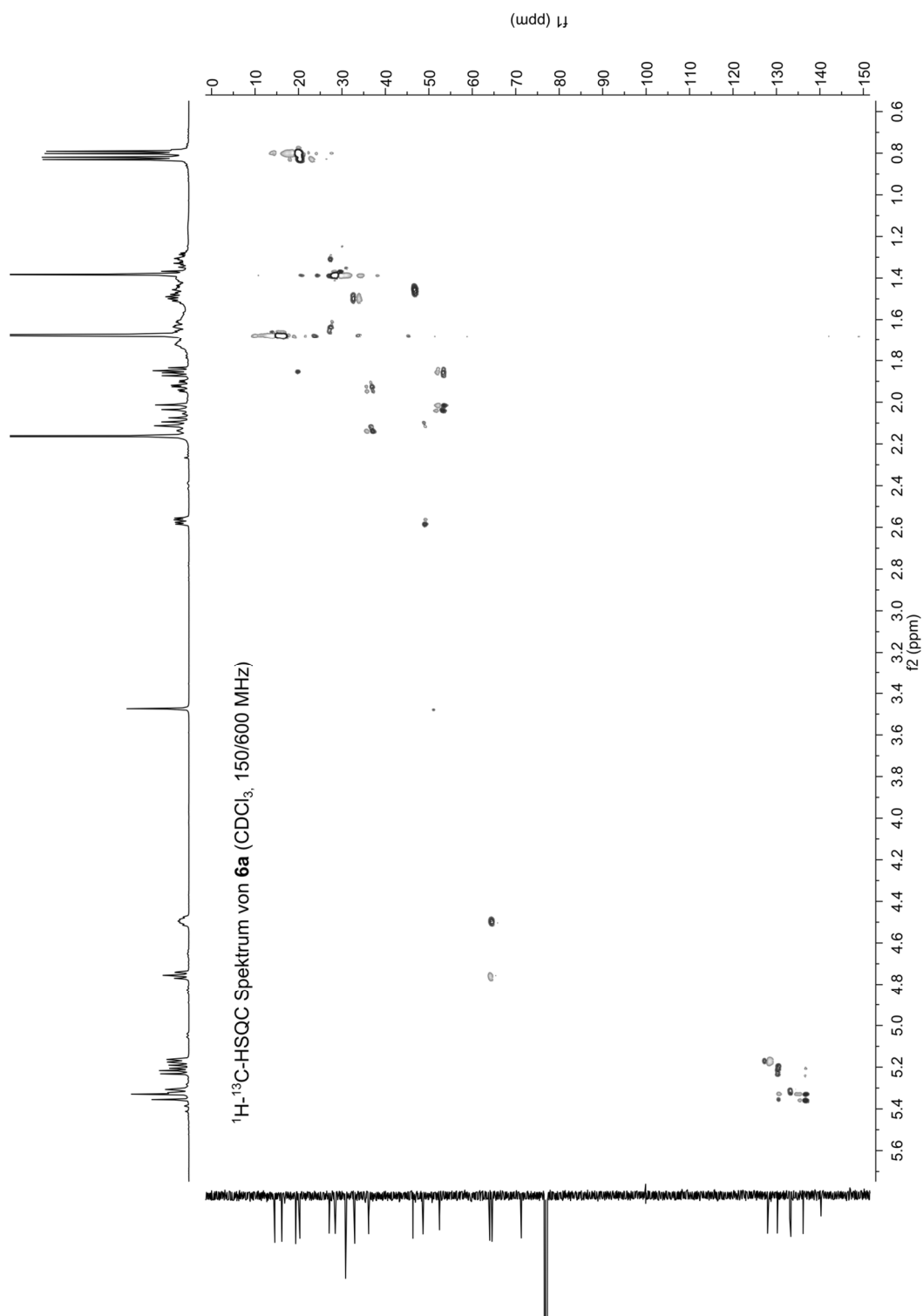
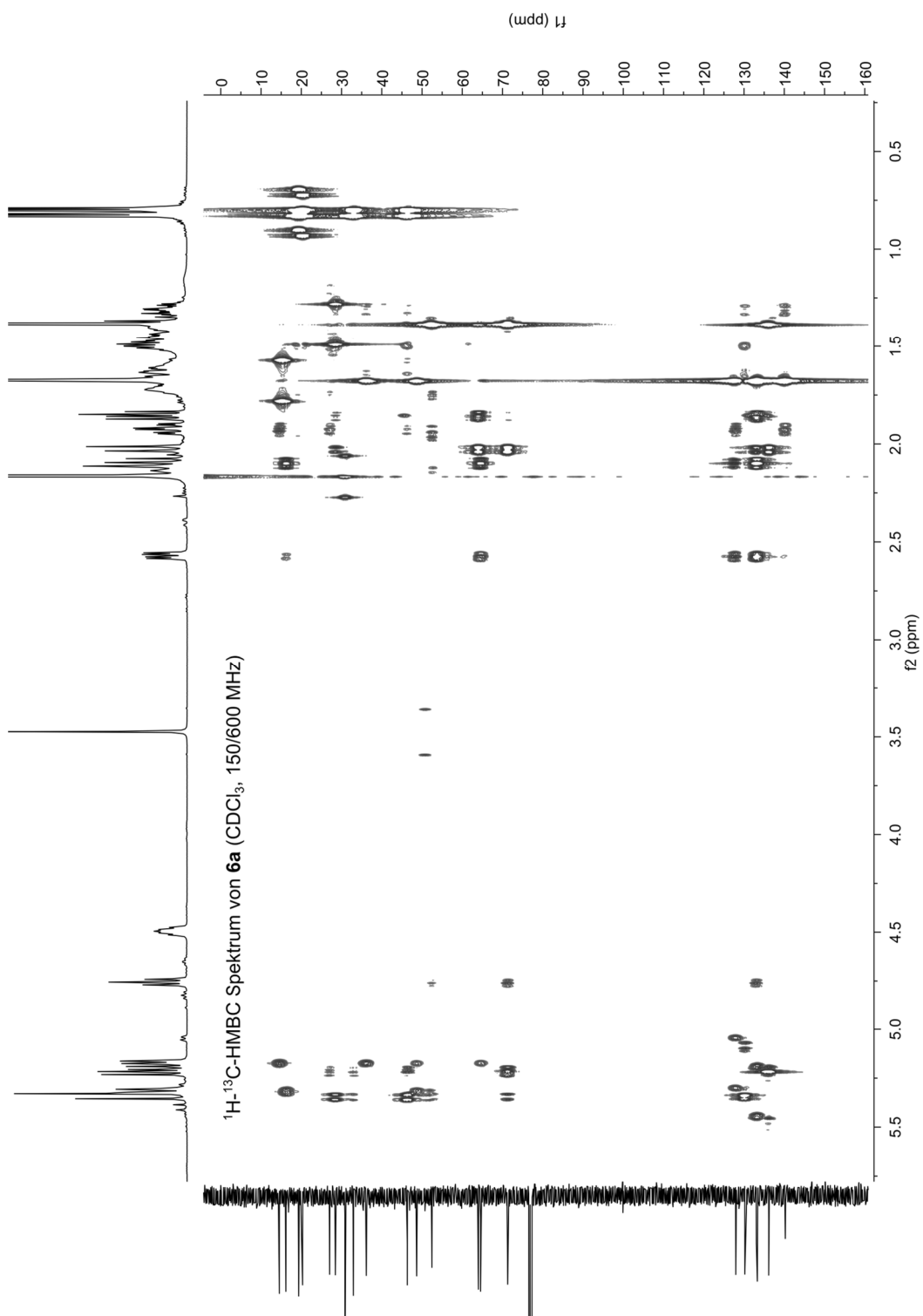


Abbildung 69. ¹³C-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6a**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel.

Abbildung 70. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6a**) in CDCl_3 .

Abbildung 71. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6a**) in CDCl_3 .

Abbildung 72. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6a**) in CDCl_3 .

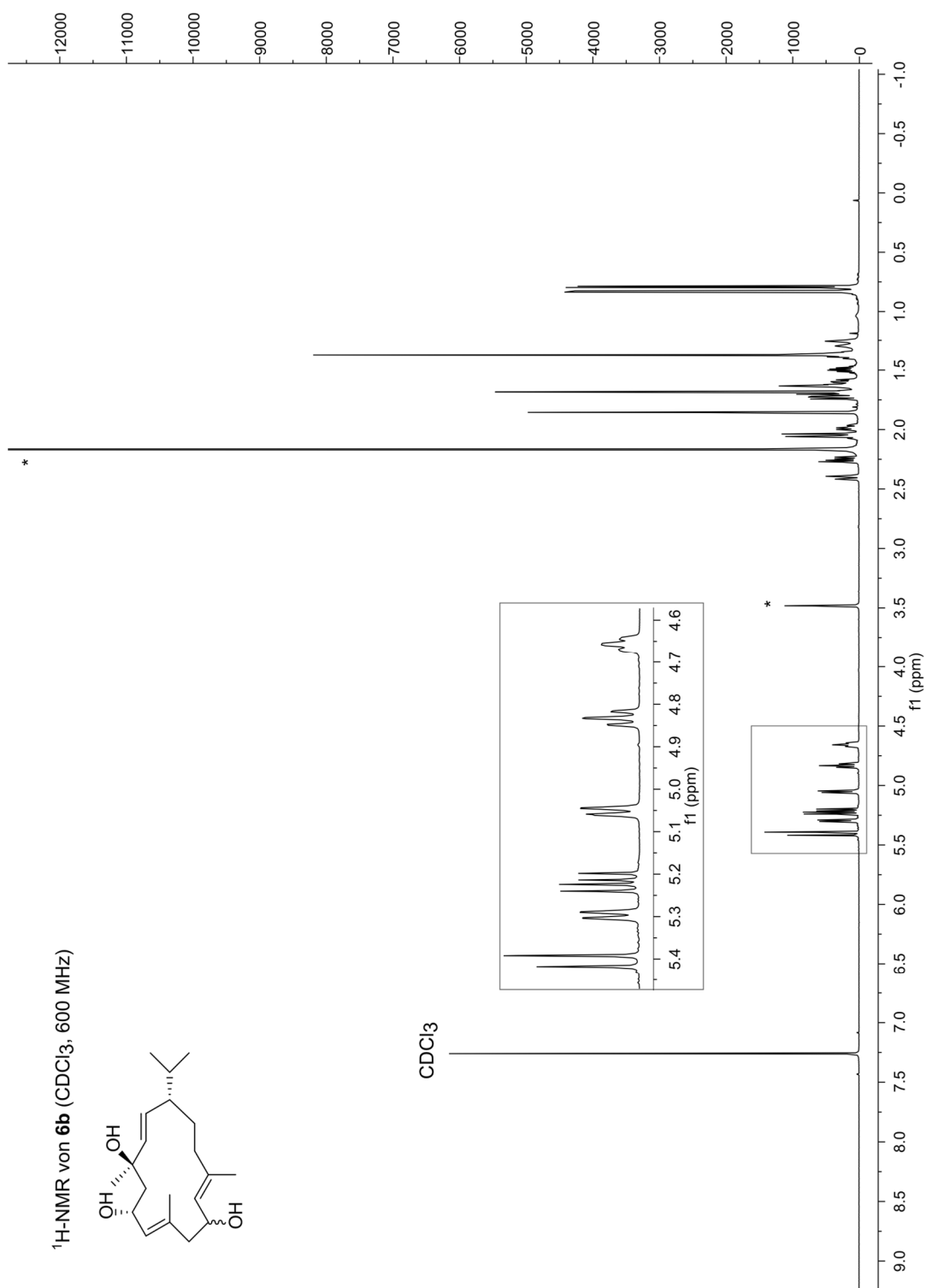
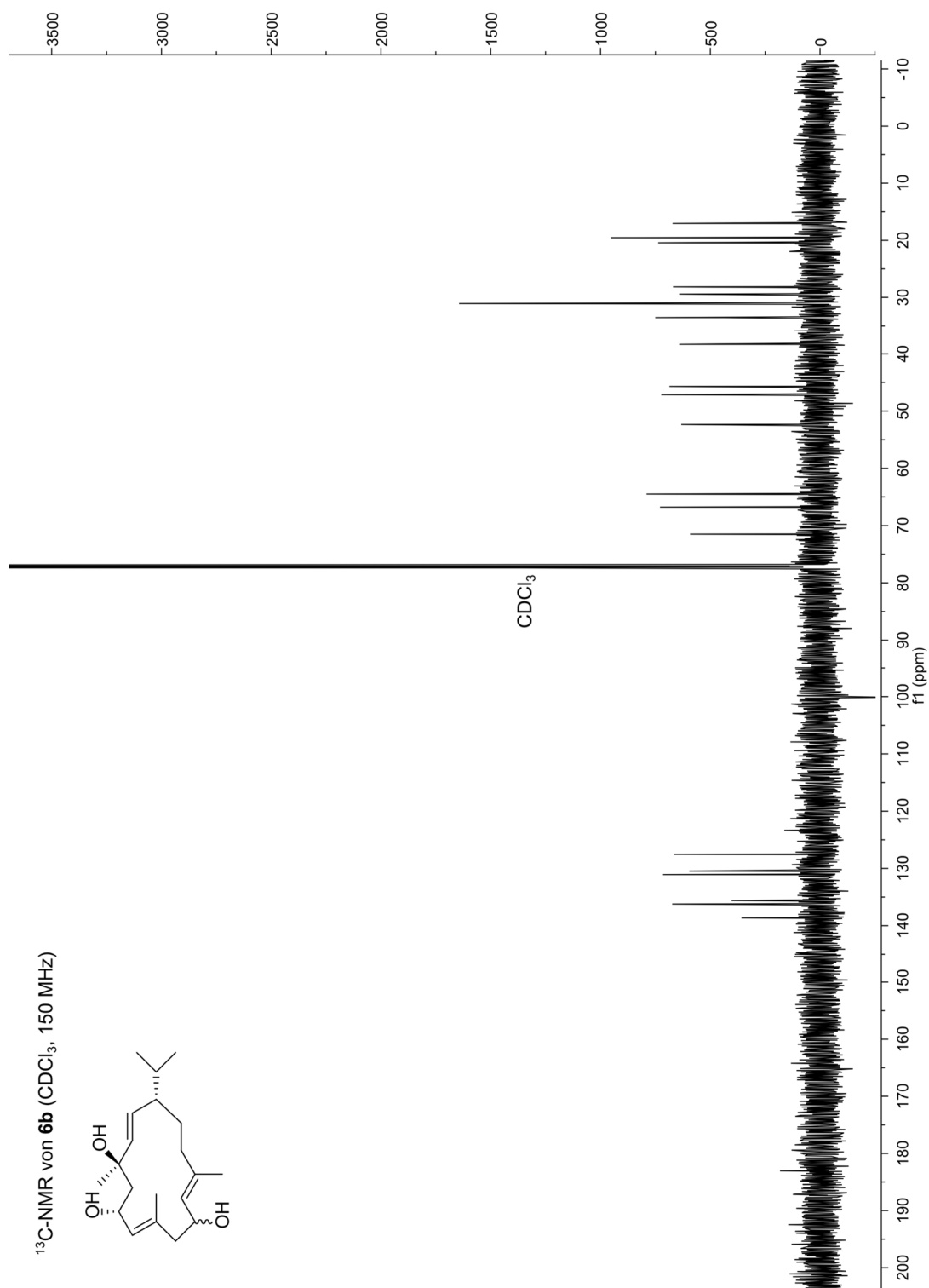
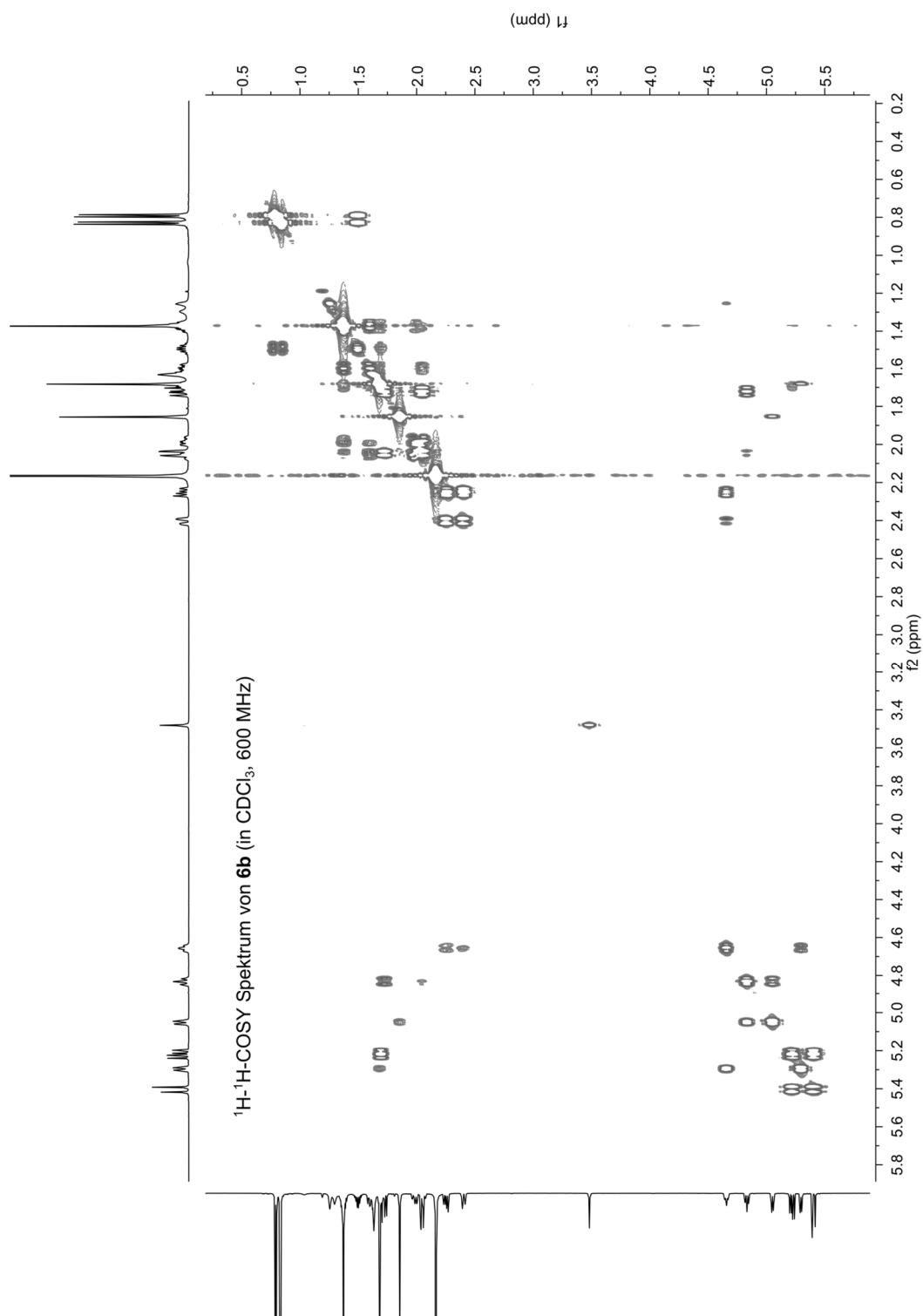
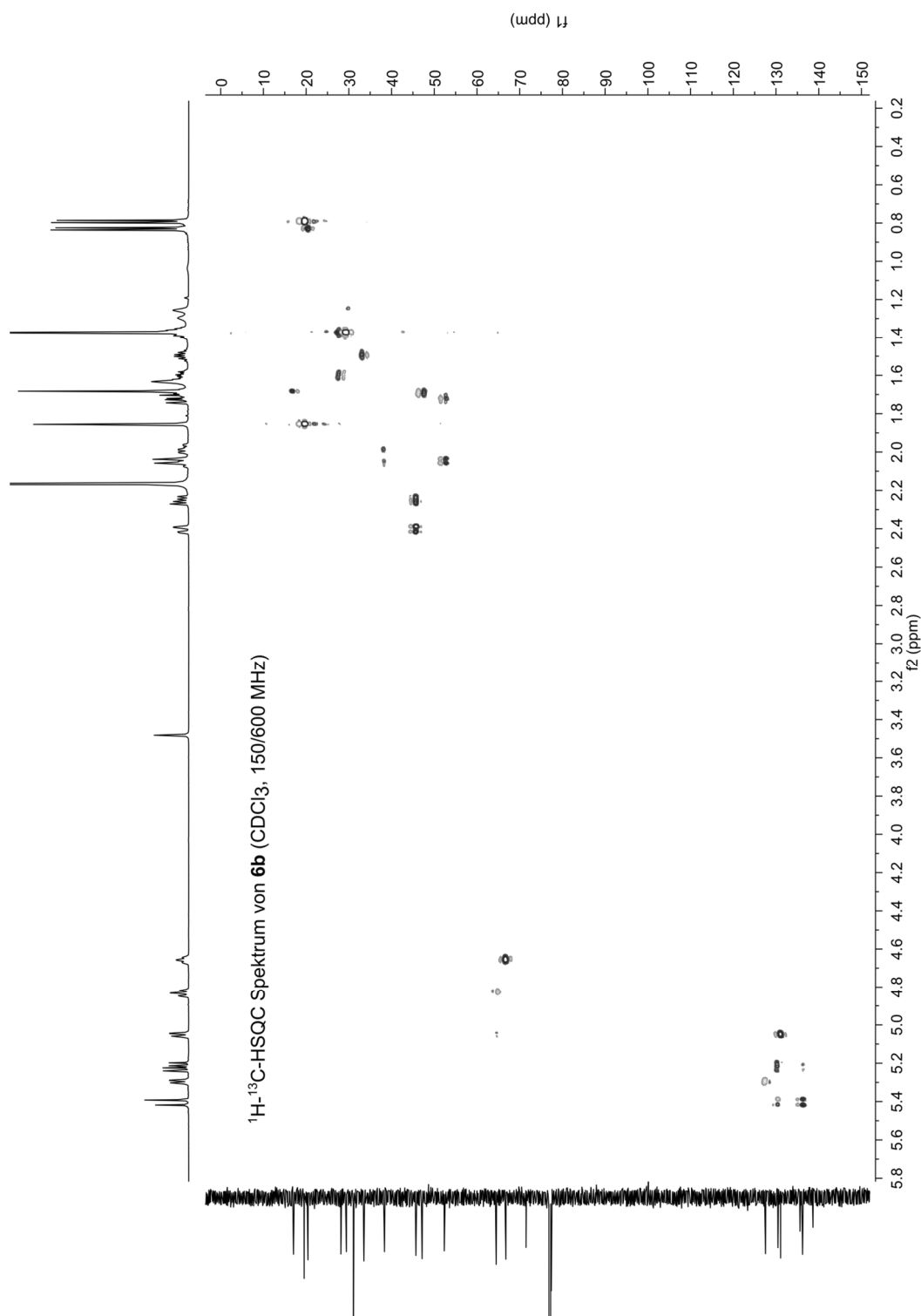
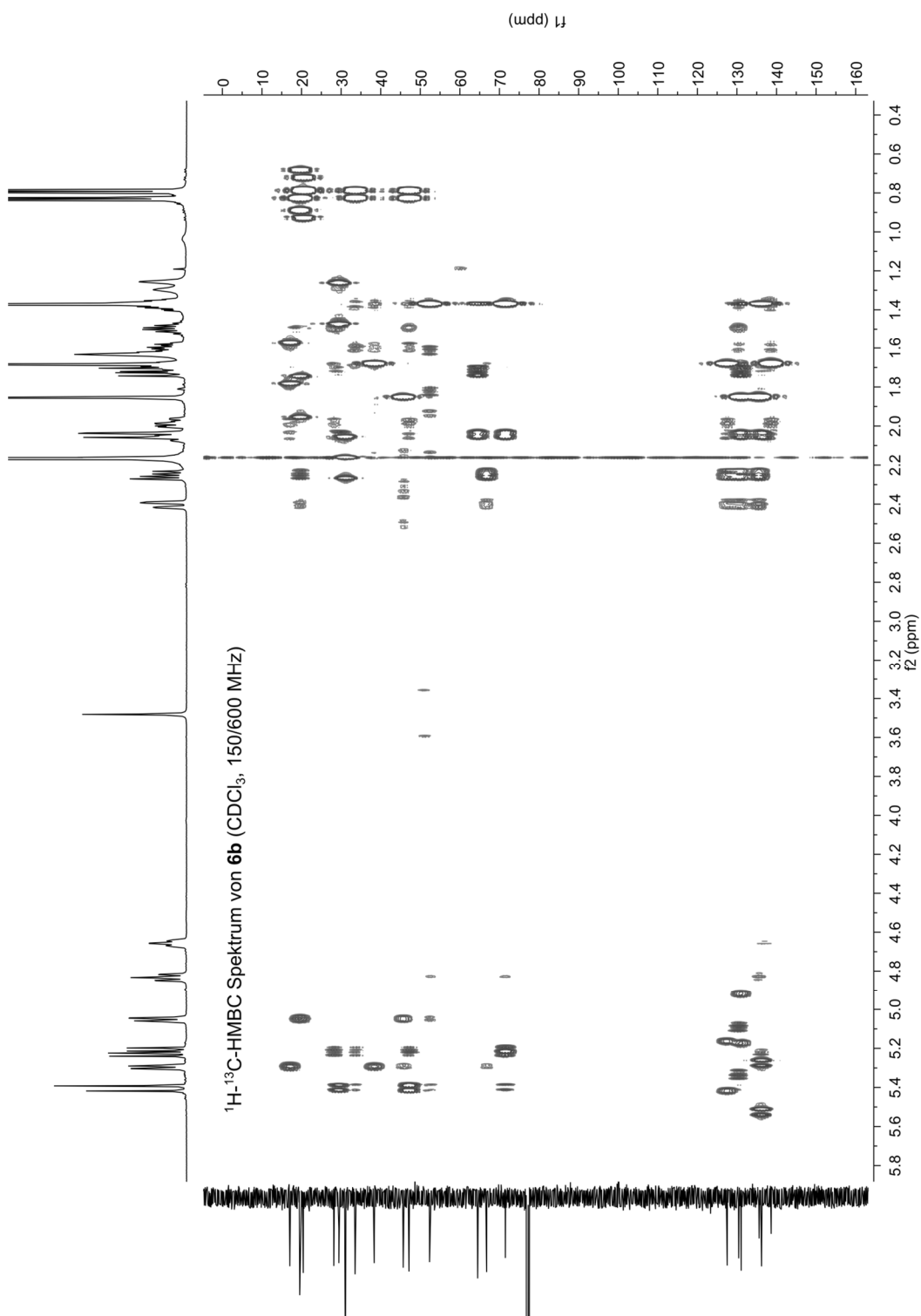
9.5.3 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (6b)

Abbildung 73. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6b**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

Abbildung 74. ¹³C-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6b**) in CDCl₃.

Abbildung 75. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6b**) in CDCl_3 .

Abbildung 76. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6b**) in CDCl_3 .

Abbildung 77. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,10-triol (**6b**) in CDCl_3 .

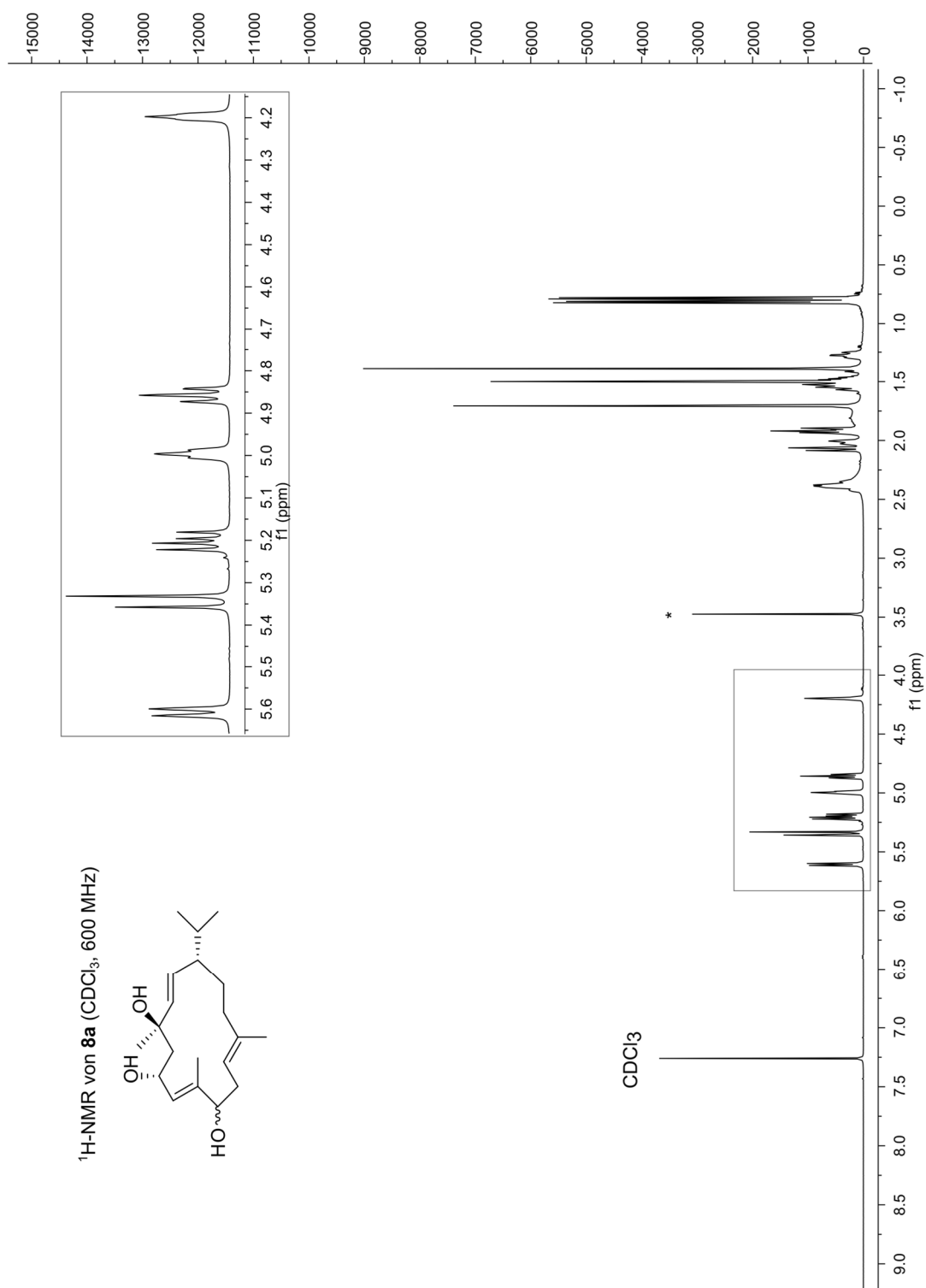
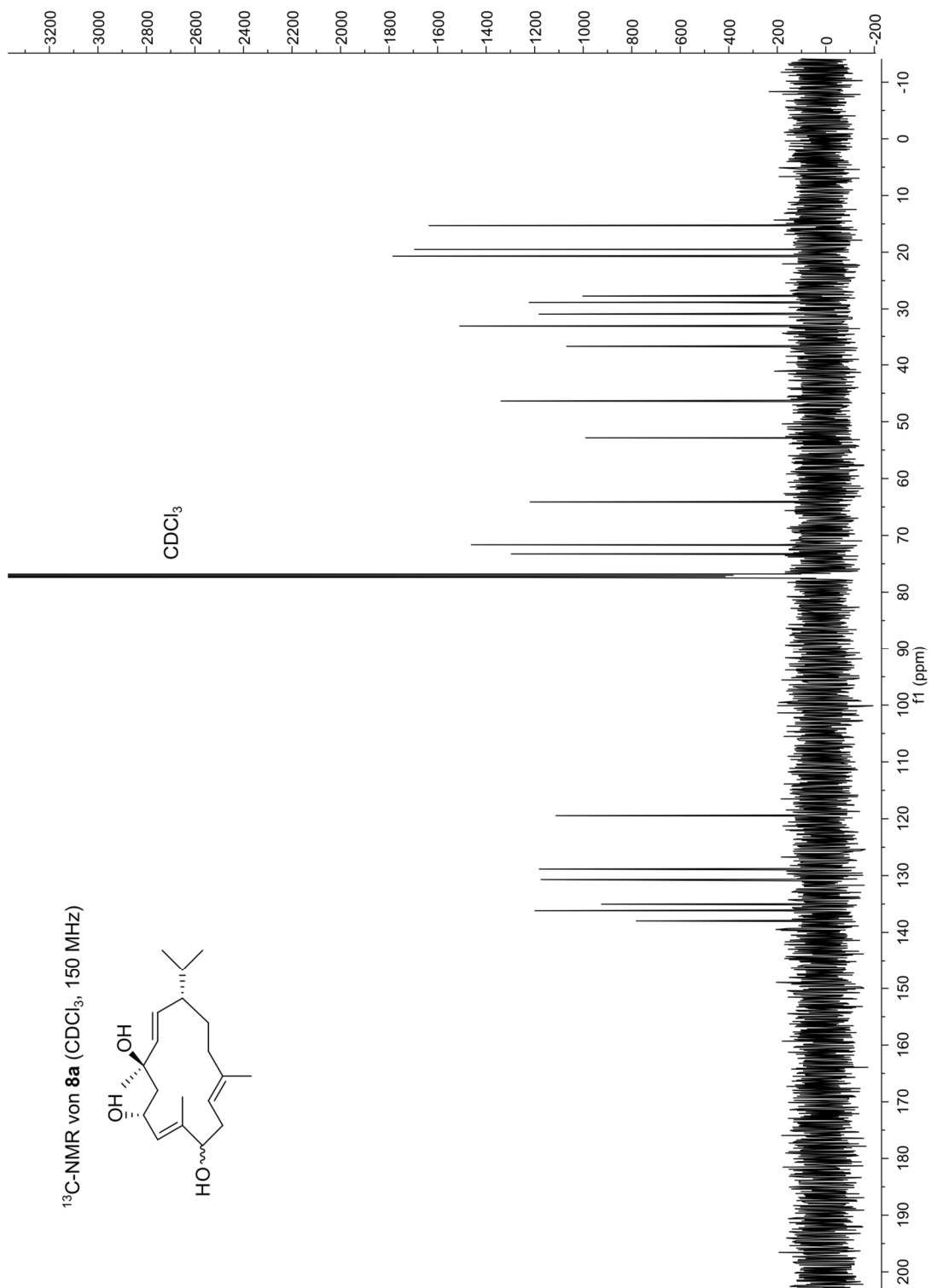
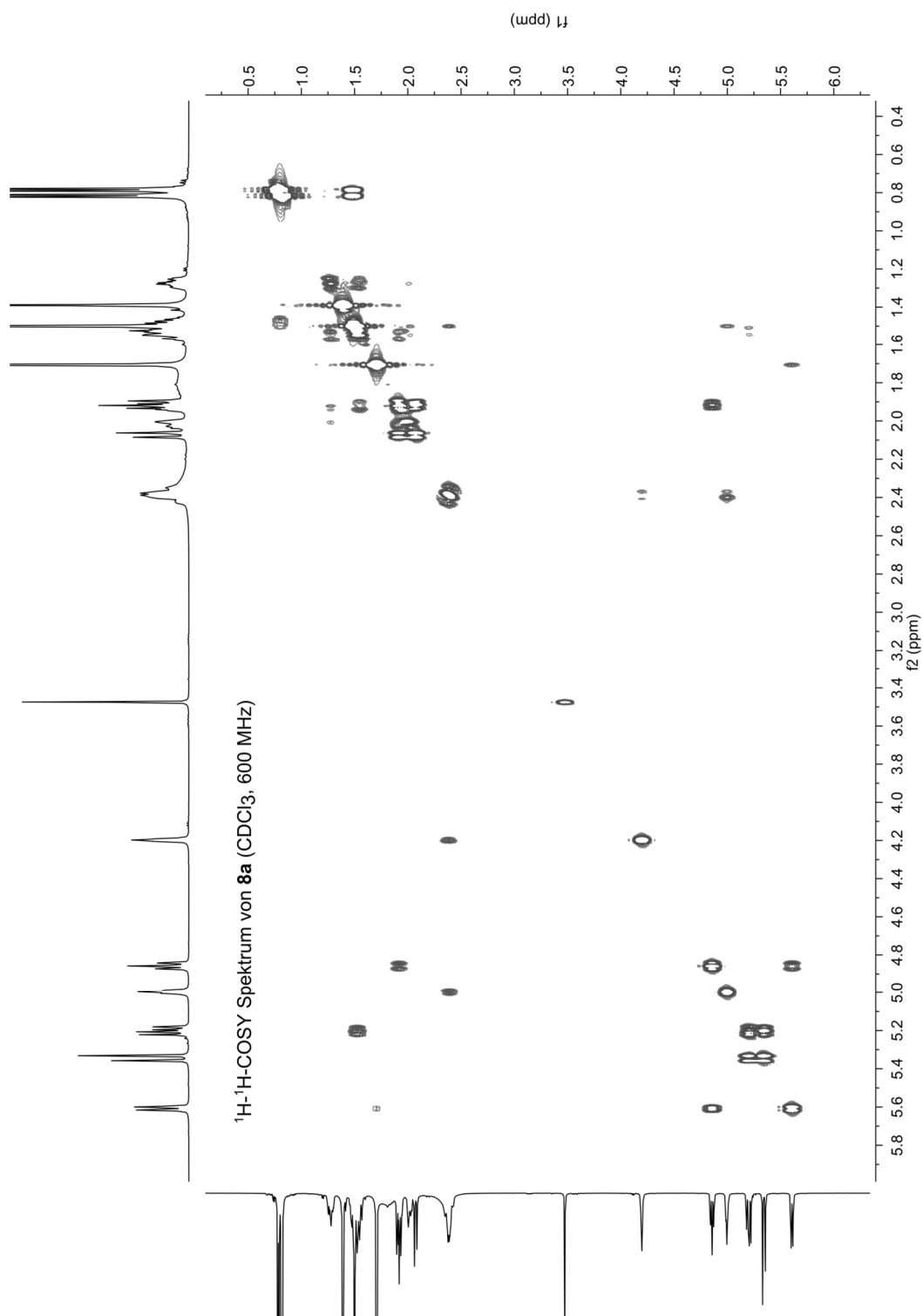
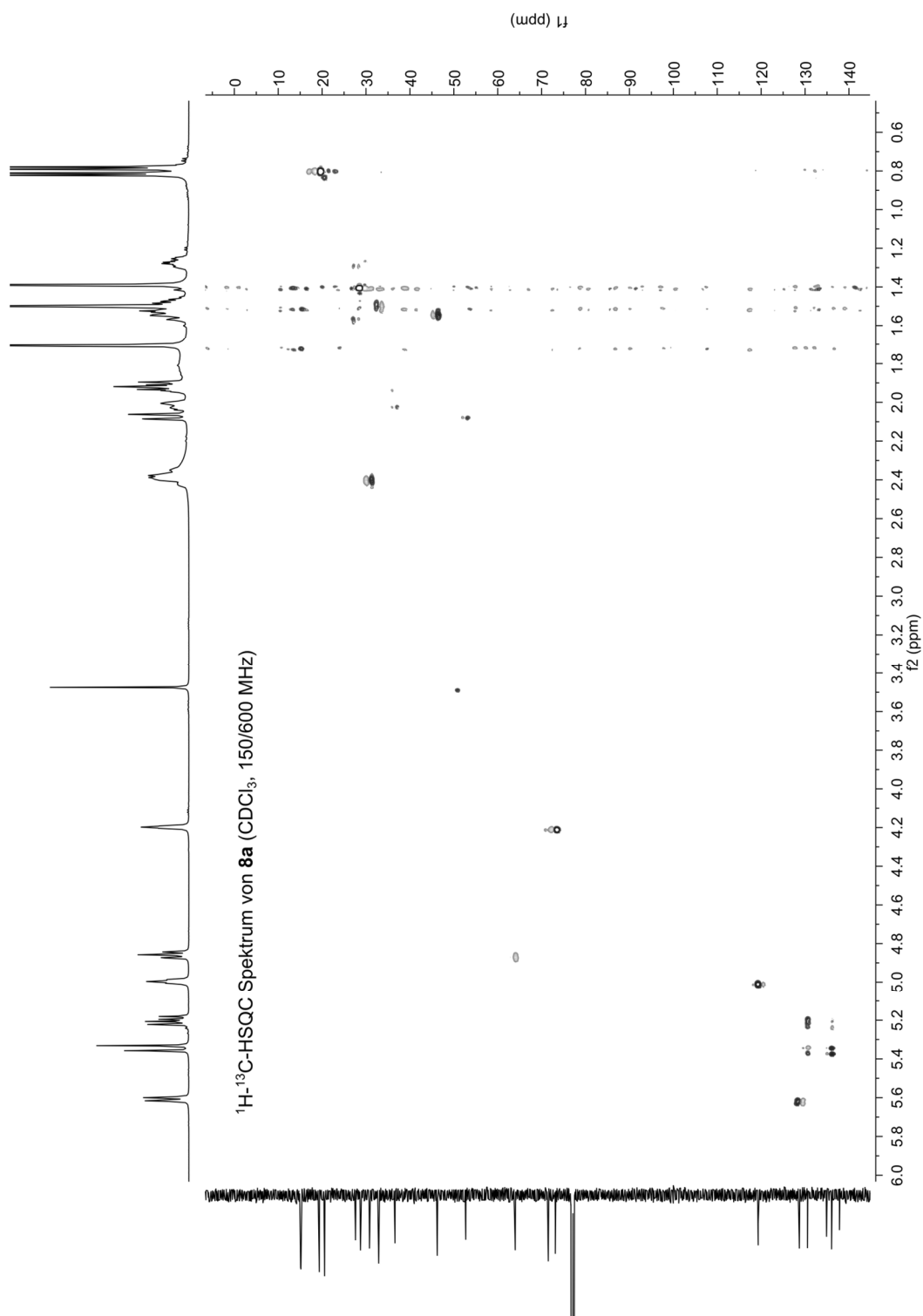
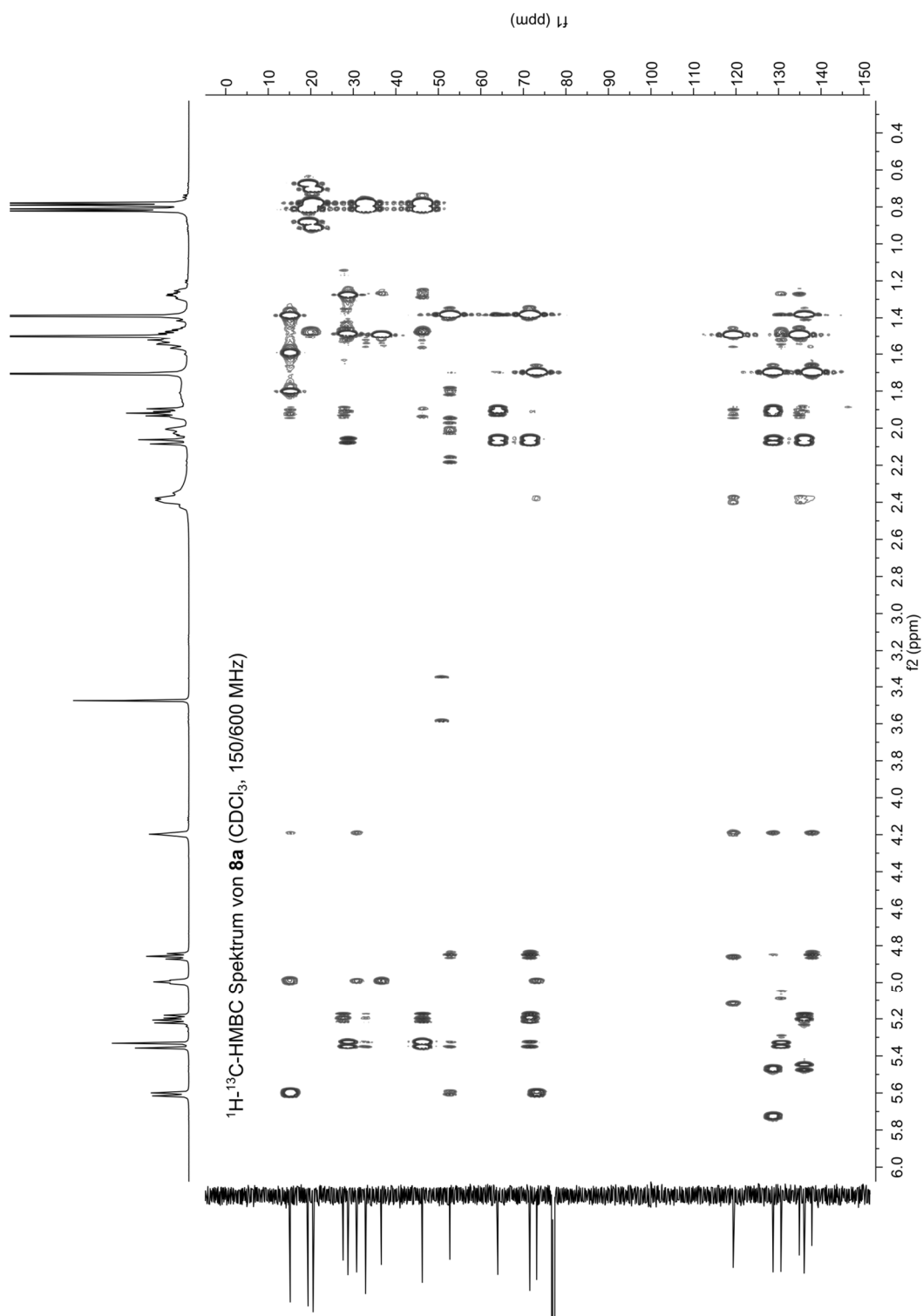
9.5.4 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8a**)

Abbildung 78. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8a**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

Abbildung 79. ¹³C-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8a**) in CDCl₃.

Abbildung 80. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8a**) in CDCl_3 .

Abbildung 81. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8a**) in CDCl_3 .

Abbildung 82. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8a**) in CDCl_3 .

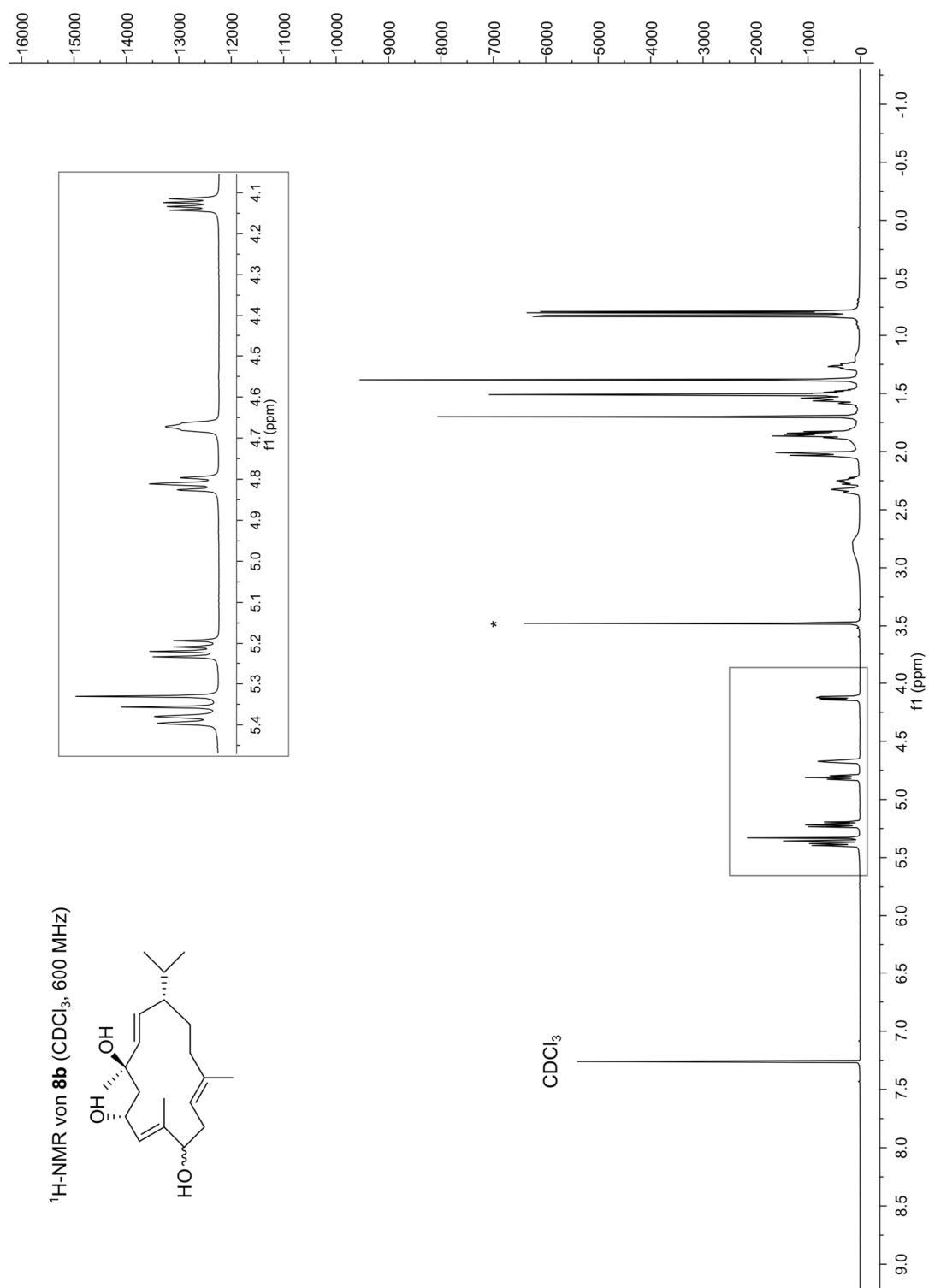
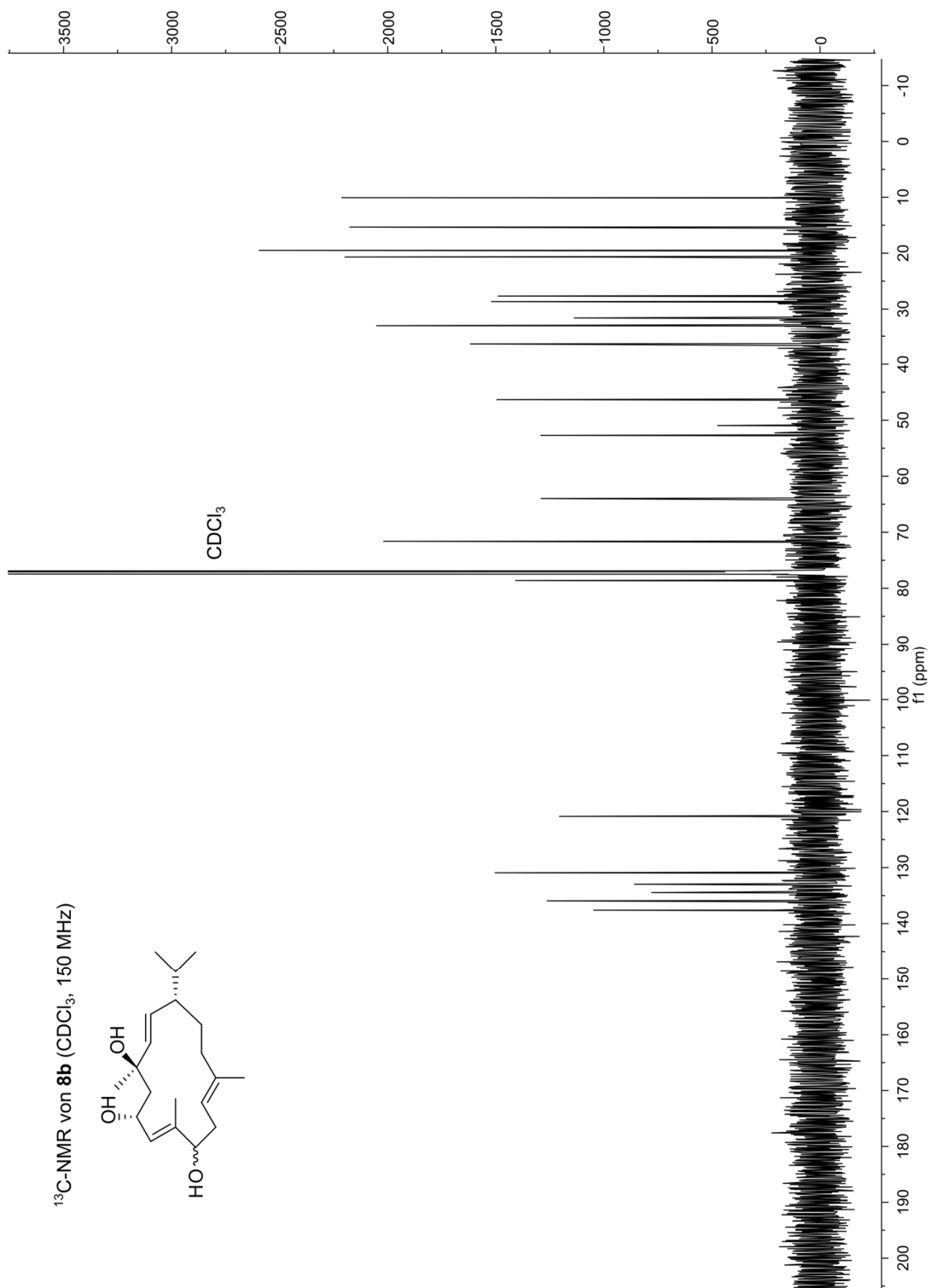
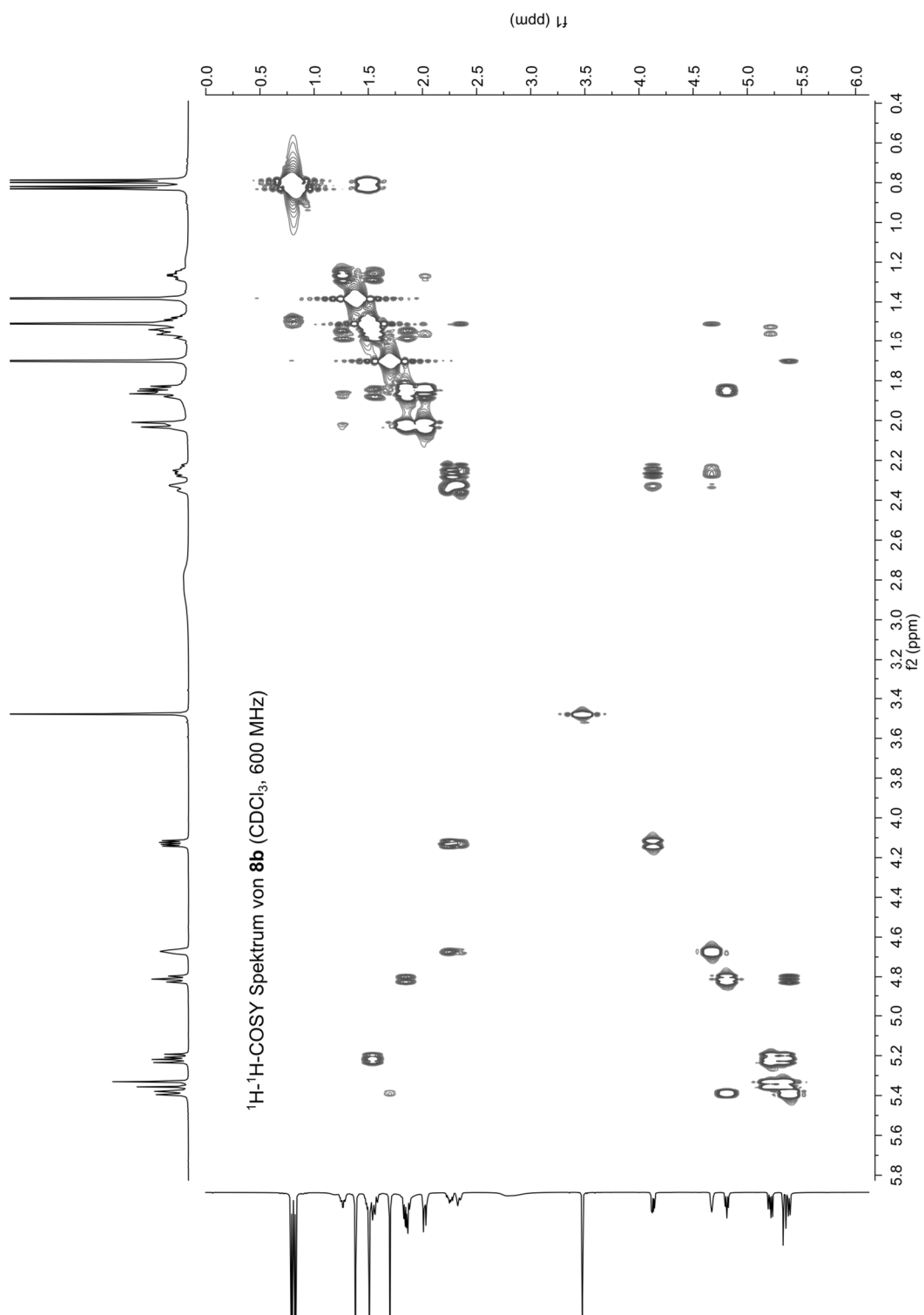
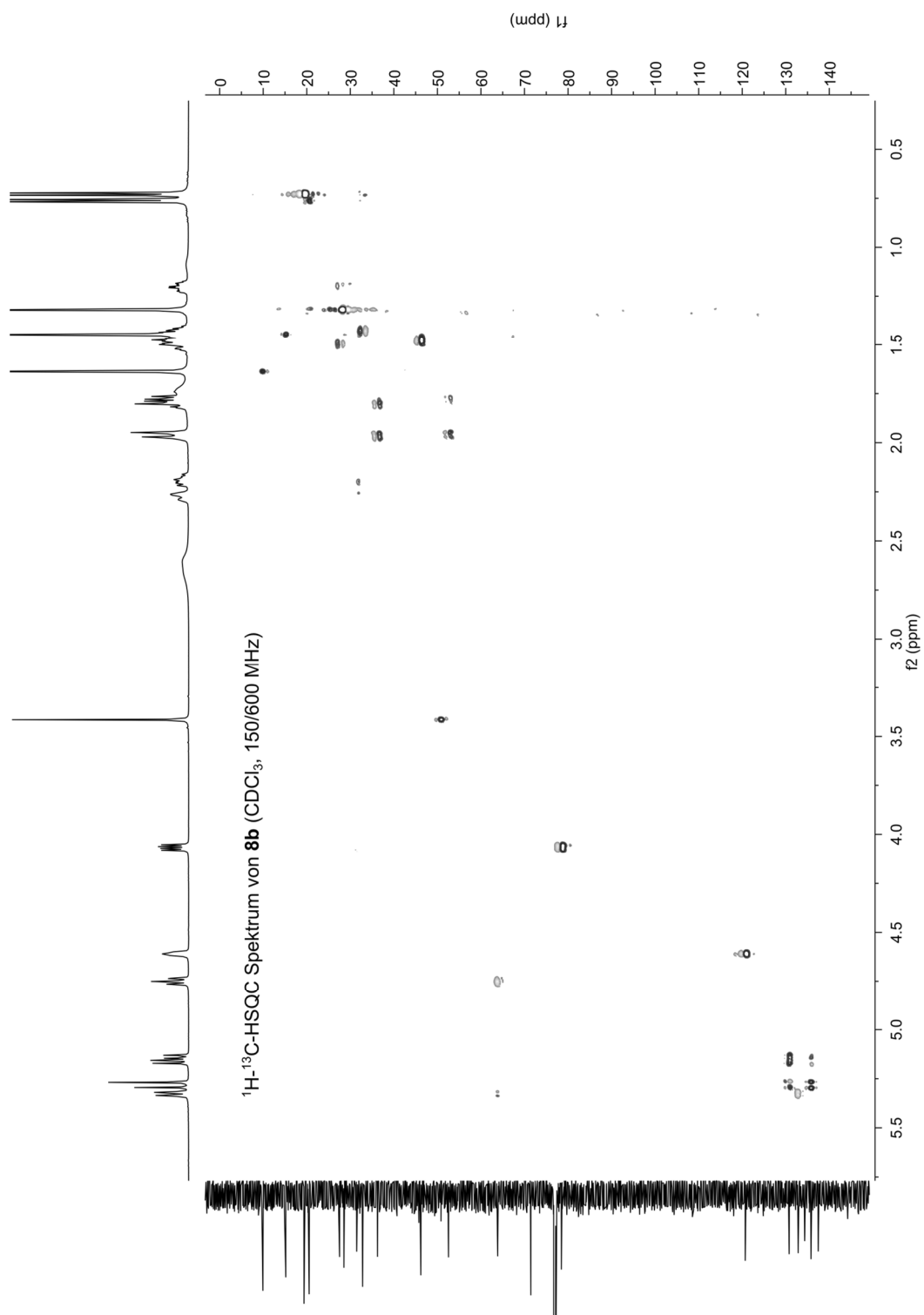
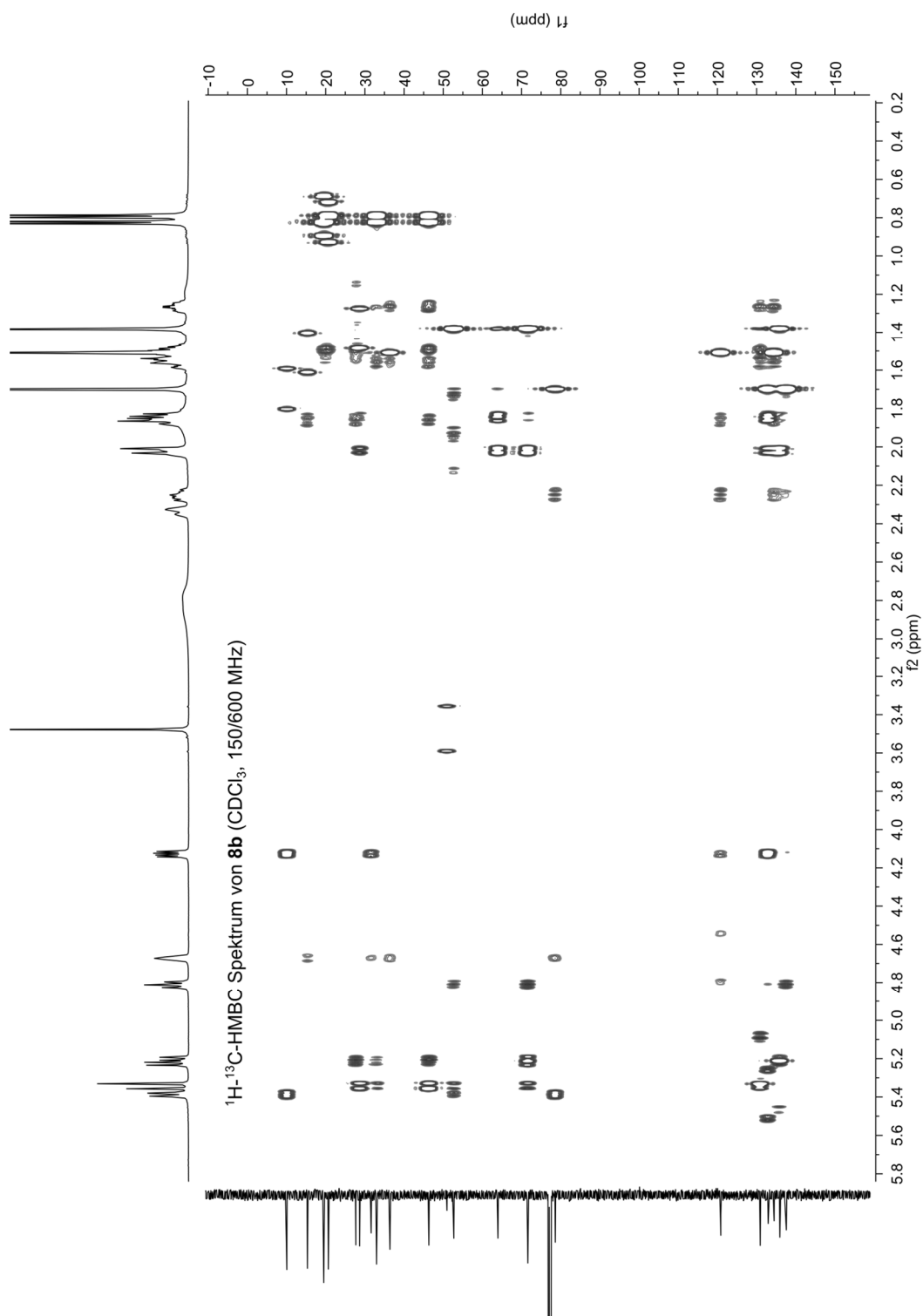
9.5.5 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8b**)

Abbildung 83. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8b**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

Abbildung 84. ¹³C-NMR von (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8b**) in CDCl₃.

Abbildung 85. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8b**) in CDCl_3 .

Abbildung 86. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8b**) in CDCl_3 .

Abbildung 87. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9-triol (**8b**) in CDCl_3 .

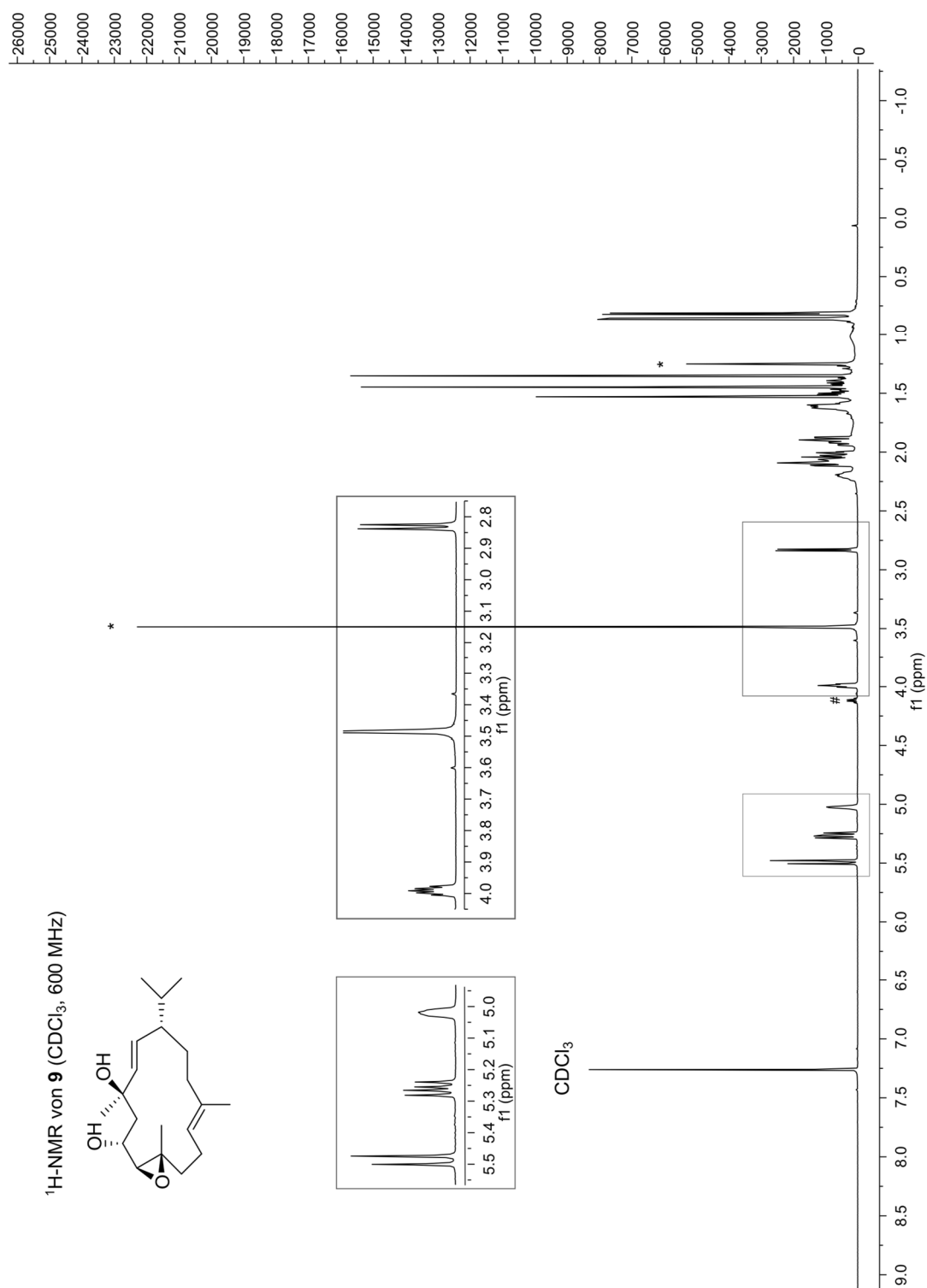
9.5.6 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*S*,8*S*,11*E*)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (9)

Abbildung 88. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*S*,8*S*,11*E*)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (**9**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. #Geringe Verunreinigungen. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

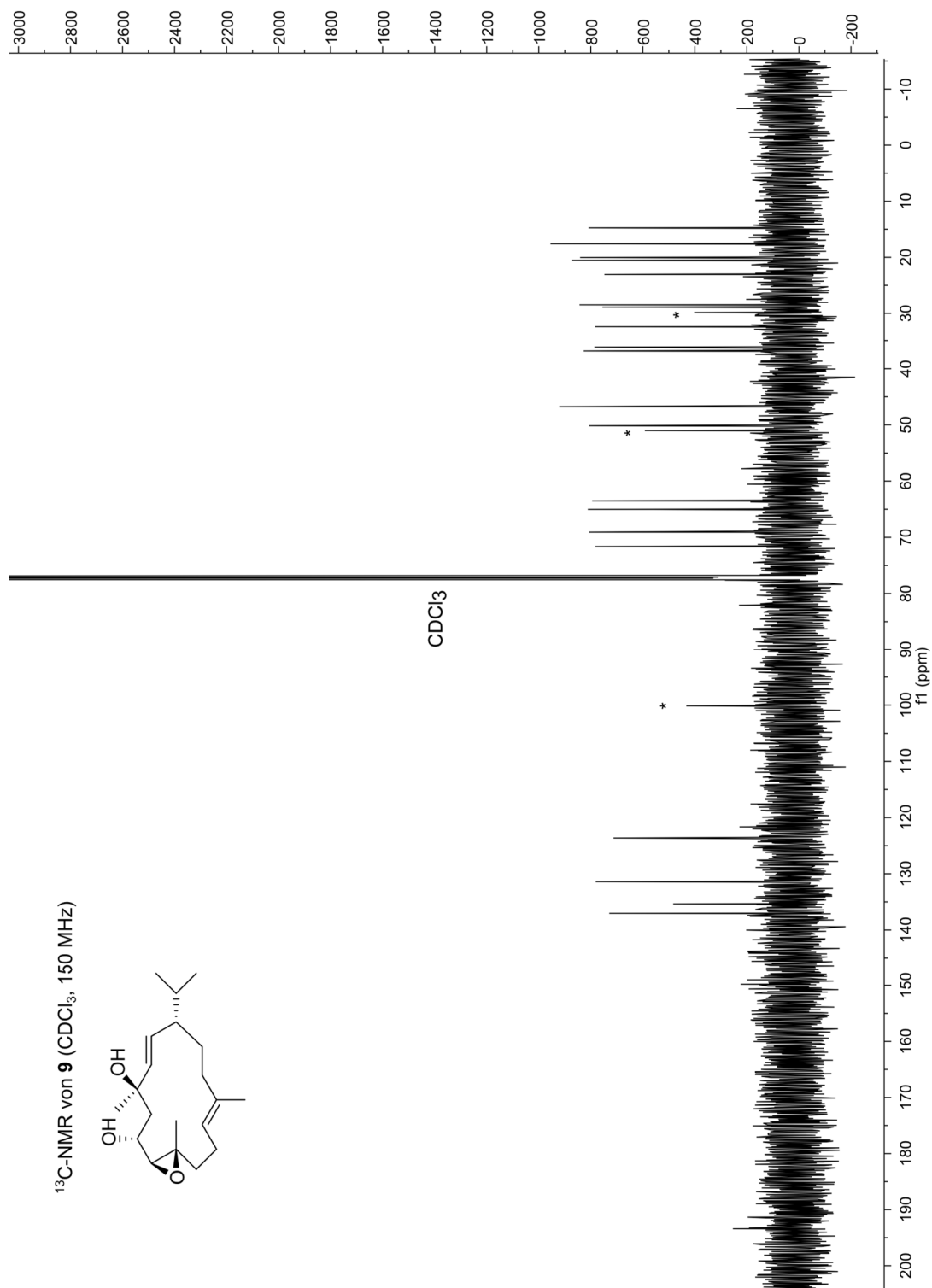
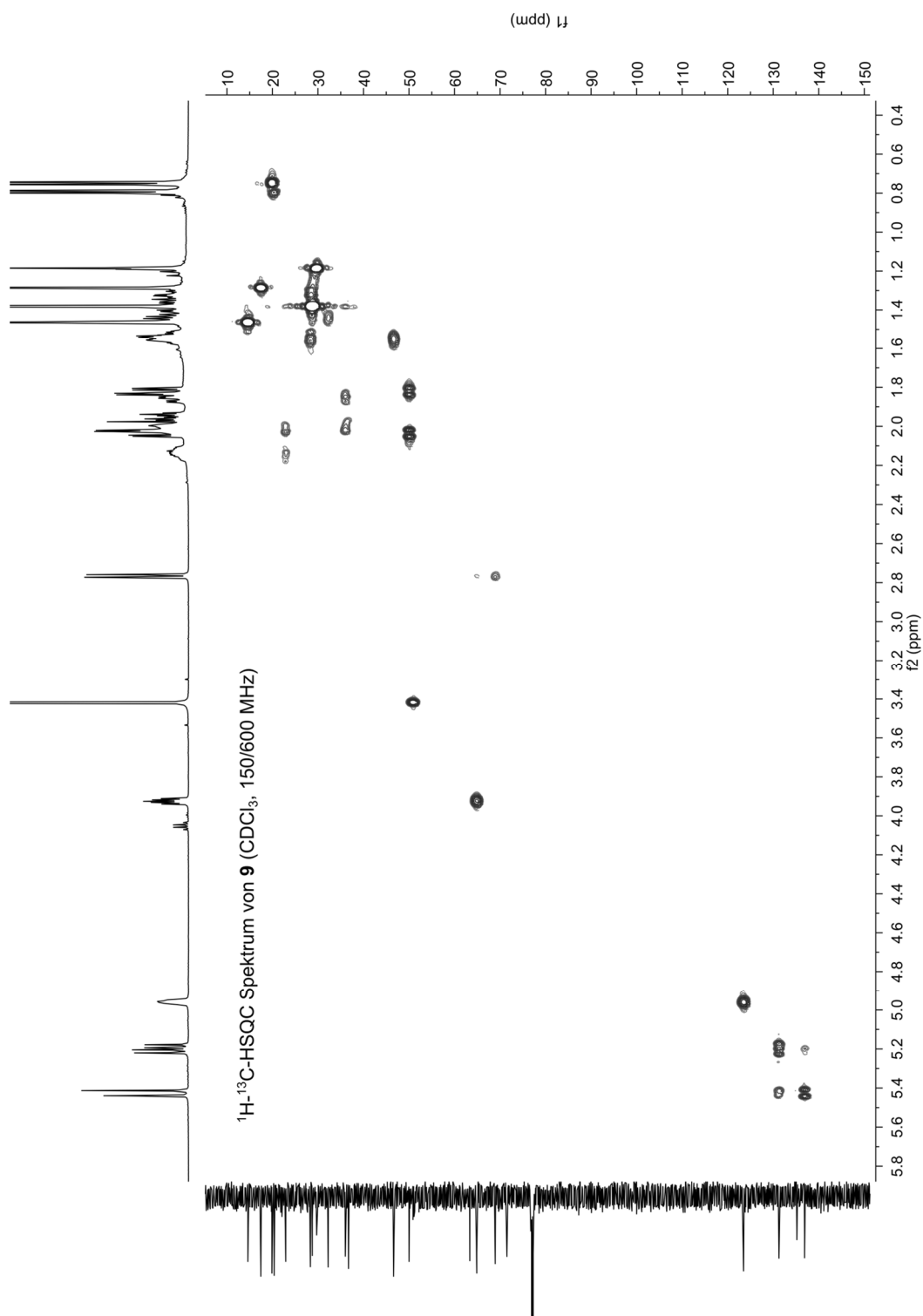


Abbildung 89. ¹³C-NMR von (1S,2E,4R,6R,7S,8S,11E)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (**9**) in CDCl₃.
*Verunreinigung durch Lösungsmittel.

Abbildung 91. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*S*,8*S*,11*E*)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (**9**) in CDCl_3 .

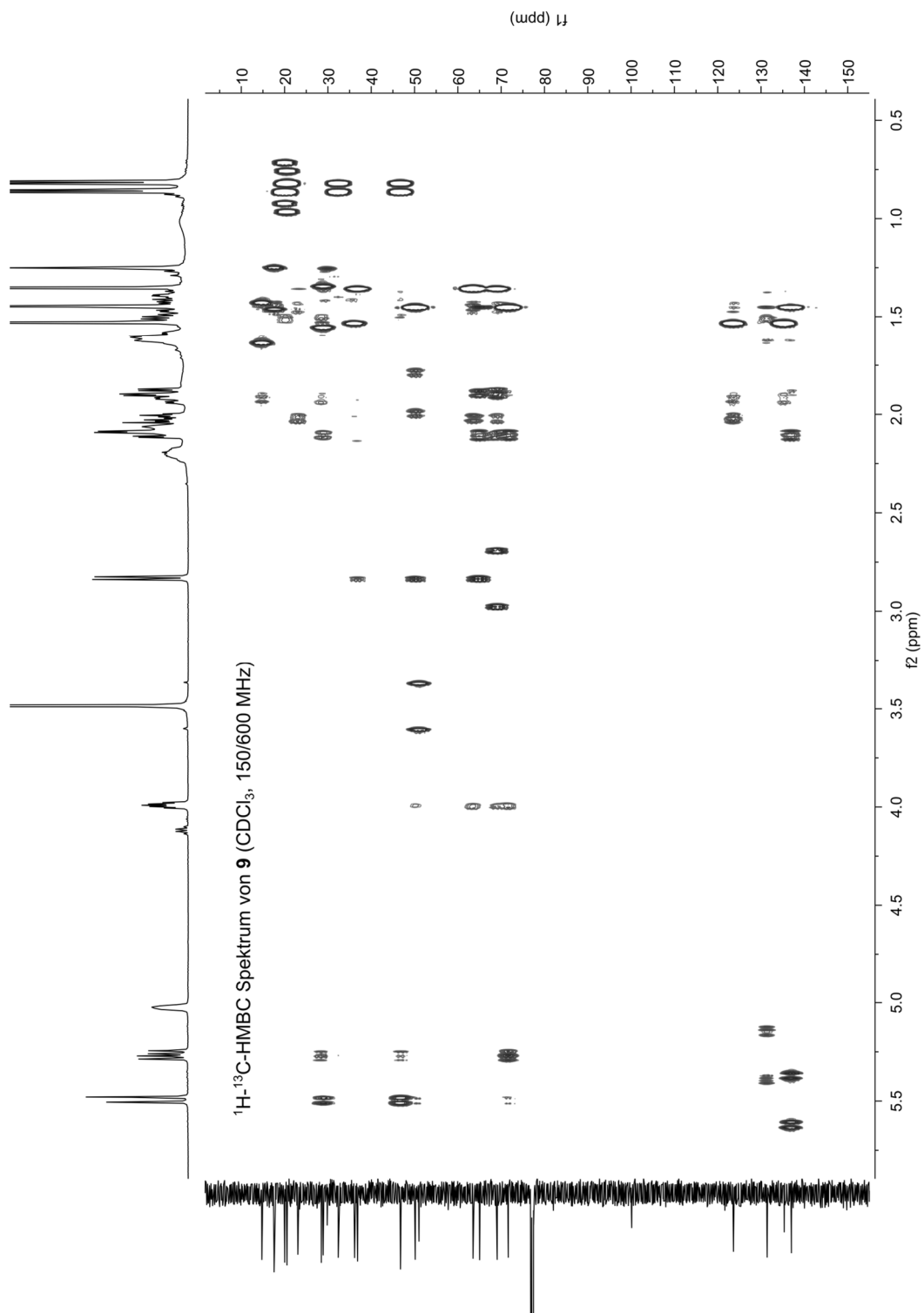


Abbildung 92. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*S*,8*S*,11*E*)-7,8-Epoxy-2,11-cembradien-4,6-diol (**9**) in CDCl_3 .

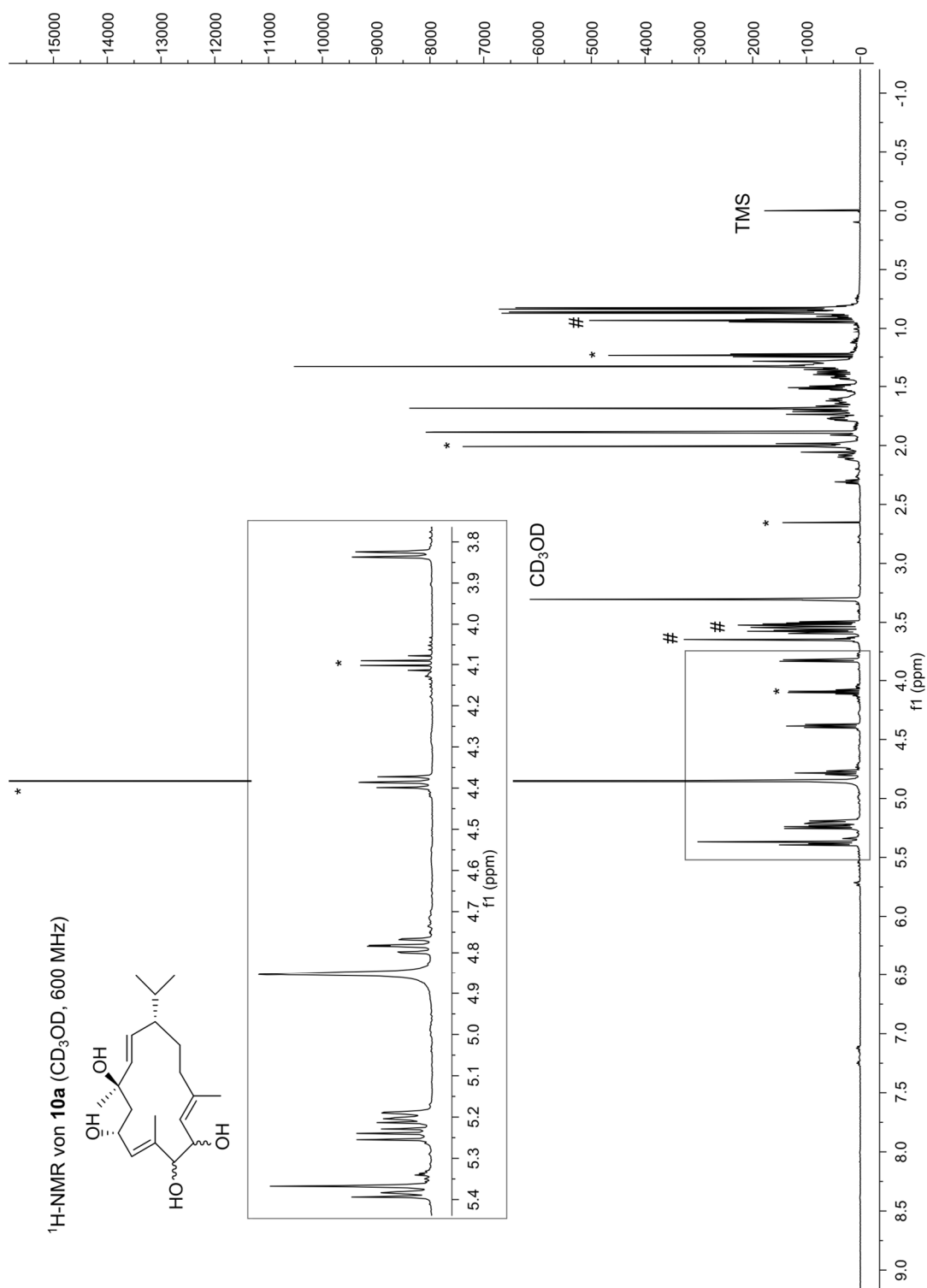
9.5.7 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10a)

Abbildung 93. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10a) in CD₃OD. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. #Verunreinigungen. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

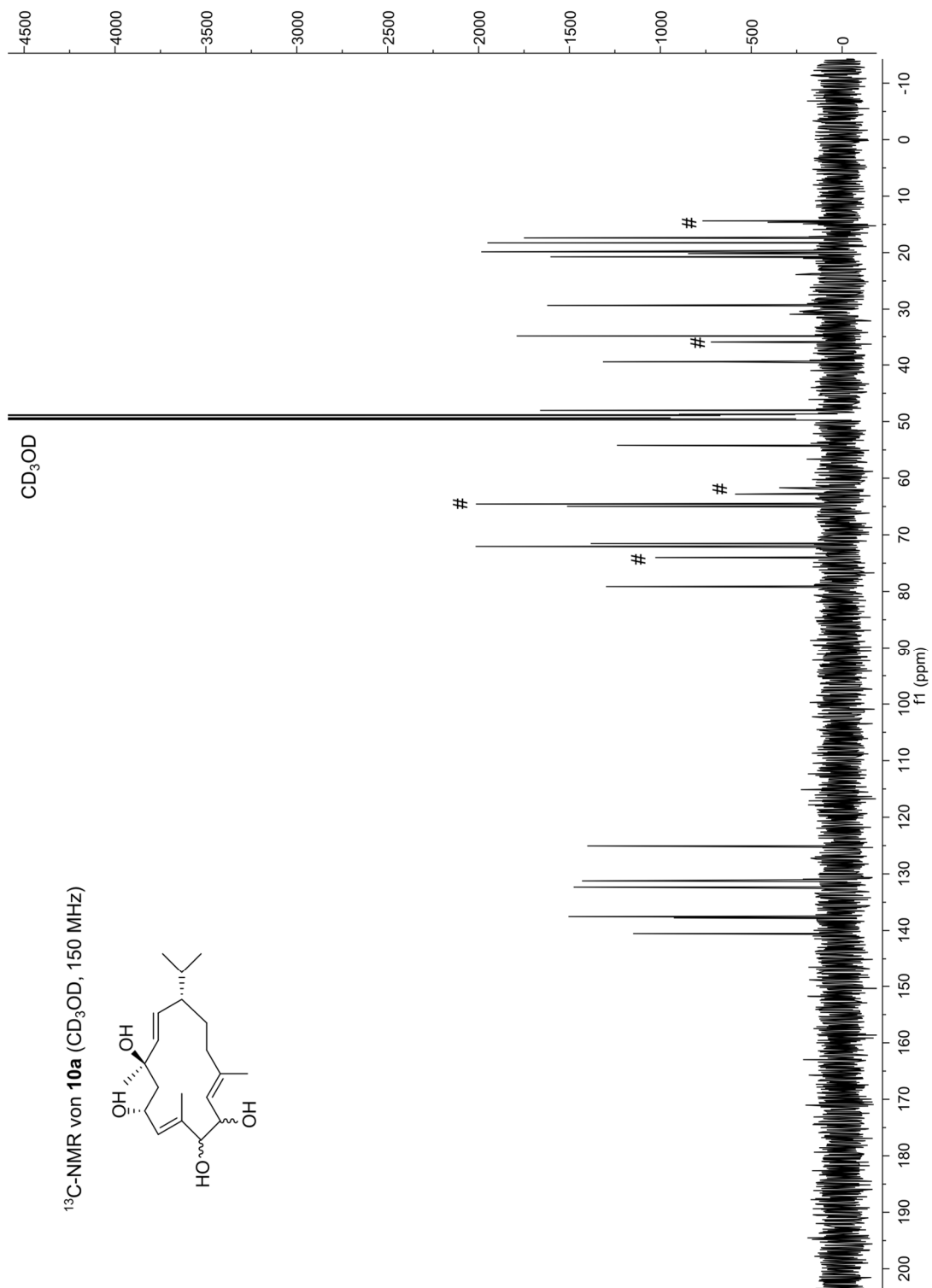


Abbildung 94. ¹³C-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10a**) in CD₃OD. #Verunreinigungen.

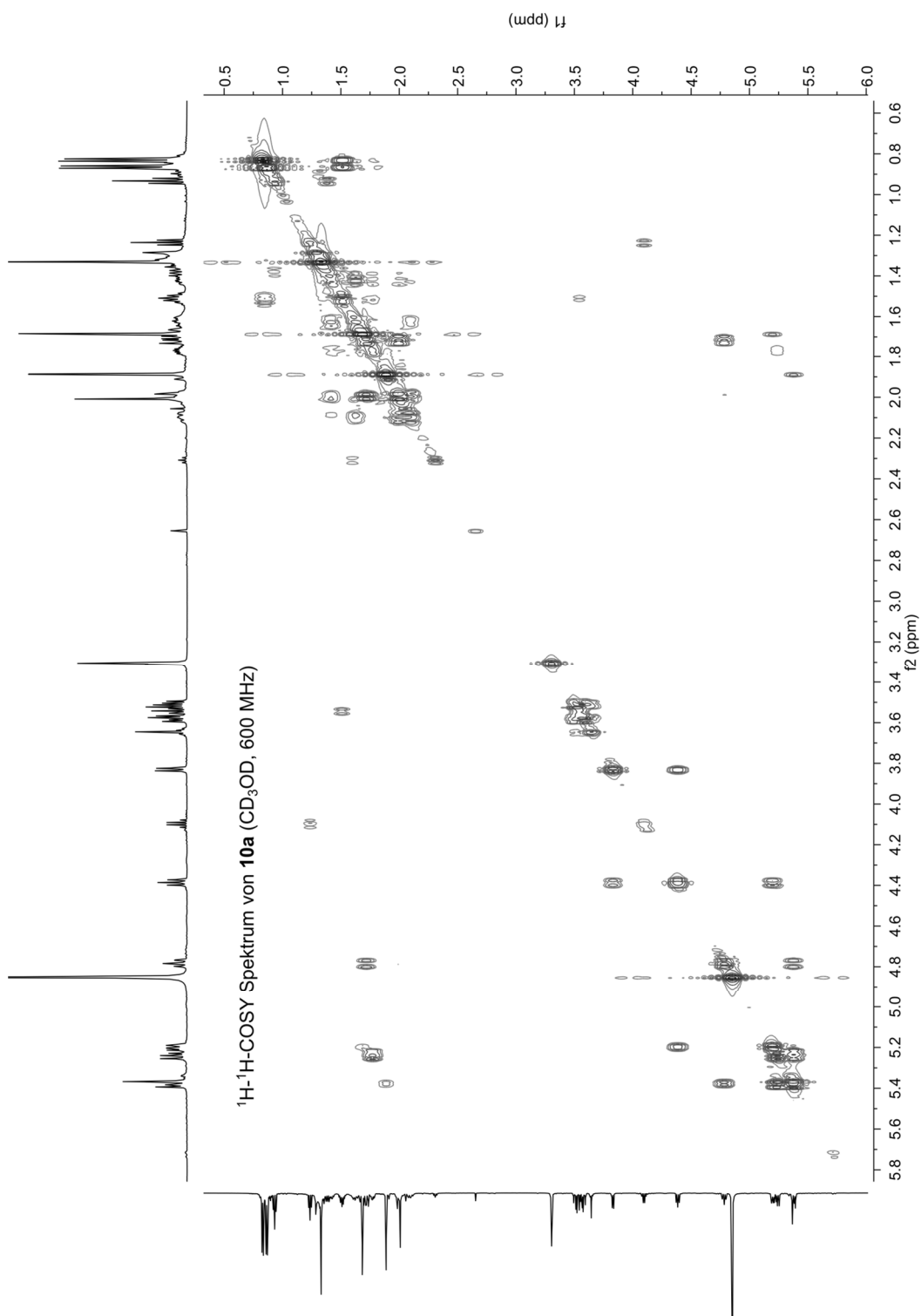


Abbildung 95. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10a**) in CD_3OD .

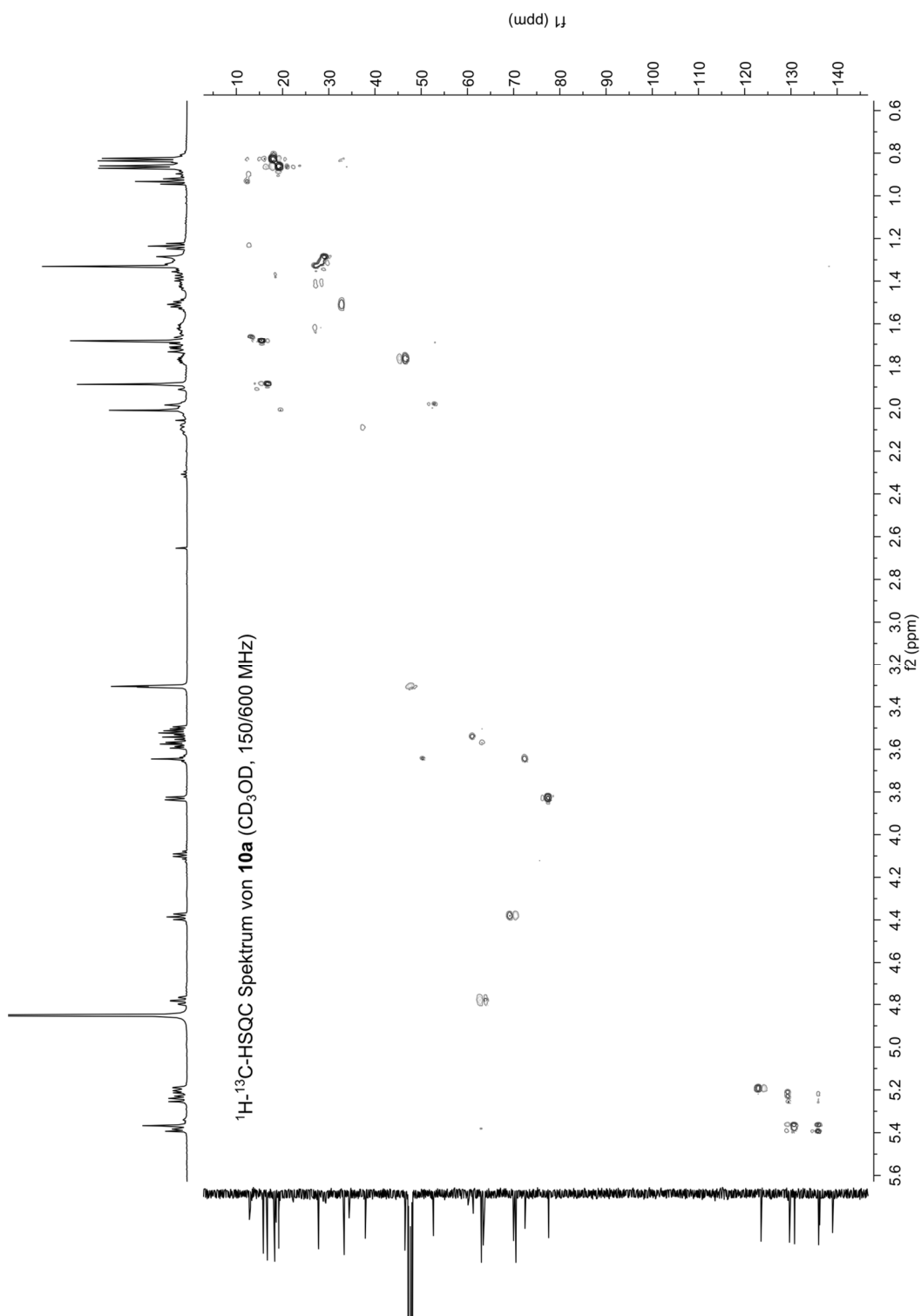


Abbildung 96. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10a**) in CD_3OD .

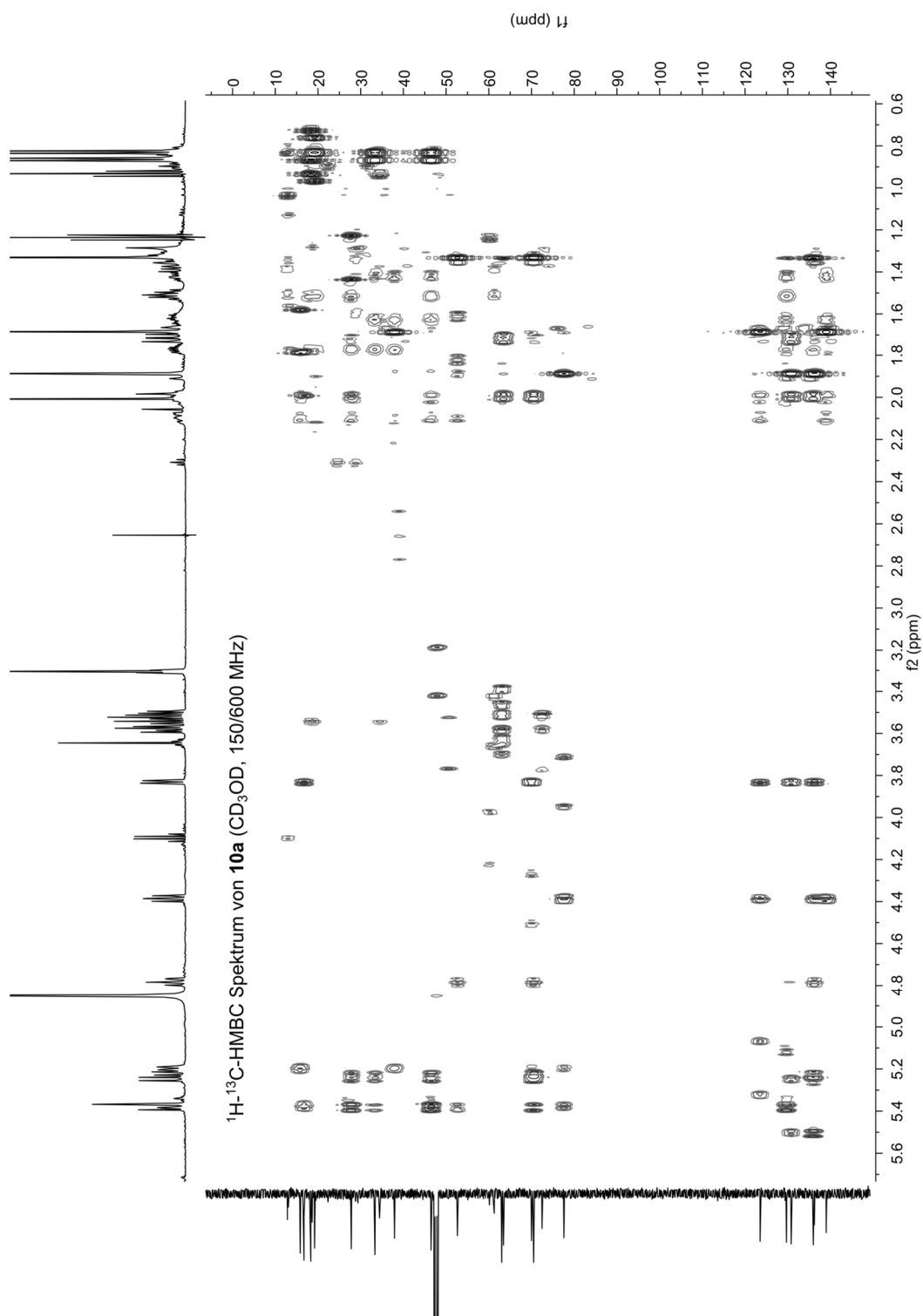


Abbildung 97. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10a**) in CD_3OD .

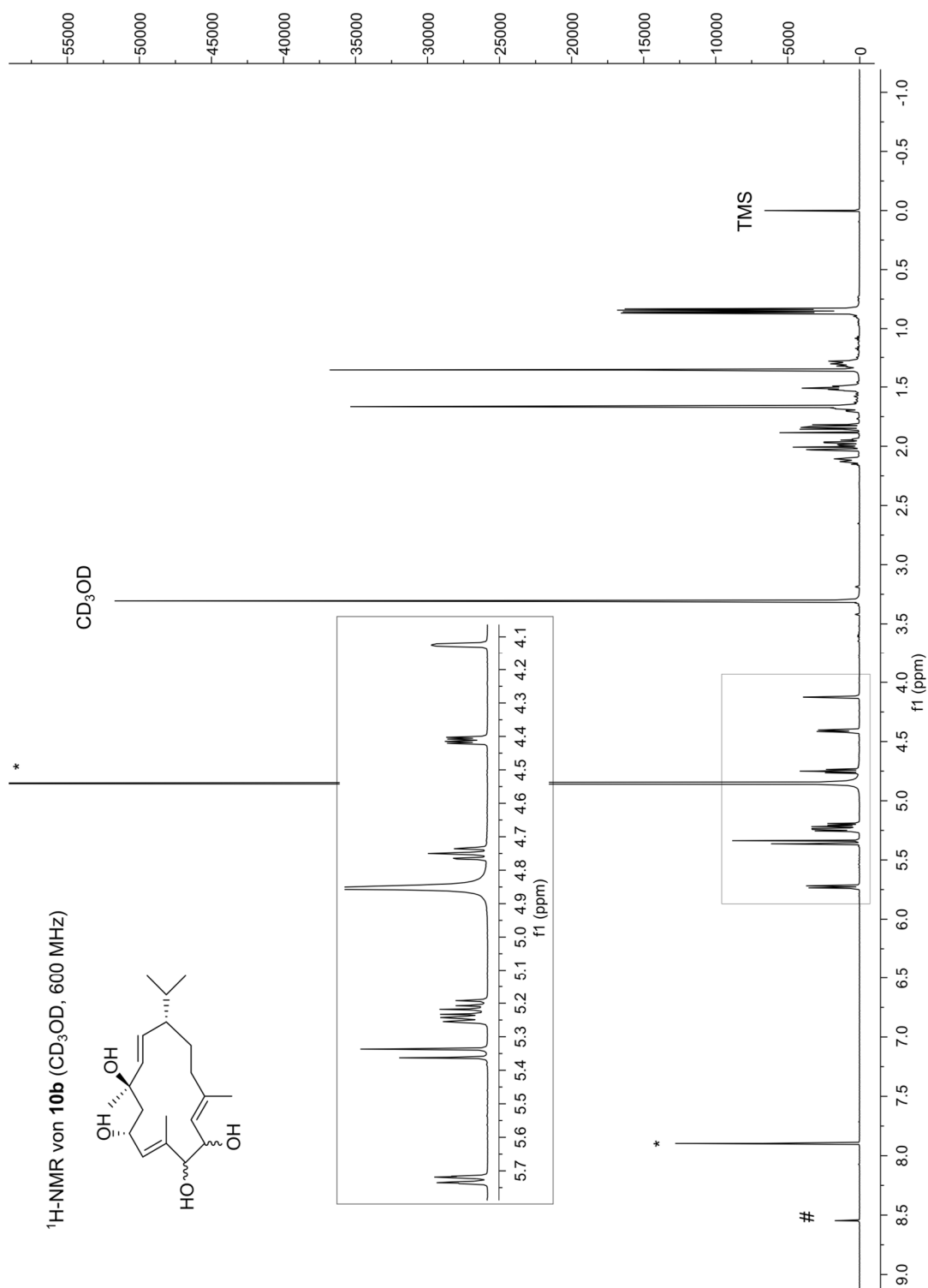
9.5.8 (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (10b)

Abbildung 98. ¹H-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10b**) in CD₃OD. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. #Verunreinigungen. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

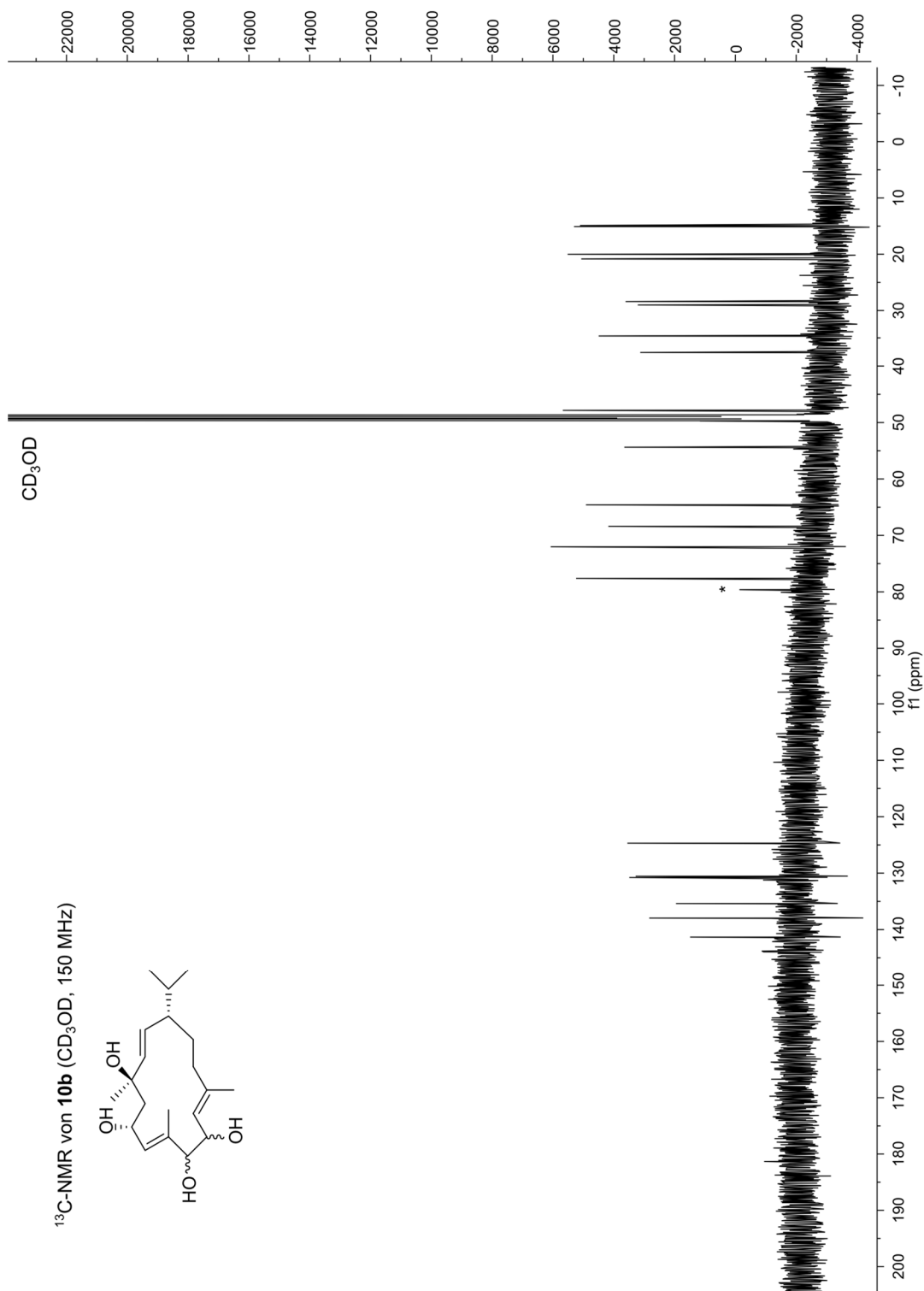


Abbildung 99. ¹³C-NMR von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10b**) in CD₃OD.
*Verunreinigung durch Lösungsmittel.

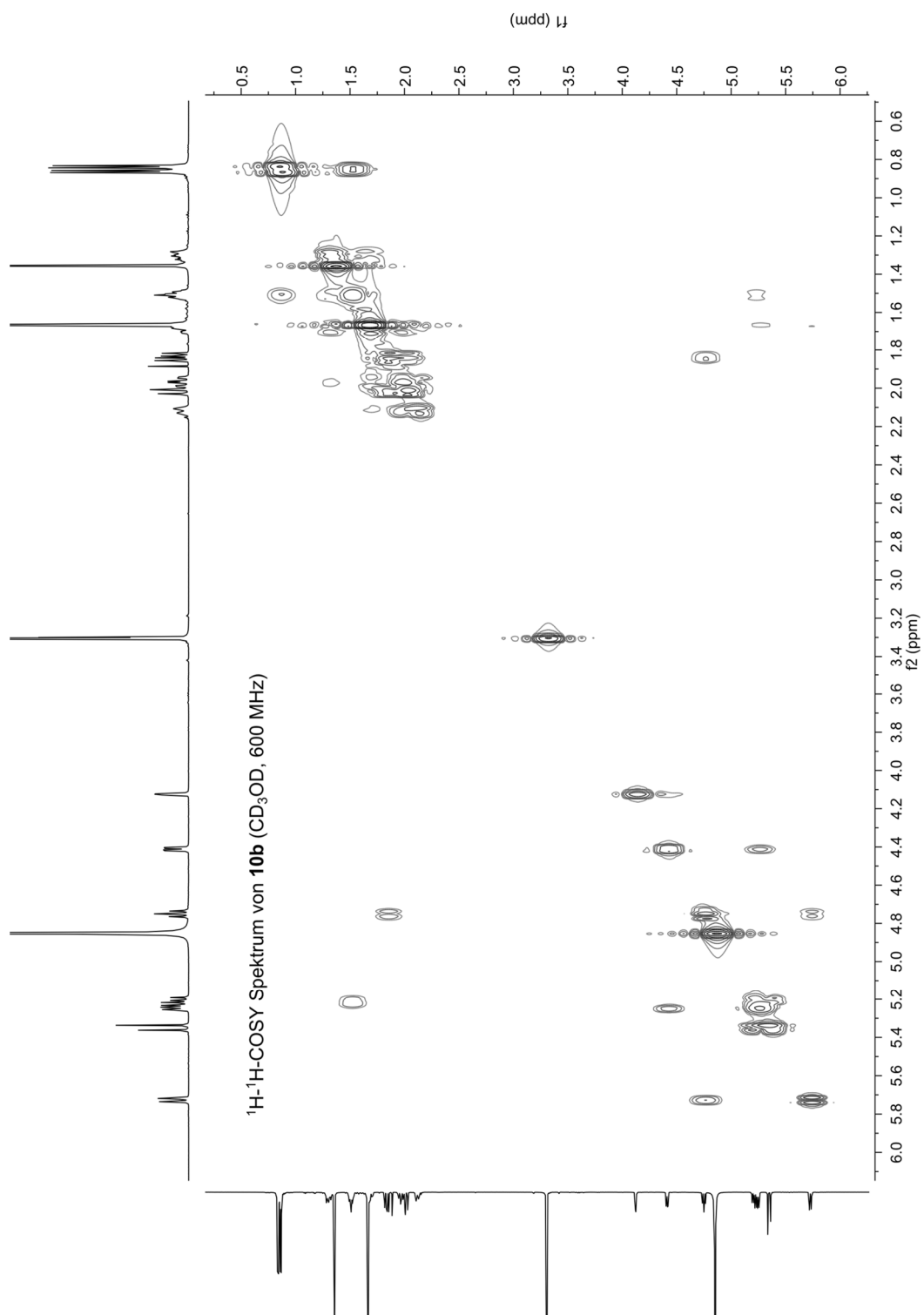


Abbildung 100. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10b**) in CD_3OD .

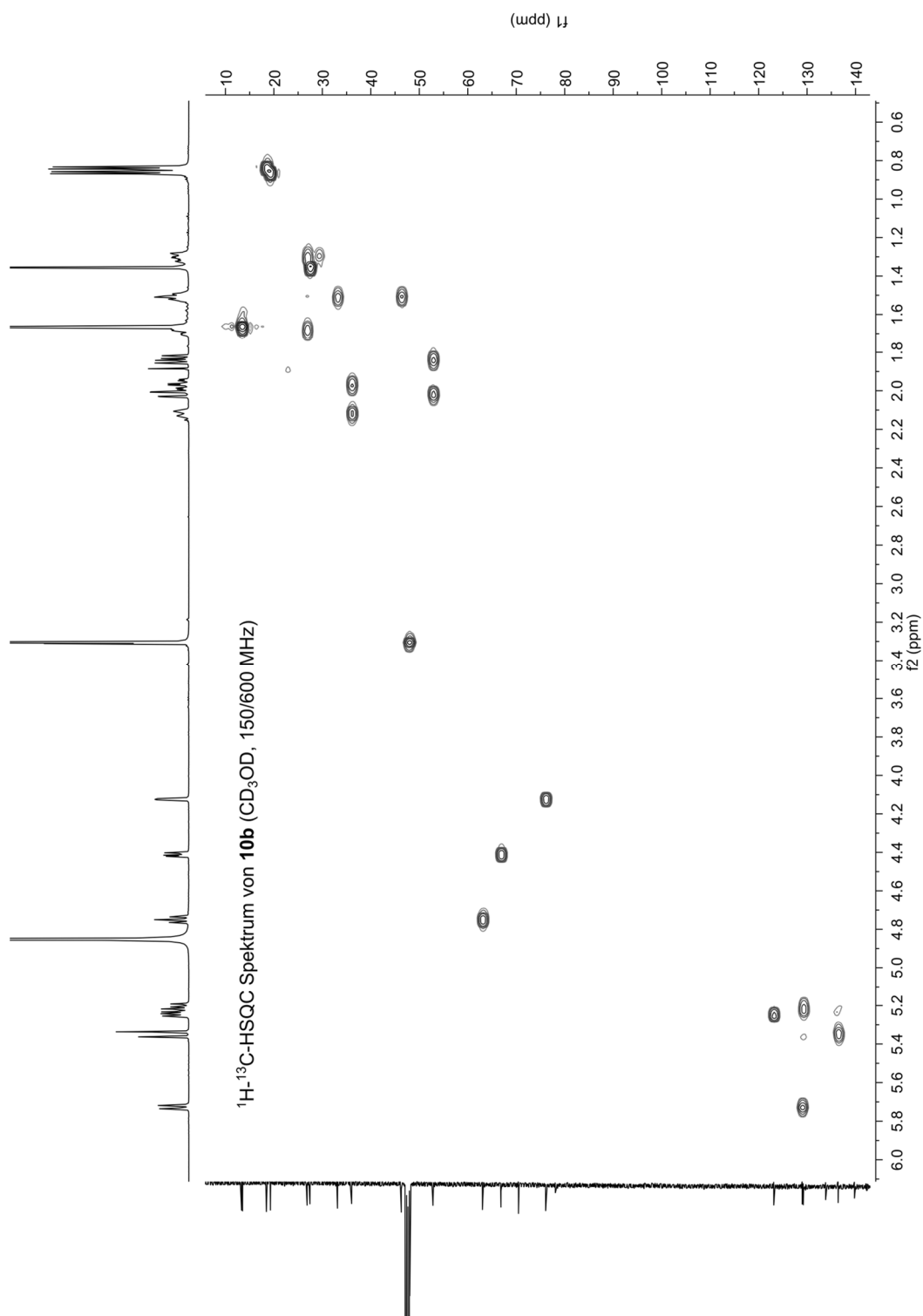


Abbildung 101. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10b**) in CD_3OD .

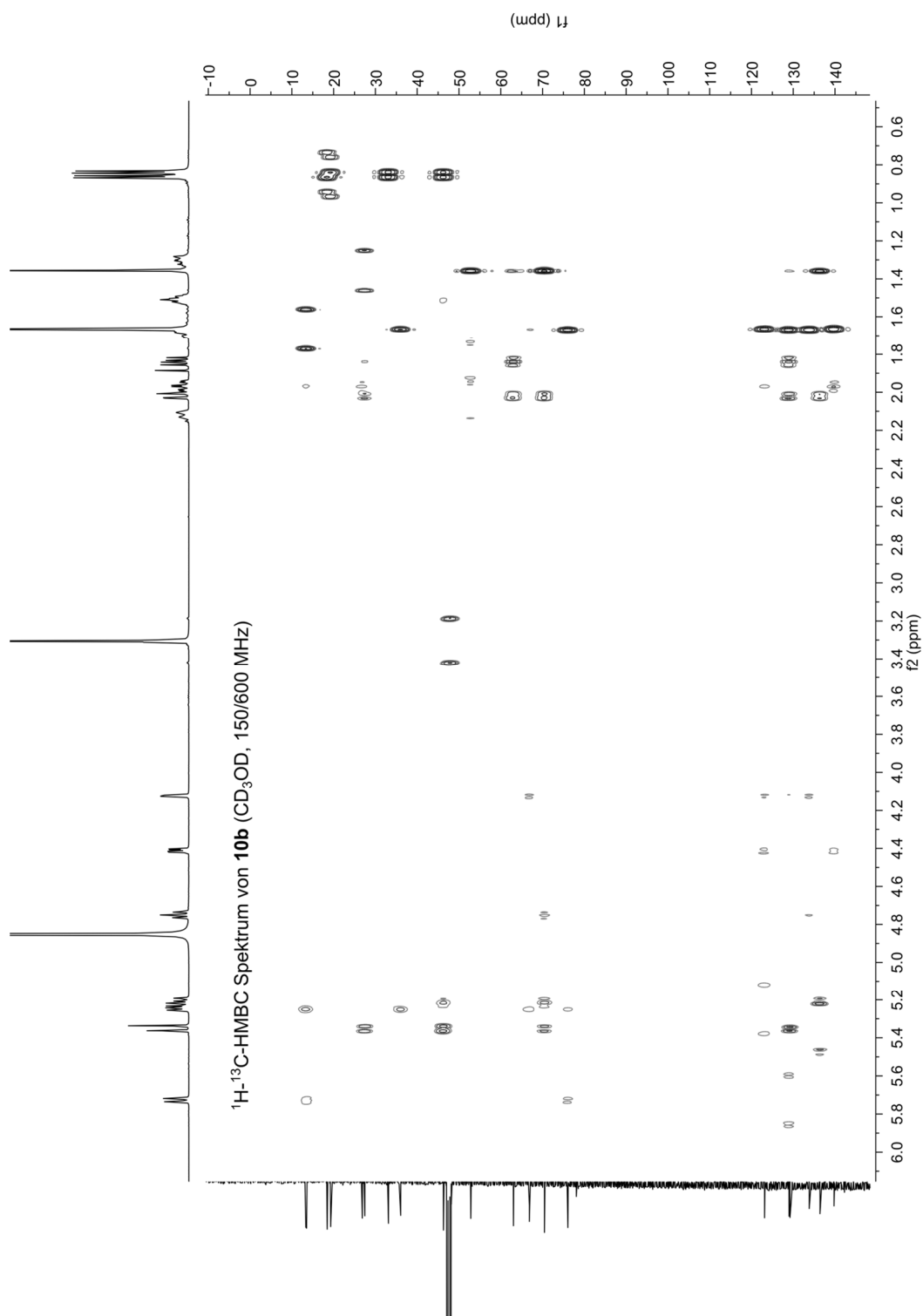


Abbildung 102. ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum von (1*S*,2*E*,4*R*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratrien-4,6,9,10-tetraol (**10b**) in CD_3OD .

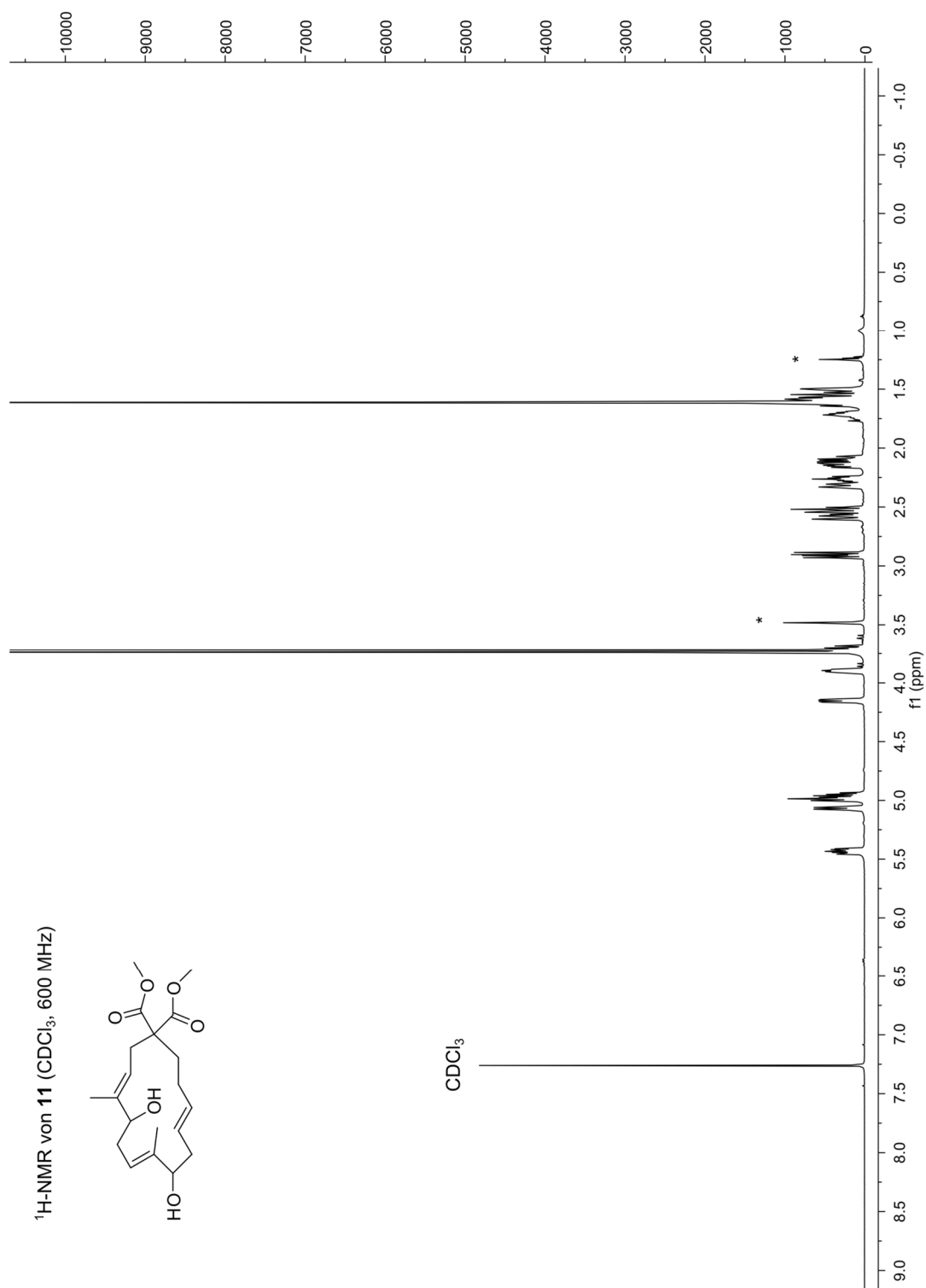
9.5.9 (3E,7E,11E)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (11)

Abbildung 103. ¹H-NMR von (3E,7E,11E)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (**11**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel. Vergrößerungen der Tieffeldsignale sind im grauen Kasten gezeigt.

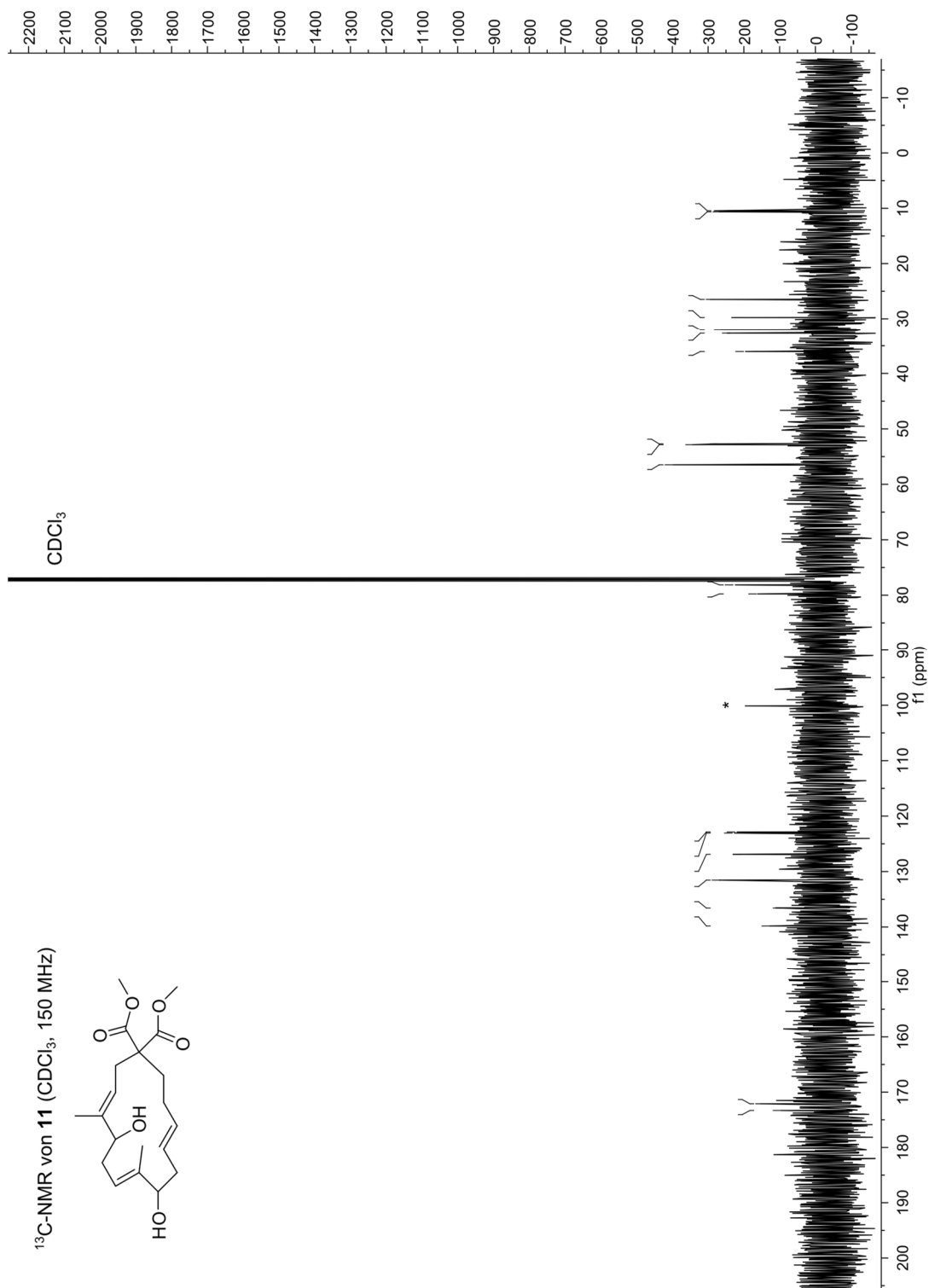


Abbildung 104. ¹³C-NMR von (3*E*,7*E*,11*E*)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethan-säuredimethylester (**11**) in CDCl₃. *Verunreinigung durch Lösungsmittel.

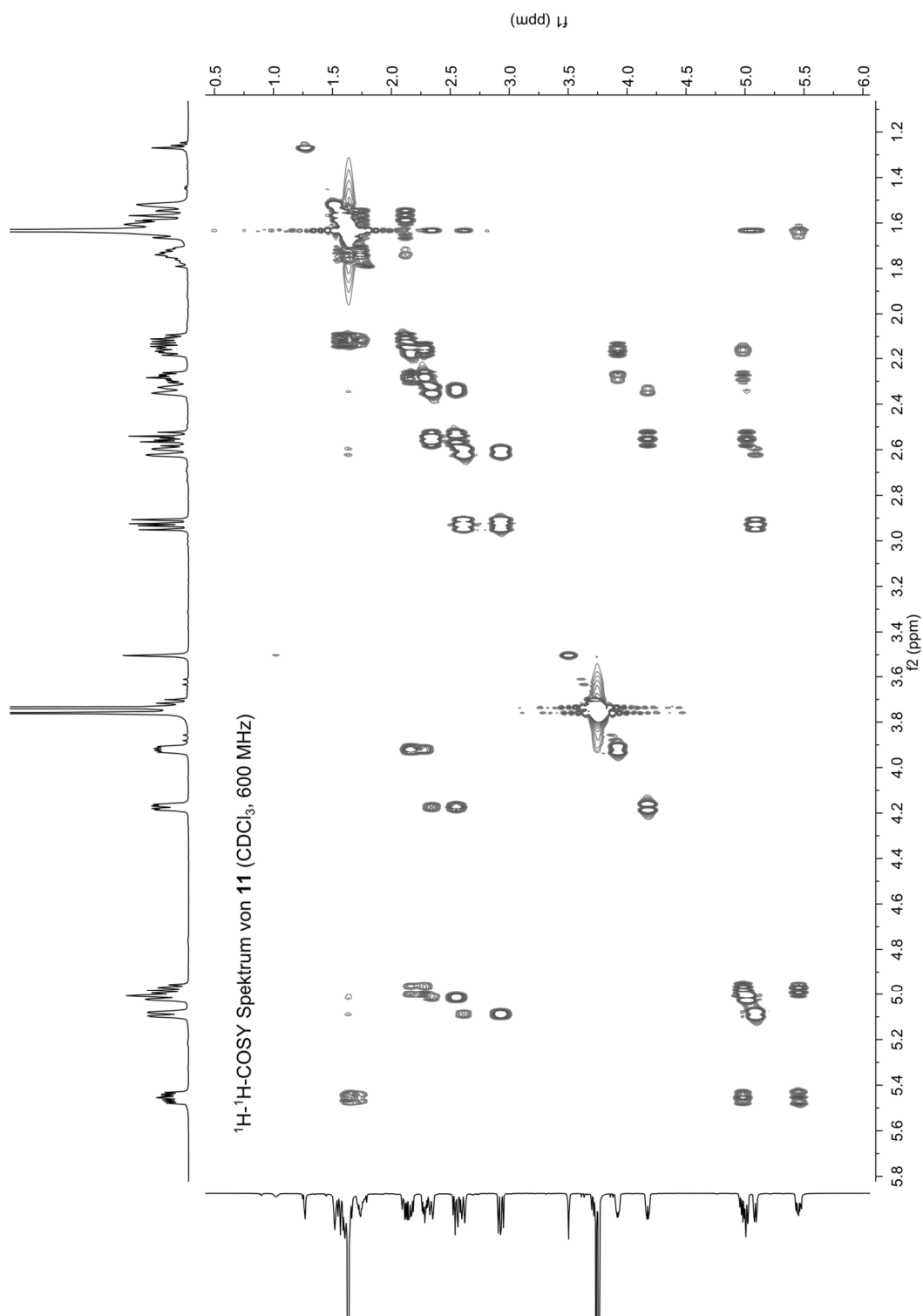


Abbildung 105. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von (3*E*,7*E*,11*E*)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (**11**) in CDCl_3 .

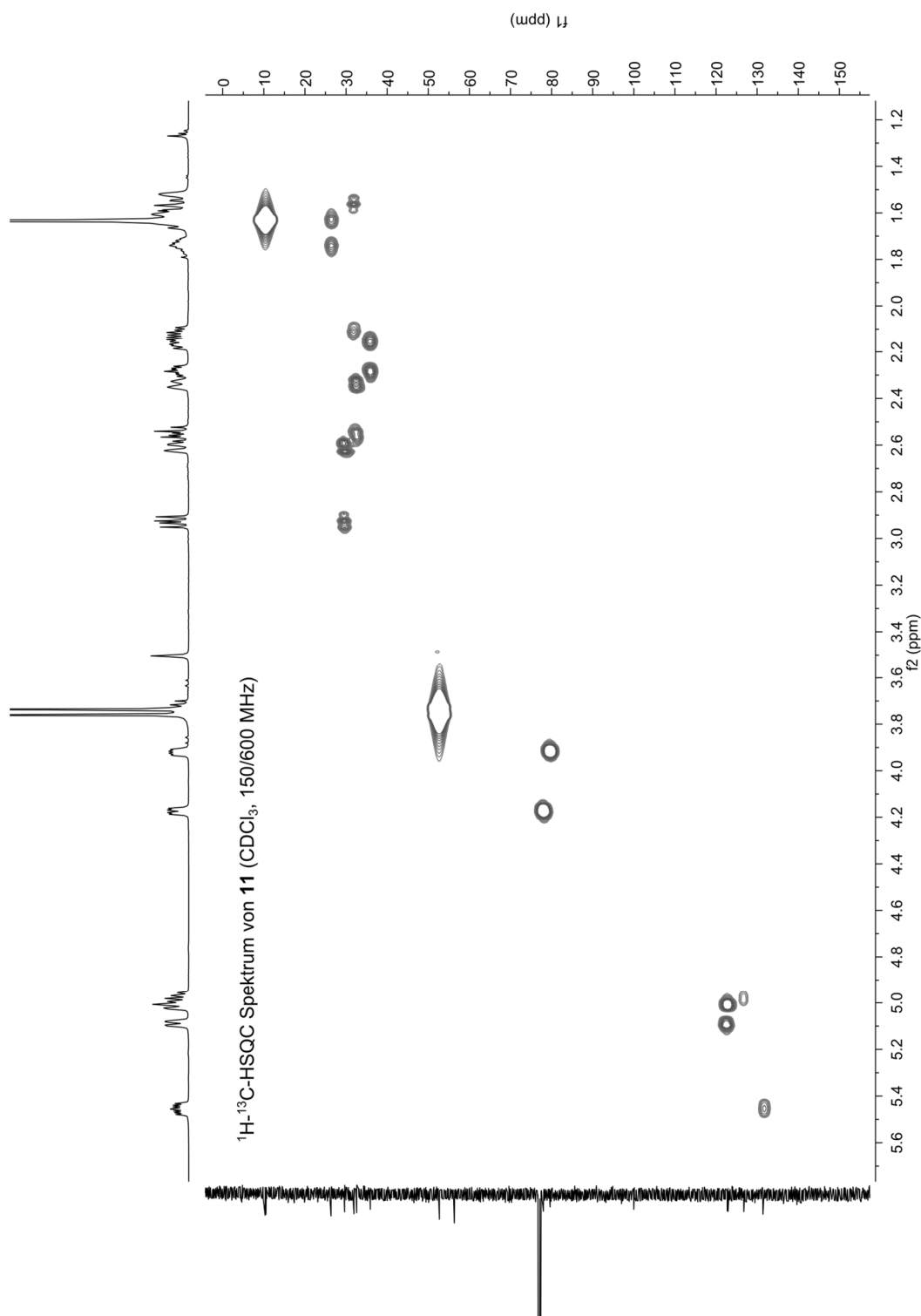


Abbildung 106. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von $(3E,7E,11E)$ -5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (**11**) in CDCl_3 .

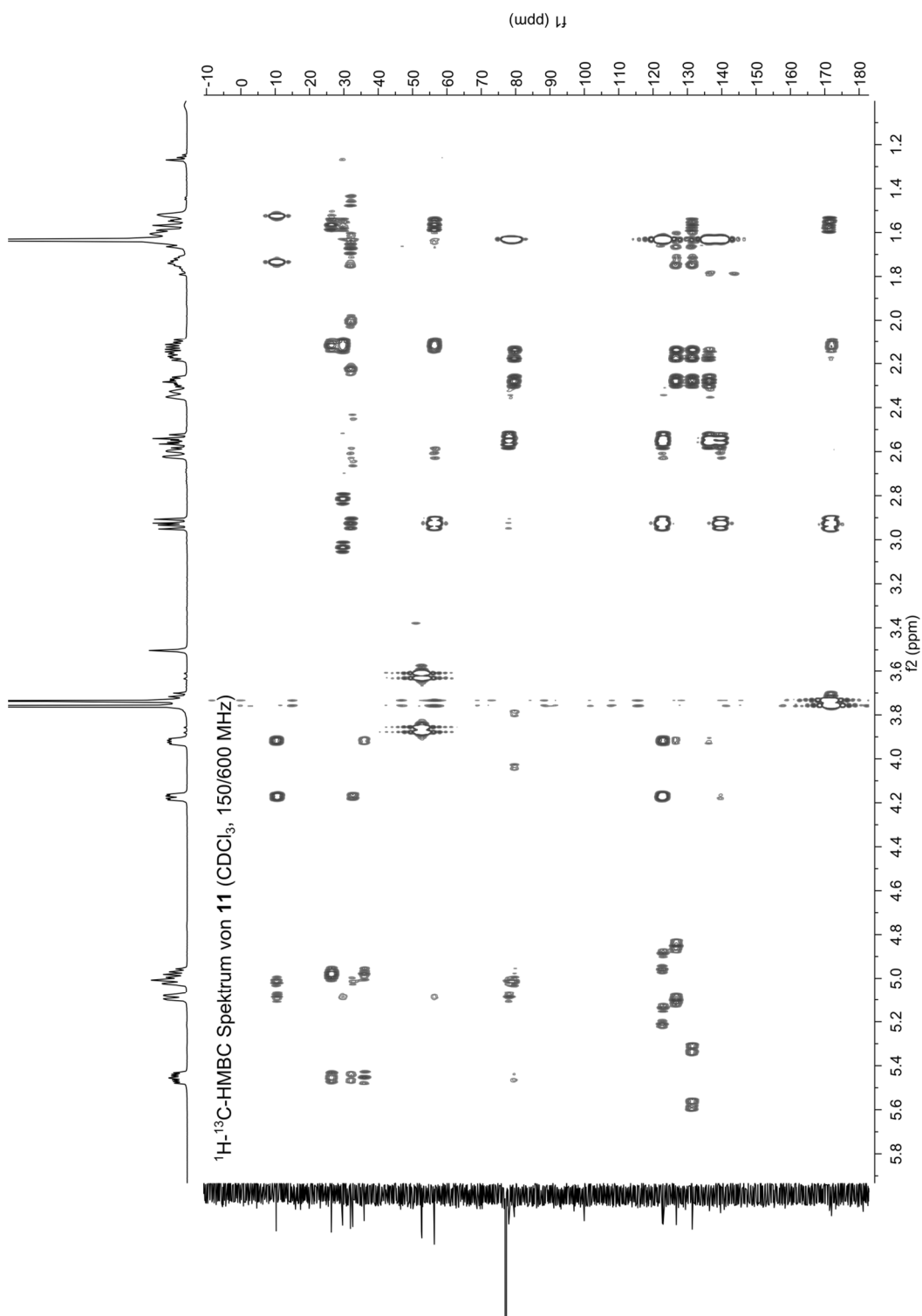


Abbildung 107. ¹H-¹³C-HMBC-Spektrum von (3*E*,7*E*,11*E*)-5,9-Dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-3,7,11-trien-1,1-dimethansäuredimethylester (**11**) in CDCl₃.