

Schnelle chemische Charakterisierung bakterieller Terpen-Synthasen**

Patrick Rabe und Jeroen S. Dickschat*

Terpene bilden mit über 50000 bekannten Verbindungen die größte Gruppe von Naturstoffen. Ihre Gerüste werden von Terpen-Synthasen erstellt, die lineare Vorstufen [Geranyl-diphosphat (GPP), Farnesyl-diphosphat (FPP) oder Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP)] in (poly)cyclische Mono-, Sesqui- oder Diterpene konvertieren.^[1] Dieser Prozess wird mit einer Kationenbildung durch Diphosphat-Abstraktion (Enzyme der Klasse I) oder Protonierung einer olefinischen Doppelbindung (Klasse II) initiiert. Sukzessive intramolekulare Angriffe olefinischer Doppelbindungen an kationischen Zentren, Hydrid- oder Protonenwanderungen, Wagner-Meerwein-Umlagerungen sowie terminierende Deprotonierung oder Angriff eines Nucleophils ergeben das Terpenprodukt. In einigen Fällen wird das initiale Produkt für eine zweite Prozessierung reionisiert.^[2]

Die aktiven Zentren von Enzymen der Klasse I weisen ein hochkonserviertes, Aspartat-reiches Motiv (DDXXD) und eine (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXE-Konsensussequenz (NSE/DTE-Triade) auf, die den Cofaktor Mg^{2+} binden, der das Diphosphat zum Zweck der Ionisierung komplexiert.^[3,4] Enzyme der Klasse II teilen ein hochkonserviertes DXDD-Motiv für die Protonierung des Substrates.^[5,6] In beiden Enzymtypen bilden hydrophobe Residuen eine Tasche, in der die Oligoprenylkette in einer die Produktstruktur festlegenden Konformation arrangiert ist.^[4] Diese Tasche verhindert auch den ungerichteten Angriff von Wasser an kationische Intermediate. Aromatische Reste stabilisieren geladene Intermediate durch Kation- π -Wechselwirkungen.^[7,8]

Obwohl diese Prinzipien der Terpen-Biochemie gut verstanden sind und sogar einige Kristallstrukturen bakterieller Terpen-Cyclasen bekannt sind,^[9–11] ist es unmöglich, aus der Aminosäuresequenz einer Synthase die Struktur des von ihr gebildeten Terpens vorherzusagen. Daraus ergibt sich ein Dilemma, da die modernen Sequenzieretechniken und bioinformatischen Methoden eine Fülle an Informationen verfügbar machen, aus denen ersichtlich ist, dass mehrere hundert Terpen-Synthasen in Bakterien kodiert sind, von denen bisher

aber nur wenige charakterisiert wurden.^[12–22] Neue Methoden sind erforderlich, die mit den sich ansammelnden Sequenzdaten Schritt halten.

Zur Lösung dieses Problems haben wir eine phylogenetische Analyse bakterieller Terpen-Synthasen durchgeführt [Abbildung 7 der Hintergrundinformationen (SI)]. Mehrere Gruppen homologer Terpen-Cyclasen wurden identifiziert, und immer wenn ein Enzym bereits chemisch charakterisiert wurde, wurde die Funktion der verwandten Enzyme durch Analogieschluss ermittelt.^[23] Die Korrektheit dieser Vorgehensweise wurde durch Identifizierung der flüchtigen Terpene in Duftstoffextrakten belegt. Unsere analytischen Daten wurden weiterhin zur Vorhersage des Produktes einer uncharakterisierten Gruppe von sechs Enzymen verwendet [gerahmter Kasten im phylogenetischen Baum von Abbildung 7 (SI)]. Drei dieser Enzyme stammen aus Bakterien, für die die Terpene analysiert wurden (*Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331, *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 und *S. filamentosus* NRRL 15998). Alle drei Bakterien produzieren *epi*-Cubenol, was zeigt, dass die entsprechenden Enzyme *epi*-Cubenol-Synthasen sind (man beachte, dass kein anderes Terpen gemeinsam in allen drei Stämmen vorkommt und dass keine anderen Terpen-Cyclasen dieser Bakterien an anderer Stelle im Baum einen Cluster bilden). Dieser deduktive Zugang fehlt im Falle alleinstehender Enzyme im phylogenetischen Baum. Zur Umgehung dieses Problems haben wir eine Methode für die schnelle und zuverlässige chemische Charakterisierung bakterieller Terpen-Cyclasen entwickelt, die auf der heterologen Expression in *Escherichia coli* basiert. Diese Spezies wurde als Wirt gewählt, da *E. coli* FPP synthetisieren kann und schnell wächst. *E. coli* kann leicht durch Elektroporation transformiert werden, und es sind diverse Vektoren und Stämme verfügbar, die für Proteinexpressionen optimiert wurden. Es wurden sogar Stämme entwickelt, die effizient Codons auslesen können, die von *E. coli* selten verwendet werden. Insgesamt wurde *E. coli* als ein ideales System für die schnelle Analyse von Terpen-Cyclasen betrachtet.

Für die Identifizierung der Produkte von sechs uncharakterisierten bakteriellen Terpen-Cyclasen wurden die entsprechenden Gene durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und in den Expressionsvektor pET28c kloniert, gefolgt von Transformation von *E. coli* BL21. Nach Induktion der Proteinexpression wurden die Flüssigkulturen von *E. coli* an eine Closed-Loop-Stripping-Apparatur (CLSA) zur Sammlung der Duftstoffe auf Aktivkohlefiltern angeschlossen.^[23,24] Die Filter wurden mit CH_2Cl_2 extrahiert und die erhaltenen Extrakte durch GC-MS analysiert.

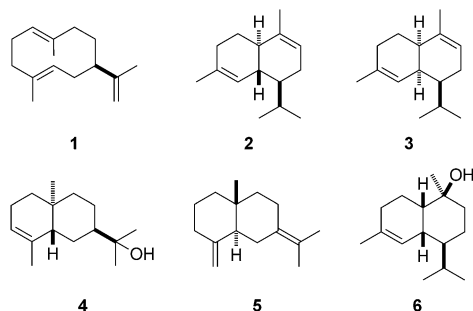
Die Produkte zweier Terpen-Cyclasen aus *Chitinophaga pinensis* DSM 2588 wurden identifiziert. Expression des

[*] P. Rabe, Dr. J. S. Dickschat
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: j.dickschat@tu-bs.de

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG mit einem Emmy Noether-Stipendium (an J.S.D., DI1536/1-1), durch das Projekt „Duftstoffe aus Actinomyceten“ (DI1536/2-1) sowie durch ein Doktorandenstipendium des Beilstein-Institutes zur Förderung der Chemischen Wissenschaften (an P.R.) gefördert. Wir danken Stefan Schulz für Unterstützung unserer Gruppe.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201209103> zu finden.

ersten Enzyms (Zugangsnummer YP_003121494) resultierte in der Bildung von β -Elemen als Hauptprodukt [Tabelle 1 (SI) und Abbildung 1 (SI)]. β -Elemen ist das Produkt einer Cope-Umlagerung von Germacren A (**1**; Schema 1) und wird

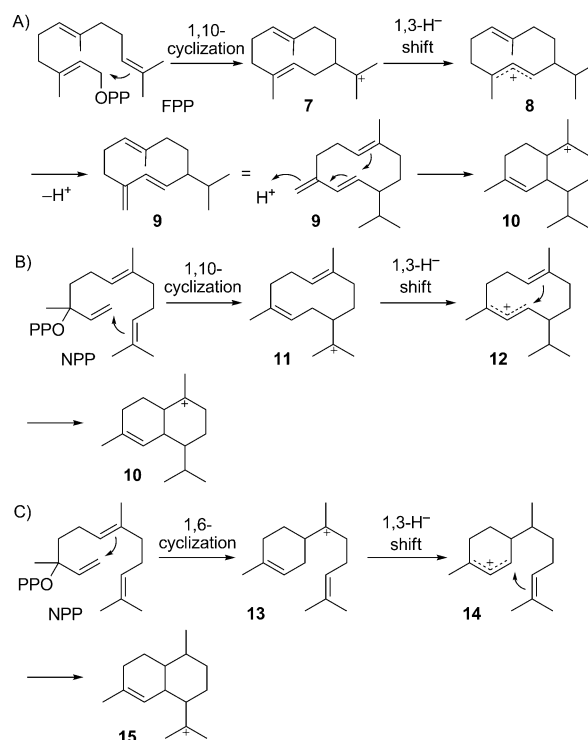


Schema 1. Hauptprodukte bakterieller Terpen-Cyclasen.

durch thermische Reaktion im Injektor des Gaschromatographen gebildet.^[25] Kleine Mengen an **1** wurden ebenfalls detektiert. Daher ist diese Terpen-Cyclase eine Germacren-A-Synthase. Weitere Produkte waren (*E*)-Nerolidol, γ -Elemen und δ -Elemen (die Produkte einer Cope-Umlagerung von Germacren B bzw. C), (*E*)- β -Farnesen, Germacren B, α -Selinene, β -Selinene, Hedycaryol und Germacradien-4-ol. Die Bildung all dieser Terpene durch ein Enzym kann über gemeinsame kationische Intermediate erklärt werden [Schema 1 (SI)]. Keines der Terpene wurde in Duftstoff-extrakten von *C. pinensis* gefunden, wodurch es nahe liegt, dass die Germacren-A-Synthase unter standardisierten Kultivierungsbedingungen nicht exprimiert wird.

Expression einer zweiten Terpen-Cyclase aus *C. pinensis* (YP_003124367) resultierte in γ -Cadinene (**2**) zusammen mit α - und δ -Cadinene, α -Muurole, *cis*-Muurole-4(15),5-dien, 10-*epi*-Zonarene, α -Copaene, (*E*)- β -Farnesen, β - und γ -Elemen und Germacren-D-4-ol [Tabelle 2 (SI) und Abbildung 2 A (SI)]. Die Biosynthese von **2** ist über das (*E,E*)-Germacradienylkation (**7**) und Germacren D (**9**) erklärbar, wie zuvor für die Biosynthese von Cadalanen in *Medicago truncatula* vorgeschlagen (Mechanismus A; Schema 2).^[26,27] Allerdings wurde **9** nicht in Duftstoffextrakten von *E. coli* nachgewiesen. Ein alternativer Mechanismus ist die 1,10-Cyclisierung von Nerolidyldiphosphat (NPP) zum (*E,Z*)-Germacradienylkation (**11**), gefolgt von einer 1,3-Hydridwanderung und Cyclisierung zu **10** (Mechanismus B; Schema 2). Ein Biosyntheseschema zu allen Produkten der γ -Cadinene-Synthase auf Grundlage von Mechanismus A ist in Schema 2 der Hintergrundinformationen gezeigt. Das Hauptprodukt **2** wurde auch in *C. pinensis* detektiert (Abbildung 2 B der Hintergrundinformationen).

Zwei Terpen-Cyclasen aus *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736 wurden untersucht. Expression des ersten Enzyms (ZP_07302078) resultierte in α -Amorphene (**3**) und Spuren von γ -Amorphene, α - und β -Ylangene, α -Himachalene, α -Cuprenene, β -Bisabolen, β -Sesquiphellandrene und (*E*)- β -Farnesen [Tabelle 3 (SI) und Abbildung 3 A (SI)]. Die Oxidationsprodukte α - und β -Calacorene wurden ebenfalls gefunden. Die Produktion von **3** kann über einen initialen



Schema 2. Drei alternative Mechanismen für die Biosynthese von Cadalen-Sesquiterpenen wie in der Literatur diskutiert.^[26–28] OPP = $\text{OP}_2\text{O}_6^{3-}$.

1,10-Ringschluss über **9** ablaufen, aber auch für die α -Amorphene-Synthase wurde keine Produktion von **9** beobachtet. Die Bildung monocyclischer Sesquiterpene wie β -Bisabolen erfordert eine Isomerisierung von FPP zu NPP, was eine Biosynthese nach Mechanismus B wahrscheinlicher erscheinen lässt. Eine dritte Alternative ist ein initialer 1,6-Ringschluss von NPP zum Bisabolylkation (**13**), gefolgt von einer 1,3-Hydridwanderung und Cyclisierung zu **15** (Mechanismus C, Schema 2), wie zuvor für die Biosynthese von δ -Cadinene in *Gossypium hirsutum* vorgeschlagen.^[28] Dies würde auch die Bildung von Verbindungen wie β -Bisabolen erklären, allerdings ist das kationische Zentrum in **15** für die Bildung von **3** nicht korrekt positioniert. Man müsste eine komplexe Serie von Hydridwanderungen über Kationen von **15** zu **10** annehmen, aber es wurden keine Deprotonierungsprodukte solcher Kationen beobachtet. Ein detaillierter Biosyntheseweg über den Mechanismus B zu allen Produkten der α -Amorphene-Synthase ist in Schema 3 (SI) gezeigt. α -Amorphene, γ -Amorphene sowie α - und β -Ylangene wurden auch in *S. viridochromogenes* gefunden [Abbildung 3 B (SI)].

Das zweite Enzym von *S. viridochromogenes* (ZP_07308339) war hoch selektiv für 7-*epi*- α -Eudesmol (**4**) [Tabelle 4 (SI) und Abbildung 4 (SI)]. Geringe Mengen an 10-*epi*- γ -Eudesmol, 5-*epi*-7-*epi*- α -Eudesmol, Hedycaryol, Valerianol, β -Dihydroagarofuran, α -Selinene, 7-*epi*- α -Selinene, (*E*)- β -Caryophyllene, (*E*)- β -Farnesen, Germacren A und β -Elemen wurden ebenfalls detektiert. Alle Produkte entstehen durch Ringschluss zu **7**, mit Ausnahme von (*E*)- β -Caryophyllene, das eine 1,11-Cyclisierung erfordert [Schema 4 (SI)]. Die Biosynthese von β -Dihydroagarofuran umfasst einen in-

tramolekularen Angriff einer Hydroxygruppe an einem tertiären kationischen Zentrum, der den Tetrahydrofuranring aufbaut, während Valerianol eine 1,2-Methylwanderung erfordert. Es wurde keine Produktion von **4** oder den Nebenprodukten in *S. viridochromogenes* beobachtet.

Eine Sesquiterpen-Cyclase aus *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 (ZP_06911744) zeigte hohe Selektivität für Selina-4(15),7(11)-dien (**5**) neben Selina-3,7(11)-dien, Selina-4(15),6-dien, δ -Selinen, Germacren B sowie β -, γ - und δ -Elemen [Tabelle 5 (SI) und Abbildung 5 A (SI)]. Die Bildung von **5** ist erklärbar durch Cyclisierung von FPP zu **7**, Deprotonierung zu Germacren B, Reprotonierung für einen zweiten Cyclisierungsschritt und finalen Verlust eines Protons [Schema 5 (SI)]. Die Bildung einiger Nebenprodukte kann analog über Germacren A und C formuliert werden. Alle Sesquiterpene mit Ausnahme von Selina-4(15),6-dien wurden auch in *S. pristinaespiralis* detektiert [Abbildung 5 B (SI)]. Nahe verwandte Enzyme der Selina-4(15),7(11)-dien-Synthase sind in den Genomen von *Streptomyces somaliensis* DSM 40738 (ZP_11214367) und *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (ZP_10070539) kodiert [Abbildung 7 (SI)]. Eine Untersuchung von Duftstoffextrakten von *S. tsukubaensis* zeigte die Produktion von hauptsächlich Selina-3,7(11)-dien und kleineren Mengen von **5**. Daher ist das Enzym aus *S. tsukubaensis* eine Selina-3,7(11)-dien-Synthase. Die Biosynthesen von **5** und Selina-3,7(11)-dien unterscheiden sich lediglich im letzten Deprotonierungsschritt.

Das Produktspektrum einer Sesquiterpen-Cyclase aus dem Chloroflexus *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 (YP_001430766) war verhältnismäßig einfach und bestand nur aus T-Muurolo (**6**) neben δ -Cadinen sowie α - und γ -Muurolen [Tabelle 6 (SI) und Abbildung 6 (SI)]. Alle vier Verbindungen entspringen aus einer kationischen Spezies durch Angriff von Wasser oder alternative Deprotonierungsschritte [Schema 6 (SI)]. Extrakte von *R. castenholzii* enthielten kein **6** oder die Nebenprodukte.

Expressionen bakterieller Sesquiterpen-Cyclasen in *E. coli* und direkte Analyse der Duftstoffextrakte sind eine nützliche und schnelle Methode für die Charakterisierung von Enzymen mit unbekannten Produkten. Die Methode funktioniert auch für Terpen-Cyclasen, die in ihrem nativen Wirt inaktiv sind. Eine arbeits- und zeitaufwändige Reinigung der exprimierten Terpen-Cyclase sowie der Reaktionsprodukte, die in Inkubationsexperimenten erhalten werden, wird vermieden. Für eine unzweifelhafte Identifizierung der erhaltenen Verbindungen durch GC-MS sind qualitativ hochwertige MS-Datenbanken, die Informationen über Retentionsindizes enthalten, notwendig und hinreichend. Solche Bibliotheken stehen zur Verfügung^[29,30] für unsere Methode, die geeignet ist, mit den schnellen Entwicklungen der DNA-Sequenzierung Schritt zu halten.

Eingegangen am 13. November 2012
Online veröffentlicht am 10. Januar 2013

Stichwörter: Duftstoffe · Gaschromatographie · Heterologe Expression · Massenspektrometrie · Terpenoide

- [1] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1917–1936.
- [2] D. E. Cane, P. C. Prabhakaran, J. S. Oliver, D. B. J. McIlwaine, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3209–3210.
- [3] M. N. Ashby, P. A. Edwards, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 13157–13164.
- [4] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3412–3442.
- [5] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, 277, 1811–1815.
- [6] C. Feil, R. Süßmuth, G. Jung, K. Poralla, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242, 51–55.
- [7] D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163–168.
- [8] C. A. Lesburg, J. M. Caruthers, C. M. Paschall, D. W. Christianson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 695–703.
- [9] C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, 277, 1820–1824.
- [10] J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, 49, 1787–1797.
- [11] M. Köksal, W. K. W. Chou, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2012**, 51, 3011–3020.
- [12] D. E. Cane, J. K. Sohng, C. R. Lamberson, S. M. Rudnicki, Z. Wu, M. D. Lloyd, J. S. Oliver, B. R. Hubbard, *Biochemistry* **1994**, 33, 5846–5857.
- [13] W. K. W. Chou, I. Fanizza, T. Uchiyama, M. Komatsu, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8850–8851.
- [14] Y. Hu, W. K. W. Chou, R. Hopson, D. E. Cane, *Chem. Biol.* **2011**, 18, 32–37.
- [15] C. Nakano, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 27980–27987.
- [16] C. Nakano, F. Kudo, T. Eguchi, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, 12, 2271–2275.
- [17] C. Nakano, H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1988–1991.
- [18] C. Nakano, M. H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, 12, 2403–2407.
- [19] S. A. Agger, F. Lopez-Gallego, T. R. Hoyer, C. Schmidt-Dannert, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 6084–6096.
- [20] J. Jiang, X. He, D. E. Cane, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 711–715.
- [21] a) C.-M. Wang, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8908–8909; b) M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 7422–7427.
- [22] X. Lin, R. Hopson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6022–6023.
- [23] C. A. Citron, J. Gleitzmann, G. Laurenzano, R. Pukall, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2012**, 13, 202–214.
- [24] K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr. A* **1976**, 117, 285–294.
- [25] P. J. Teisseire, *Chemistry of Fragrant Substances*, Wiley-VCH, New York, **1994**.
- [26] D. Arigoni, *Pure Appl. Chem.* **1975**, 41, 219–245.
- [27] S. Garms, T. G. Köllner, W. Boland, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 5590–5600.
- [28] J. A. Faraldos, D. J. Miller, V. Gonzalez, Z. Yoosuf-Ali, O. Cascon, A. Li, R. K. Allemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 5900–5908.
- [29] D. Joulain, W. A. König, *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, E.B.-Verlag, Hamburg, **1998**.
- [30] R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Pub Corp, Carol Stream, **2009**.