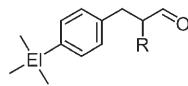


# Duftvorhersage: das Computermodell des hOR17-4-Rezeptors auf dem Prüfstand mit Silicium-Analoga von Bourgeonal und Lilial\*\*

Leszek Doszczak, Philip Kraft,\* Hans-Peter Weber, Rüdiger Bertermann, Annika Triller, Hanns Hatt\* und Reinholt Tacke\*

Die Verleihung des Nobelpreises an Axel<sup>[1a]</sup> und Buck<sup>[1b]</sup> für ihre bahnbrechenden Arbeiten zum Mechanismus der Geruchswahrnehmung weckte hohe Erwartungen bezüglich der Vorhersagbarkeit von Geruchseigenschaften. Vielleicht zu Unrecht, denn Buck et al.<sup>[2a]</sup> stellten auch fest, dass jeder einzelne Riechstoff viele unterschiedliche Rezeptoren aktivieren kann, dass Gerüche durch ein komplexes Erregungsmuster der Glomeruli kodiert werden und dass Riechstoffgemische sogar kortikale Neuronen stimulieren können, die von ihren Einzelkomponenten gar nicht erregt werden.<sup>[2b]</sup> Daher scheint es fast unmöglich, die olfaktorischen Eigenschaften eines Riechstoffs mit unterschiedlicher Affinität zu geschätzten 347 verschiedenen menschlichen Riechrezeptoren vorherzusagen.<sup>[3]</sup> Folglich basiert der Entwurf neuer Riechstoffe noch immer auf strukturellen Ähnlichkeiten zu Referenzverbindungen statt auf dem Einpassen in eine Rezeptorbindungsstelle.<sup>[4,5]</sup> Wo aber stehen wir heute mit der Vorhersagbarkeit eines Geruchs, und besonders auch seiner Intensität, auf der Basis von olfaktorischen Rezeptormodellen?

Um unser Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Riechstoff und Rezeptor auf die Probe zu stellen, wollten wir die Auswirkungen des Austausches von Kohlenstoff gegen Silicium<sup>[6]</sup> auf den Geruch der Maiglöckchen-Riechstoffe



- 1a:** EI = C, R = Me  
**1b:** EI = Si, R = Me  
**2a:** EI = C, R = H  
**2b:** EI = Si, R = H

Lilial (**1a**) und Bourgeonal (**2a**) vorhersagen. Da dieser C/Si-Austausch (Sila-Substitution) recht wenig Einfluss auf die Molekülform hat, sollten sich gemäß dem aktuellsten Olfaktorphormodell für Maiglöckchen-Riechstoffe<sup>[5]</sup> nicht der Hauptcharakter, sondern nur der Geruchsschwellenwert und begleitende Nuancen ändern. Lyral<sup>[7a]</sup> und Lilial (**1a**)<sup>[7b]</sup> waren die beiden ersten Liganden, für die Berechnungen von Riechstoff-Rezeptor-Komplexen durchgeführt wurden, und zwar am OR5-Rezeptor der Ratte (=O1r1469), der mit einem Baculovirus-Sf9-Zellsystem exprimiert worden war.<sup>[8]</sup> Im olfaktorischen Epithel des Menschen spricht der hOR17-4-Rezeptor (=OR1D2) auf Lilial (**1a**) und Bourgeonal (**2a**) an. Für quantitative Aussagen ist er besonders gut geeignet, da er auch in menschlichen Spermien vorkommt.<sup>[9]</sup> Zwar reagiert unter anderem auch der hOR17-40-Rezeptor (=OR3A1), der ebenfalls in der Riechschleimhaut des Menschen zu finden ist, auf Lilial (**1a**),<sup>[10]</sup> der hOR17-4-Rezeptor schien uns aber besser geeignet für einen Vergleich der In-vivo-, In-vitro- und In-silico-Modelle.

In Analogie zur Kristallstruktur von Rinder-Rhodopsin (1U19) wurde mit dem MOLOC-Programmpaket<sup>[11]</sup> ein Homologiemodell des hOR17-4-Rezeptors generiert, wobei der Sequenzabgleich von hOR17-4 mit 1U19 der publizierten Ausrichtung von OR1E1 an Rinder-Rhodopsin entspricht,<sup>[12]</sup> das eine große Ähnlichkeit zum hOR17-4-Rezeptor hat. Im generierten Rezeptormodell wird die Ligandbindungstasche (LBP) von 21 Aminosäuren der Transmembranhelices (TM) und zwei Aminosäuren des extrazellulären Loops (ES2) gebildet, die den Liganden in einen nahezu geschlossenen Hohlraum einschließen (siehe Hintergrundinformationen).

Ähnlich wie beim Rhodopsin ist es nur schwer vorstellbar, wie ein Ligand in die Bindungstasche hinein- oder herauskommt. Möglicherweise entfaltet sich die lange, zweifach gewundene ES2-Kette, die die extrazelluläre Seite verschließt, und eröffnet dadurch einen Zugang zur Bindungstasche. Es wurde aber auch schon in Betracht gezogen,<sup>[13]</sup> dass kleine lipophile Liganden seitlich zwischen TM5 und TM6 in die Bindungstasche eintreten können, wenn der Phenylring von F212 (TM5) und die Seitenkette von I269 (TM6) in ein anderes Rotamer übergehen.

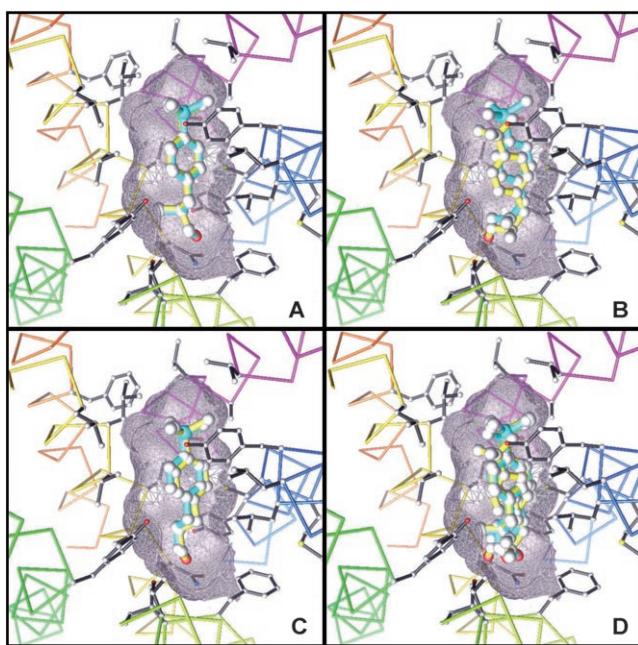
Rein zufällige, jedoch stereochemisch sinnvolle Konformationen der betreffenden Riechstoffe wurden nun flexibel mit dem MOLOC-Algorithmus in die Bindungstasche eingepasst, wobei die Seitenketten der 23 Aminosäuren in dem

[\*] Dr. L. Doszczak, Dr. R. Bertermann, Prof. Dr. R. Tacke  
 Universität Würzburg  
 Institut für Anorganische Chemie  
 Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)  
 Fax: (+49) 931-888-4609  
 E-Mail: r.tacke@mail.uni-wuerzburg.de  
 Dr. P. Kraft, Dr. H.-P. Weber  
 Givaudan Schweiz AG, Riechstoff-Forschung  
 Überlandstrasse 138, 8600 Dübendorf (Schweiz)  
 Fax: (+41) 44-824-2926  
 E-Mail: philip.kraft@givaudan.com  
 A. Triller, Prof. Dr. Dr. H. Hatt  
 Lehrstuhl für Zellphysiologie  
 Ruhr-Universität Bochum  
 Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)  
 Fax: (+49) 234-321-4129  
 E-Mail: hanns.hatt@rub.de

[\*\*] Wir bedanken uns bei Alain E. Alchenberger (Givaudan) für die olfaktorischen Beurteilungen und bei Katarina Grman (Givaudan) für die Bestimmung der GC-Geruchsschwellenwerte. P.K. dankt Boris Schilling und Stephan Bieri (beide Givaudan) für anregende Diskussionen über die Biochemie der Geruchswahrnehmung, und L.D. dankt der Givaudan Schweiz AG für die finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können bei den Autoren angefordert werden.

ansonsten starren Rezeptor flexibel gehalten wurden (Abbildung 1). Die angedockten Liganden wurden bis zur Konvergenz energieminiert und nach ihrer enthalpischen Bindungsenergie sortiert. Die höchsten Bindungsenergien



**Abbildung 1.** Andocken von A) (S)-Lilial [(S)-1a], B) (R)-Lilial [(R)-1a], C) Bourgeonal (2a) und den entsprechenden Silicium-Analoga (S)-1b, (R)-1b bzw. 2b (cyan) an das Computermodell des hOR17-4-Rezeptors sowie D) Überlagerung aller sechs Liganden.

$\Delta E_{\text{inter,corr}}$  für Lilial (**1a**) und Bourgeonal (**2a**) sowie für ihre Silicium-Analoga **1b** bzw. **2b** sind in Tabelle 1 aufgeführt. Lilial (**1a**) und sein Silicium-Analogon **1b** haben ein Chiralitätszentrum, racemisieren aber extrem leicht, vermutlich auch unter physiologischen Bedingungen. Daher untersuch-

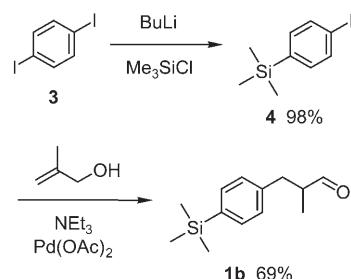
**Tabelle 1:** Vergleich der berechneten Bindungsenergien  $\Delta E_{\text{inter,corr}}$ , der gemessenen GC-Geruchsschwellenwerte und der  $\text{EC}_{50}$ -Werte von Spermien.

hOR17-4-Ligand	$\Delta E_{\text{inter,corr}}$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	GC-Schwellen- wert [ng L <sup>-1</sup> Luft]	$\text{EC}_{50}$ (Spermien) [μM]
Lilial ( <b>1a</b> )	-10.4	0.10	10
Sila-Lilial ( <b>1b</b> )	-5.5	3.30	20
Bourgeonal ( <b>2a</b> )	-12.1	0.16	10
Sila-Bourgeonal ( <b>2b</b> )	-7.5	0.55	15

ten wir hier die racemischen Gemische undmittelten die Energiebeträge der enantiomeren Formen von **1a** und **1b**. Über die Geruchseigenschaften der Lilial-Enantiomere existieren unterschiedliche Ansichten, das (R)-Enantiomer wurde jedoch stets als das intensivere beschrieben.<sup>[14]</sup> In unseren Berechnungen waren die Unterschiede zwar nicht sehr gravierend, aber die (R)-Enantiomere wurden auch hier in beiden Fällen besser gebunden (siehe Hintergrundinformationen).

Abbildung 1 zeigt, dass alle Liganden vom hOR17-4-Rezeptormodell in sehr ähnlicher Position gebunden werden. Die Formyl-Funktionen aller Liganden gehen dabei je zwei Wasserstoffbrückenbindungen ein, allerdings von unterschiedlicher Stärke, eine zur NH<sub>2</sub>-Funktion von N125 (TM3), die andere zur OH-Gruppe von Y261 (TM6). Auch die intensiven Van-der-Waals-Wechselwirkungen der aromatischen Ringe mit der aus Y268 (TM6) und V121 (TM3) gebildeten hydrophoben Klammer variieren deutlich in ihrer Intensität (siehe Hintergrundinformationen). Die Silicium-Analoga **1b** und **2b** zeigen übereinstimmend niedrigere Bindungsenergien als die entsprechenden Kohlenstoff-Verbindungen, was mit der höheren Van-der-Waals-Abstoßung des sterisch anspruchsvollen Trimethylsilyl-Restes zusammenhängt. Der Unterschied in der Bindungsenergie sehr ähnlicher Verbindungen kann in erster Näherung mit der Differenz der freien Bindungsenthalpien gleichgesetzt werden (da sich die entropischen Effekte gegenseitig kompensieren), und die berechneten Differenzen der Bindungsenergien  $\Delta E_{\text{inter,corr}}$  spiegeln in der Tat den Trend der gemessenen biologischen Daten wider (Tabelle 1).

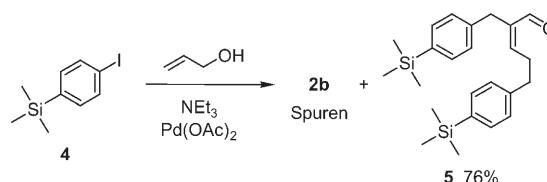
Die Synthese von racemischem Sila-Lilial (**1b**) (Schema 1) ging von 1,4-Diodbenzol (**3**) aus, das über die



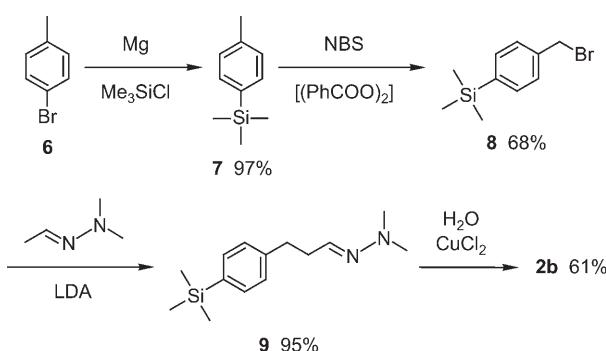
**Schema 1.** Synthese von Sila-Lilial (**1b**).

Monolithium-Verbindung mit Chlortrimethylsilan in (4-Iodphenyl)trimethylsilan (**4**) überführt wurde. Dieses wurde dann in einer Heck-Reaktion<sup>[15]</sup> mit 2-Methylprop-2-en-1-ol zu **1b** umgesetzt. Bei der analogen Heck-Reaktion von **4** mit Prop-2-en-1-ol konnte das gewünschte Sila-Bourgeonal (**2b**) allerdings nur in Spuren isoliert werden. Unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen geht **2b** nämlich sofort eine Aldol-Kondensation zu **5** ein (Schema 2, siehe Hintergrundinformationen). Daher musste eine alternative Route über das Dimethylhydrazon<sup>[16]</sup> ausgearbeitet werden.

Dazu wurde gemäß Lit. [17] (4-Methylphenyl)trimethylsilan (**7**) aus 4-Bromtoluol (**6**) synthetisiert (Schema 3). Die radikalische Bromierung von **7** mit *N*-Bromsuccinimid



**Schema 2.** Reaktion von **4** mit Prop-2-en-1-ol.



**Schema 3.** Synthese von Sila-Bourgeonal (**2b**).

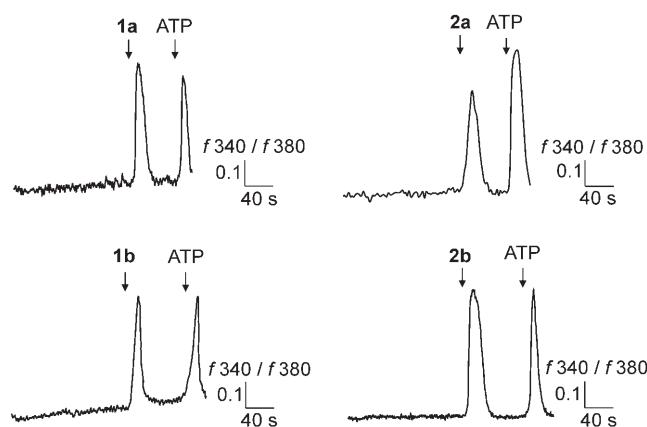
(NBS)<sup>[18]</sup> ergab [4-(Brommethyl)phenyl]trimethylsilan (**8**), das mit lithiiertem Ethanal-*N,N*-dimethylhydrazone zum entsprechenden Hydrazon **9** reagierte. Hydrolyse von **9** mit wässriger Kupfer(II)-chlorid-Lösung<sup>[19]</sup> lieferte dann Sila-Bourgeonal (**2b**).

Zum Vergleich wurde auch Sila-Lilial (**1b**) auf diesem Weg hergestellt und die Synthese von Sila-Bourgeonal (**2b**) im Multigramm-Maßstab ohne Reinigung des Hydratzons **9** und unter Verwendung von Oxalsäure<sup>[20]</sup> statt Kupfer(II)-chlorid durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen).

Wie vorhergesagt besaßen alle synthetisierten Riechstoffe typisch blumig-aldehydige Maiglöckchen-Düfte. Sila-Lilial (**1b**) ist jedoch in der Tonalität etwas rosiger, leicht fettiger und weniger frisch, spritzig und wässrig als Lilial (**1a**). Die blumige, grün-aldehydige wässrig-frische Note von Sila-Bourgeonal (**2b**) liegt zwischen der von **1a** und **2a**, sie ist weicher und weniger grün-aldehydig als letztere. Daher sind sicherlich unterschiedliche Geruchsrezeptoren an ihrer Differenzierung beteiligt. In der Nähe ihres Schwellenwertes lassen sich die blumig-aldehydigen Noten der Verbindungen aber nicht mehr unterscheiden. Wir vermuten daher, dass bei dieser Konzentration nur der empfindlichste Maiglöckchen-Rezeptor aktiviert wird. Die gemessenen Geruchsschwellenwerte (Tabelle 1) für Lilial (**1a**), Bourgeonal (**2a**) und ihre Silicium-Analoga **1b** und **2b** stimmen gut mit den aus dem hOR17-4-Rezeptormodell berechneten Werten für  $\Delta E_{\text{inter,corr}}$  überein. Je negativer die enthalpische Bindungsenthalpie  $\Delta E_{\text{inter,corr}}$  desto stärker wird der Riechstoff gebunden und desto niedriger ist die Schwellenwertkonzentration, die ausreicht, um dieselbe Anzahl von Rezeptoren zu aktivieren.<sup>[21]</sup> Während sowohl Lilial (**1a**) als auch Bourgeonal (**2a**) in Schwellenwert und Bindungsenthalpie vergleichbar sind, liegt der Schwellenwert von Sila-Lilial (**1b**) etwa 30-mal höher als der der entsprechenden Kohlenstoff-Verbindung **1a**, was in guter Übereinstimmung mit der Differenz von  $-4.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  in der freien Bindungsenthalpie ist. Der Geruchsschwellenwert von Sila-Bourgeonal (**2b**) ist etwa viermal höher als der der entsprechenden Kohlenstoff-Verbindung **2a**, was mit der berechneten Energiedifferenz von  $-4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  in Einklang ist.

Auch wenn die Übereinstimmung erstaunlich gut ist, konnten wir nicht davon ausgehen, dass hOR17-4 tatsächlich der empfindlichste Maiglöckchen-Rezeptor ist. Es war unabdingbar, die Schwellenwerte und die Molecular-Modeling-

Ergebnisse mit Daten des rekombinanten und nativen hOR17-4-Rezeptors zu vergleichen. Über die funktionelle Expressierung von rekombinanten OR-Proteinen verschiedener Spezies ist schon detailliert berichtet worden.<sup>[22–24]</sup> Hier exprimierten wir zunächst hOR17-4 rekombinant in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293). Die Rezeptoraktivierung führt zu einem einmaligen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der sich mithilfe von fluorometrischen Imaging-Techniken detektieren lässt.<sup>[23]</sup> Die Riechstoffe Lilial (**1a**), Sila-Lilial (**1b**), Bourgeonal (**2a**) und Sila-Bourgeonal (**2b**) (jeweils in einer Konzentration von  $500 \mu\text{M}$ ) induzierten, wie für die transiente olfaktorische Rezeptortransfektion üblich,<sup>[23]</sup> in etwa 1% aller getesteten Zellen Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Bei nichttransfizierten HEK-Zellen wurden keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktionen beobachtet, nicht einmal bei einer zehnfach höheren Konzentration des Agonisten. ATP (in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ ) diente als Kontrollsubstanz für die Erregbarkeit der HEK-Zellen (Abbildung 2). Alle vier getesteten Liganden er-



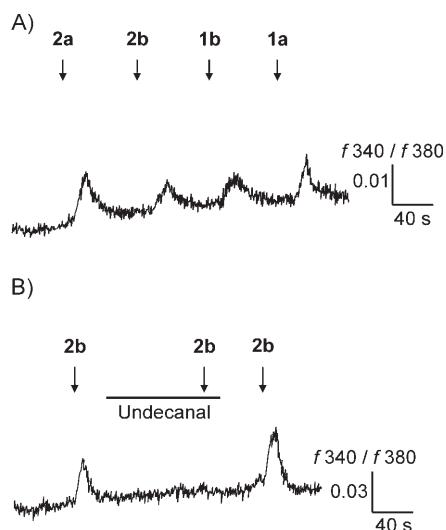
**Abbildung 2.** Repräsentative  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messungen von hOR17-4-transfizierten HEK293-Zellen. Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterschiedlicher Fura-2-AM-beladener Zellen ist als Verhältnis der integrierten Fluoreszenz ( $f_{340}/f_{380}$ ) gegen die Zeit aufgetragen. Die Verbindungen **1a**, **1b**, **2a** und **2b** wurden 10 s lang in einer Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  appliziert. ATP ( $10 \mu\text{M}$ ) diente als Kontrollsubstanz für die Erregbarkeit der HEK-Zellen.

reichten fast die gleiche Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Die Schwellenwertkonzentrationen für Lilial (**1a**), Sila-Lilial (**1b**), Bourgeonal (**2a**) und Sila-Bourgeonal (**2b**) lagen dabei in einem Bereich von  $5\text{--}10 \mu\text{M}$ .

Mit dem HEK293-Zellsystem war aber nur eine eher qualitative Aussage möglich. Der hOR17-4-Rezeptor wird jedoch auch funktional von menschlichen Spermatozoen exprimiert, und das Spektrum der effektiven Liganden der menschlichen Spermien stimmt ziemlich genau mit dem rezeptiven Bereich der rekombinant exprimierten Rezeptoren überein.<sup>[9]</sup> Dabei sind Spermatozoen viel empfindlicher. Die Erkennungsschwellenwerte für Lilial (**1a**) und Bourgeonal (**2a**) lagen bei Konzentrationen zwei Größenordnungen unter denen im HEK-Zellsystem.<sup>[9]</sup> Im Unterschied zu HEK293-Zellen, bei denen sich Dufreaktionen nur einmalig auslösen

ließen, konnten bei Spermatozoen mit kurzen Duftreizen von Lilial (**1a**) und Bourgeonal (**2a**) reproduzierbare und stabile  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Abhängigkeit von der Konzentration erzeugt werden. Daher haben wir die Potenz der vier Liganden **1a**, **1b**, **2a** und **2b** an Fura-2-AM-beladenen Spermatozoen verglichen.

Wie in Abbildung 3A dargestellt, induzierten alle vier Agonisten im selben Spermatozoon bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, was eine exzellente Ver-



**Abbildung 3.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messungen an Einzelzellen. Repräsentative fluorometrische Aufnahmen von einzelnen Fura-2-AM-beladenen menschlichen Spermatozoen. Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist als Verhältnis der integrierten Fluoreszenz ( $f_{340}/f_{380}$ ) gegen die Zeit aufgetragen. A) Induktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen mit ähnlicher Amplitude nach Applikation (10 s) von **1a**, **1b**, **2a** und **2b** in einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$ . B) Nach Vorinkubation mit Undecanal (100 s) wird das Ansprechen auf Sila-Bourgeonal (**2b**,  $50 \mu\text{M}$ ) bei Koapplikation (10 s) mit Undecanal ( $50 \mu\text{M}$ ) vollständig unterdrückt.

gleichbarkeit untereinander sicherstellte. Die Amplituden und die Signalkinetik der beobachteten Reaktionen lagen größtenteils in einem ähnlichen Bereich. Koapplikation mit Undecanal, einem aliphatischen Aldehyd, der als spezifischer kompetitiver Antagonist für hOR17-4 nachgewiesen wurde,<sup>[9]</sup> blockierte das Ansprechen der Spermatozoen auf Sila-Bourgeonal (**2b**) (Abbildung 3B) und Sila-Lilial (**1b**) vollständig, was belegte, dass, selbst wenn andere Rezeptoren in Spermatozoen vorkommen, diese nicht mit der Messung interferierten. Alle vier Riechstoffe aktivierten die Spermatozoen in einer konzentrationsabhängigen Weise. Die EC<sub>50</sub>-Werte für Lilial (**1a**), Sila-Lilial (**1b**), Bourgeonal (**2a**) und Sila-Bourgeonal (**2b**) (Tabelle 1) lagen in einem Bereich von  $10\text{--}20 \mu\text{M}$  und stimmten gut mit den Intensitätsreihenfolge der GC-Schwellenwerte überein. Die Schwellenkonzentrationen der vier hOR17-4-Agonisten lagen in einem Bereich von  $100 \text{ nM}$  (**1a**, **2a**, **2b**) bis  $1 \mu\text{M}$  (**1b**).

So wie es Ausnahmen in der Grammatik einer jeden Sprache gibt, so gibt es auch viele Beispiele für die Unvorhersagbarkeit der Geruchswahrnehmung; einige eindrucksvolle Beispiele wurden in einer aktuellen Kurzübersicht von

Sell zusammengestellt.<sup>[25]</sup> Und so wie ein Muttersprachler von seinem Sprachgefühl geleitet wird, so wird der Riechstoffchemiker auch in absehbarer Zukunft in erster Linie von seiner Erfahrung, seiner Intuition für chemische Strukturen, seiner Vorstellungskraft und seinem Instinkt geleitet werden. Am Beispiel von Lilial (**1a**) und Bourgeonal (**2a**) war es dennoch möglich, nur auf der Basis der stereoelektronischen Eigenschaften, anhand eines Computermodells des hOR17-4-Rezeptors die relativen Intensitäten der Silicium-Analoga **1b** und **2b** recht genau vorherzusagen. Im Bereich des Geruchsschwellenwertes sollte(n) nur der/die Rezeptoren(h) höchster Affinität ansprechen, und die gute Korrelation belegt, dass der hOR17-4-Rezeptor um den Schwellenwert herum eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung der Verbindungen spielt. Während die vier Maiglöckchen-Riechstoffe **1a**, **1b**, **2a** und **2b** bei höheren Konzentrationen leicht durch ihre unterschiedlichen Nuancen unterschieden werden können, weisen sie an ihrem Schwellenwert alle die gleiche blumig-aldehydige Note auf. Der komplexe Maiglöckchengeruch dieser Riechstoffe oberhalb ihres Schwellenwertes basiert mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Aktivierung unterschiedlicher Riechrezeptortypen und der mentalen Verarbeitung dieser Informationen. Dass aber der hOR17-4-Rezeptor von Maiglöckchen-Riechstoffen aktiviert wird, wurde qualitativ in transfizierten HEK293-Zellen und quantitativ im viel empfindlicheren Einzelspermatozoon-Modell gezeigt, welches darüber hinaus die Aufnahme einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ermöglichte. Wegen der unterschiedlichen zugrunde liegenden Zellsysteme und ihrer unterschiedlichen Komplexität kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messung an Einzelspermatozoen natürlich nicht auf absoluter Basis mit den GC-Schwellenwerten verglichen werden, die Intensitätsreihenfolge stimmte aber dennoch sehr gut überein. Zusammengekommen belegen diese Ergebnisse daher eindeutig, dass es in der Tat die elektronische Oberflächenstruktur eines Moleküls ist, die die Wechselwirkungen eines Riechstoffes mit seinen olfaktorischen Rezeptoren bestimmt. So gewährt unsere Strategie des C/Si-Austauschs<sup>[6]</sup> sogar einen Einblick in den Mechanismus der Aktivierung von Riechrezeptoren.

## Experimentelles

Die Synthese von **4**, der Versuch zur Synthese von **2b** mittels Heck-Reaktion, die Synthese von **1b** über die Hydrazon-Methode und die Synthese von **2b** im Multigramm-Maßstab sind, neben allgemeinen Informationen, in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Lilial (**1a**): Geruch: typische intensive und diffusive Aldehydnote nach Maiglöckchen und Lindenblüten, mild blumig und natürlich. Geruchsschwellenwert:  $0.10 \text{ ng L}^{-1}$  Luft (Standardabw. 0.08).

Bourgeonal (**2a**): Geruch: intensiver und diffusiver wässrig-blumiger Maiglöckchen-Duft mit grün-aldehydigem Charakter und einem Anklang an Melonen und Hyazinthen. Geruchsschwellenwert:  $0.16 \text{ ng L}^{-1}$  Luft (Standardabw. 0.17).

**1b:**  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (113 mg, 503  $\mu\text{mol}$ ) wurde zu einem Gemisch aus **4** (2.77 g, 10.0 mmol), 2-Methylprop-2-en-1-ol (865 mg, 12.0 mmol) und  $\text{NEt}_3$  (1.21 g, 12.0 mmol) gegeben. Nach 12 h Rühren des Reaktionsgemisches bei  $80\text{--}90^\circ\text{C}$  ließ man auf  $20^\circ\text{C}$  abkühlen. Säulen-chromatographie an Kieselgel (63–200  $\mu\text{m}$ ; Pentan/ $\text{Et}_2\text{O}$  9:1) lieferte **1b** (1.51 g, 69 %) als farblose Flüssigkeit.  $^1\text{H-NMR}$  (400.1 MHz):  $\delta = 9.71$  ( $\text{d}$ ,  $^3J = 1.5 \text{ Hz}$ , 1H; CHO), 7.43 ( $\delta_{\text{XX}}$ , 2H; SiCCH) und 7.14 ( $\delta_{\text{AA}}$ , 2H;  $\text{CHCCH}_2$ , AA'XX'-System,  $^4J_{\text{XX}} = 1.5$ ,  $^3J_{\text{AX}} = ^3J_{\text{AX'}} = 7.6$ ,

$^5J_{AX} = ^5J_{AX'} = 0.6$ ,  $^4J_{AA'} = 1.9$  Hz), 3.07 (dd,  $^2J = 13.5$ ,  $^3J = 5.8$  Hz, 1H; CH<sub>2</sub>), 2.72–2.61 (m, 1H; CH), 2.57 (dd,  $^2J = 13.5$ ,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H; CH<sub>2</sub>), 1.08 (d,  $^3J = 6.9$  Hz, 3H; CHCH<sub>3</sub>), 0.24 ppm (s, 9H; Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz):  $\delta = 204.4$  (CO), 139.4 (CHCCH<sub>2</sub>), 138.2 (CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 133.6 (2C, SiCCH), 128.4 (2C, CHCCH<sub>2</sub>), 48.0 (CHCH<sub>3</sub>), 36.6 (CH<sub>2</sub>), 13.3 (CHCH<sub>3</sub>), -1.1 ppm (3C, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>29</sup>Si-NMR (79.5 MHz):  $\delta = -4.2$  ppm; Elementaranalyse (%) ber. für C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>OSi (220.39 g mol<sup>-1</sup>): C 70.85, H 9.15; gef.: C 70.71, H 9.39. Geruch: ähnlich wie Lilial, typischer aldehydiger Maiglöckchen-Duft, etwas rosiger und fettiger als **1a**, mit zusätzlichem leichtem Ge-würzeinschlag, auch weniger frisch, spritzig und wässrig als **1a**. Geruchsschwellenwert: 3.30 ng L<sup>-1</sup> Luft (Standardabw. 1.77).

**2b:** Eine Lösung von iPr<sub>2</sub>NH (2.43 g, 24.0 mmol) in THF (20 mL) wurde unter Röhren bei -78°C tropfenweise mit einer 1.6 M Lösung von BuLi in Hexan (13.8 mL, 22.0 mmol BuLi) versetzt. Das Kühlbad wurde entfernt und die Mischung auf 20°C auftauen gelassen. Anschließend wurde Ethanal-*N,N*-dimethylhydrazon<sup>[17]</sup> (2.07 g, 24.0 mmol) bei -78°C tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch wiederum auf 20°C erwärmt (weißer Niederschlag). Daraufhin wurde unter Röhren bei -78°C **8**<sup>[19]</sup> (4.86 g, 20.0 mmol) tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 20°C 12 h gerührt. Anschließend wurden gesättigte wässrige NaCl-Lösung (20 mL) und Pentan (20 mL) zugegeben, und die organische Phase wurde abgetrennt und die Wasserphase mit Pentan extrahiert (3 x 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie an Kieselgel aufgetrennt (63–200 µm; Pentan/Et<sub>2</sub>O 1:1), wobei **9** (4.73 g, 95 %) als farblose Flüssigkeit (<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz):  $\delta = 142.1$  (CHCCH<sub>2</sub>), 138.0 (CHN), 137.5 (CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 133.5 (2C, SiCCH), 127.9 (2C, CHCCH<sub>2</sub>), 43.3 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.6 und 34.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHN), -1.1 ppm (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)) erhalten wurde, die daraufhin hydrolysiert wurde: Eine Lösung von CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (7.37 g, 43.2 mmol) in Wasser (36 mL) wurde bei 20°C zu einer Lösung von **9** (4.47 g, 18.0 mmol) in Pentan (180 mL) gegeben. Einige Tropfen konzentrierte Salzsäure wurden hinzugefügt, und das Gemisch wurde 2 h bei 20°C bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Die Phasen wurden getrennt, und die organische Phase wurde getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (63–200 µm; Pentan/Et<sub>2</sub>O 5:1), wobei **2b** (2.26 g, 61 %) als farblose Flüssigkeit erhalten wurde. <sup>1</sup>H-NMR (300.1 MHz):  $\delta = 9.81$  (t,  $^3J = 1.4$  Hz, 1H; CHO), 7.44 ( $\delta_{XX}$ , 2H; SiCCH) und 7.18 ( $\delta_{AA'}$ , 2H; CHCCH<sub>2</sub>, AA'XX'-System,  $^4J_{XX'} = 1.5$ ,  $^3J_{AX} = ^3J_{AX'} = 7.6$ ,  $^5J_{AX} = ^5J_{AX'} = 0.6$ ,  $^4J_{AA'} = 1.9$  Hz), 2.99–2.89 (m, 2H; CHCCH<sub>2</sub>), 2.82–2.73 (m, 2H; CH<sub>2</sub>CHO), 0.24 ppm (s, 9H; Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz):  $\delta = 201.5$  (CO), 140.9 (CHCCH<sub>2</sub>), 138.2 (CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 133.7 (2C, SiCCH), 127.7 (2C, CHCCH<sub>2</sub>), 45.1 (CH<sub>2</sub>CHO), 28.1 (CCH<sub>2</sub>), -1.1 ppm (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>29</sup>Si-NMR (59.6 MHz):  $\delta = -4.0$ ; Elementaranalyse (%) ber. für C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>OSi (206.36 g mol<sup>-1</sup>): C 69.84, H 8.79; gef.: C 69.35, H 8.29. Geruch: blumig, grün-aldehydige, frisch-wässrige Maiglöckchen-Note, die weicher und weniger grün-aldehydig als die von **2a** wirkt und in ihrer Blumigkeit zwischen der von **1a** und **2a** liegt. Geruchsschwellenwert: 0.55 ng L<sup>-1</sup> Luft (Standardabw. 0.99).

Zellkultur und Transfektion der HEK293-Zellen: Die HEK293-Zellen wurden unter Standardbedingungen in einem Dulbecco-Modified-Eagle-Medium (D-MEM), versetzt mit 10-proz. fötalem Rinderserum (FBS), Penicillin und Streptomycin (je 100 units mL<sup>-1</sup>), gehalten. Zwei Tage vor der transienten Transfektion der HEK293-Zellen wurden die Zellen plattierte ( $5 \times 10^4$ /Platte). Dann wurden die Zellen mit dem Konstrukt des olfaktorischen Rezeptors hOR17-4<sup>[24]</sup> unter Anwendung der Calciumphosphat-Fällungstechnik transfiziert.

HEK293-Imaging: Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch eine gepufferte Lösung (pH 7.4) ersetzt, die aus Ringer-Lösung und Fura-2-AM (3 µM, Molecular Probes) bestand. Die Platten wurden in der Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert (30 min), danach einmal mit einer Fura-2-AM-freien Lösung gewaschen und anschließend durch eine standar-

disierte Ringer-Lösung (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, pH 7.4) ersetzt, um das Ca<sup>2+</sup>-Imaging durchzuführen. Ca<sup>2+</sup>-Reaktionen von bis zu 50 HEK293-Zellen wurden in einem zufällig ausgewählten Bereich registriert und die Antworten als Verhältnis der integrierten Fluoreszenz ( $f_{340}/f_{380}$ ) über die Zeit dargestellt. Das Ca<sup>2+</sup>-Imaging wurde unter einem invertierten Zeiss-Mikroskop durchgeführt, das für ratiometrisches Imaging umgerüstet worden war.<sup>[24]</sup>

Spermenvorbereitung: Menschliches Sperma wurde frisch von jungen und gesunden Spendern erhalten. Für das Ca<sup>2+</sup>-Imaging wurde das Ejakulat nach seiner Verflüssigung (30 min bei 35.5°C) im Percoll-Dichtegradienten (Amersham Biosciences) zentrifugiert, um reife und bewegliche Spermien zu gewinnen. Kurz gesagt wurde verflüssigtes Ejakulat auf einen zweiphasigen Percoll-Gradienten aufgetragen, der aus zwei isotonischen Percoll-Lösungen (80 % und 55 %) in Hams F-10-Medium (Invitrogen) bestand. Nach dem Zentrifugieren (40 min, 500 g, Raumtemperatur) wurde das Pellet entnommen, in standardisierter Ringer-Lösung gewaschen (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose) und nochmals zentrifugiert (15 min).

Sperm-Imaging: Die Zeldichte wurde photometrisch auf eine Absorption von  $E_{260\text{nm}} = 0.035$  einjustiert. Das Sperma wurde 45 min bei 35.5°C in der Dunkelheit in einer gepufferten Lösung (pH 7.4) inkubiert, die aus Ringer-Lösung mit Fura-2-AM (7.5 µM) (Molecular Probes) sowie Pluronic F-127 (0.1 %) (Sigma) bestand. Danach wurde das Sperma zentrifugiert (15 min, 500 g) und das Pellet in Fura-2-AM-freier Pufferlösung erneut suspendiert. Die Suspension der reifen, beweglichen, Fura-2-AM-beladenen Spermatozoen (150 µL) wurde auf 35-mm-Platten aufgetragen, die mit Concanavalin A (Sigma) beschichtet waren (30 min, 35.5°C). Das Ca<sup>2+</sup>-Imaging wurde mit einem invertierten Zeiss-Mikroskop durchgeführt, das für ratiometrisches Imaging umgerüstet worden war.<sup>[23]</sup> Ca<sup>2+</sup>-Reaktionen wurden von bis zu 30 Spermatozoen in einem zufällig ausgewählten Bereich registriert und die Antworten als Verhältnis der integrierten Fluoreszenz ( $f_{340}/f_{380}$ ) über die Zeit dargestellt. Die Zugabe von Lilial (**1a**) (Givaudan SA, Vernier, Schweiz), Sila-Lilial (**1b**), Bourgeonal (**2a**) (Quest Intl., Naarden, Niederlande) und Sila-Bourgeonal (**2b**) wurde mit einem speziellen Mikrokapillar-Applikationssystem durchgeführt.<sup>[26]</sup> Nur komplette Spermatozoen mit intaktem Kopf- und Mittelsegment sowie beweglichen Schwänzen wurden in die Untersuchungen einbezogen.

Eingegangen am 11. Dezember 2006,  
veränderte Fassung am 12. Januar 2007  
Online veröffentlicht am 2. April 2007

**Stichwörter:** Molecular Modeling · Rezeptoren · Riechstoffe · Silicium · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

- [1] a) R. Axel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6264–6282; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6110–6127; b) L. B. Buck, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6283–6296; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6128–6140.
- [2] a) B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, L. B. Buck, *Cell* **1999**, *96*, 713–723; b) Z. Zou, L. B. Buck, *Science* **2006**, *311*, 1477–1481.
- [3] S. Zozulya, F. Echeverri, T. Nguyen, *Genome Biol.* **2001**, *2*, research0018.1–0018.12.
- [4] G. Fräter, J. A. Bajgrowicz, P. Kraft, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7633–7703.
- [5] P. Kraft, J. A. Bajgrowicz, C. Denis, G. Fräter, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3106–3138; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2980–3010.
- [6] Aktuelle Beispiele zur Strategie des C/Si-Austausches: Riechstoffe: a) T. Schmid, J. O. Daiss, R. Ilg, H. Surburg, R. Tacke, *Organometallics* **2003**, *22*, 4343–4346; b) M. W. Büttner, M. Penka, L. Doszczak, P. Kraft, R. Tacke, *Organometallics* **2007**, *26*, 1295–1298; Pharmaka: c) J. O. Daiss, C. Burschka, J. S. Mills,

- J. G. Montana, G. A. Showell, J. B. H. Warneck, R. Tacke, *Organometallics* **2006**, *25*, 1188–1198; d) R. Ilg, C. Burschka, D. Scheppman, B. Wünsch, R. Tacke, *Organometallics* **2006**, *25*, 5396–5408.
- [7] a) M. S. Singer, G. M. Shepherd, *NeuroReport* **1994**, *5*, 1297–1300; b) J. A. Bajgrowicz, C. Broger in *Proceedings of the 13th International Congress on Flavours, Fragrances and Essential Oils, Bd. 3* (Hrsg.: K. H. C. Baser), AREP, Istanbul, **1995**, S. 1–15.
- [8] K. Raming, J. Krieger, J. Strotmann, I. Boekhoff, S. Kubick, C. Baumstark, H. Breer, *Nature* **1993**, *361*, 353–356.
- [9] M. Spehr, G. Gisselmann, A. Poplawski, J. A. Riffell, C. H. Wetzel, R. K. Zimmer, H. Hatt, *Science* **2003**, *299*, 2054–2058.
- [10] V. Jacquier, H. Pick, H. Vogel, *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 537–544.
- [11] P. R. Gerber, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 37–51.
- [12] O. Man, Y. Gilad, D. Lancet, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 240–254.
- [13] P. C. Lai, M. S. Singer, C. J. Crasto, *Chem. Senses* **2005**, *30*, 781–792.
- [14] a) D. Enders, H. Dyker, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1107–1110; b) D. Bartschat, S. Börner, A. Mosandl, J. W. Bats, *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. A* **1997**, *205*, 76–79.
- [15] a) T. Mizoroki, K. Mori, A. Ozaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 581–581; b) R. F. Heck, J. P. Nolley, Jr., *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320–2322.
- [16] E. J. Corey, D. Enders, *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 1337–1361.
- [17] H. A. Clark, A. F. Gordon, C. W. Young, M. J. Hunter, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3798–3803.
- [18] R. G. Severson, R. J. Rosscup, D. R. Lindberg, R. D. Engbert, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6540–6542.
- [19] E. J. Corey, S. Knapp, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 3667–3668.
- [20] D. Enders, T. Hundertmark, R. Lazny, *Synlett* **1998**, 721–722.
- [21] P. Hummel, N. Vaidehi, W. B. Floriano, S. E. Hall, W. A. Goddard III, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 703–710.
- [22] C. Wellerdieck, M. Oles, L. Pott, S. Korschning, G. Gisselmann, H. Hatt, *Chem. Senses* **1997**, *22*, 467–476.
- [23] C. H. Wetzel, M. Oles, C. Wellerdieck, M. Kuczkowiak, G. Gisselmann, H. Hatt, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7426–7433.
- [24] C. H. Wetzel, H.-J. Behrendt, G. Gisselmann, K. F. Störtkuhl, B. Hovemann, H. Hatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9377–9380.
- [25] C. S. Sell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6402–6410; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6254–6261.
- [26] S. Naaby-Hansen, C. J. Flickinger, J. C. Herr, *Biol. Reprod.* **1997**, *56*, 771–787.