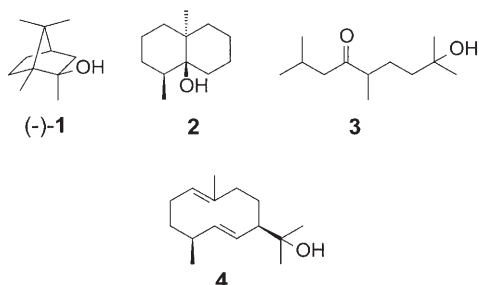


Biosynthese des Duftstoffes 2-Methylisoborneol durch das Myxobakterium *Nannocystis exedens***

Jeroen S. Dickschat, Thorben Nawrath, Verena Thiel, Brigitte Kunze, Rolf Müller und Stefan Schulz*

Bakterien werden im Allgemeinen hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Produktion von Duftstoffen in unserer Umwelt unterschätzt. Viele Bakterien produzieren jedoch Duftstoffe verschiedener Substanzklassen wie Fettsäurederivate, Aromaten, Stickstoff- und Schwefelverbindungen oder Terpene.^[1] Diese Geruchsstoffe haben eine wichtige ökologische Rolle, indem sie z. B. das Verhalten von Menschen oder anderen Organismen beeinflussen können. Myxobakterien und Streptomyceten emittieren komplexe Duftstoffbouquets,^[2–7] und insbesondere die häufig anzutreffenden moderig bzw. erdig riechenden Terpene 2-Methylisoborneol (**1**) und



Geosmin (**2**) weisen einen extrem niedrigen Geruchsschwellenwert auf. Die Verbindung **1**, ein Homomonoterpen, wurde erstmals in *Streptomyces lavendulae* identifiziert,^[8] und später auch in verschiedenen anderen Actinomyceten,^[6,9] Cyano-

bakterien,^[10] Pilzen^[11] und einem Lebermoos gefunden, in dem es in Form des (–)-Enantiomers auftritt.^[12]

Insbesondere Cyanobakterien können eine Kontamination von Süßwasser mit **1** hervorrufen, wodurch Schäden in der Fischwirtschaft verursacht werden können.^[13] Menschen empfinden Trinkwasser, das bereits niedrige Konzentrationen von **1** (10 ng L^{-1}) enthält, als ungenießbar.^[14] Derart niedrige Konzentrationen sind zwar nicht toxisch, allerdings führt der unangenehme Geruch zu psychosomatischen Wirkungen wie Kopfschmerzen, Magenverstimmungen oder Stress.^[15]

Interessanterweise haben alle bekannten Bakterien, die die weit verbreiteten Terpene **1** und **2** produzieren (d. h. Myxobakterien, Actinomyceten und Cyanobakterien), einen komplexen Lebenszyklus und bilden multizelluläre Formen.^[16] Das koordinierte Verhalten der einzelnen Zellen während der Bildung multizellulärer Strukturen verlangt Zell-Zell-Kommunikation, wie für das Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* gezeigt werden konnte, bei dem die Fruchtkörperbildung durch das flüchtige Pheromon Stigmatellon (**3**) initiiert wird.^[17] Die Terpene **1** und **2** sind möglicherweise ebenfalls an der bakteriellen Kommunikation beteiligt. Die Biosynthese des Sesquiterpenoids **2** wurde vor kurzem zunächst in Myxobakterien^[18] und dann in Streptomyceten^[19] aufgeklärt, wohingegen über die Biosynthese von **1** bislang sehr wenig bekannt war. Aufgrund früher Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen wurde vorgeschlagen, dass **1** ein methyliertes Monoterpen ist, in dem die zusätzliche Methylgruppe aus S-Adenosylmethionin (SAM) stammt.^[20] Wir berichten hier über die einzigartige Biosynthese von **1** im Myxobakterium *Nannocystis exedens* sowie über das Duftstoffprofil dieser Art.

Die Analyse von bakteriellen Duftstoffprofilen kann auf einfache Weise durchgeführt werden, indem die Duftkomponenten im Gasraum über Agarplattenkulturen gesammelt und anschließend per GC/MS analysiert werden.^[3] Biosynthesestudien sind mit wenigen mg von isotoopenmarkierten Vorstufen möglich, die dem Nährmedium zugesetzt werden.^[4] Die Duftstoffe von *N. exedens* (Na e485, Na eB37) und *N. exedens* subsp. *cinnabarina* (Na c29) wurden durch Anwendung dieser Technik analysiert. Die komplexen Bouquets sind aus bis zu 31 Komponenten zusammengesetzt (Hintergrundinformationen). Der Hauptbestandteil aller drei Stämme ist **1**, das von **2** und geringeren Mengen der biosynthetischen Vorstufe 1(10E,5E)-Germacradien-11-ol (**4**) begleitet wird. Weitere Komponenten sind Ester, Lactone, Aromaten, Terpene, von Fettsäuren abgeleitete Alkohole und Pyrazine. Insbesondere 2,5-Diisopropylpyrazin ist eine Hauptkomponente eines Stamms. Um die absolute Konfiguration von **1** aufzuklären, wurden beide

[*] Dr. J. S. Dickschat, Dipl.-Chem. T. Nawrath, Dipl.-Chem. V. Thiel, Prof. Dr. S. Schulz

Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-391-5272
E-Mail: stefan.schulz@tu-bs.de

Homepage: <http://www.aks7.org-chem.nat.tu-bs.de/>

Dr. B. Kunze
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig (Deutschland)

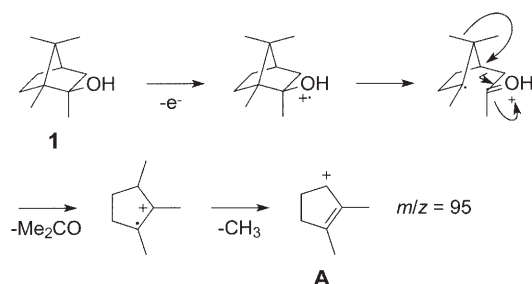
Dr. J. S. Dickschat, Prof. Dr. R. Müller
Institut für Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
Im Stadtwald, 66123 Saarbrücken (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch Stipendien des Verbandes der Chemischen Industrie und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina an J.S.D. unterstützt. Wir danken Birte Engelhardt (Braunschweig) für technische Unterstützung und Petra Holba-Schulz (Braunschweig) für die Aufnahme von NMR-Spektren.

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

Enantiomere aus D-(+)- bzw. L-(-)-Campher durch eine CeCl_3 -katalysierte Addition von MeMgCl synthetisiert (Hintergrundinformationen).^[21] Durch GC an einer chiralen stationären Phase konnte gezeigt werden, dass nur (-)-**1** von *N. exedens* abgegeben wird. Dies ist dasselbe Enantiomer wie in dem Lebermoos *Lophocolea heterophylla*,^[12] wohingegen die absolute Konfiguration von **1** in anderen Bakterien unbekannt ist.

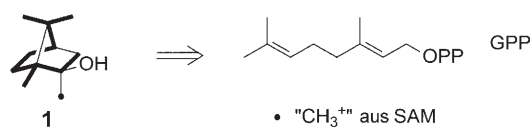
Die Biosynthese von **1** durch *N. exedens* wurde in Fütterungsexperimenten mit den markierten Vorstufen [*Methyl*- ^{13}C]Methionin und den Isotopomeren [4,4,6,6,6- $^2\text{H}_5$]- und [5,5,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton untersucht, die auf bekannten Wegen synthetisiert wurden.^[18,22] Die Methylgruppe von [*Methyl*- ^{13}C]Methionin wurde in **1** eingebaut, was durch ein um 1 amu erhöhtes Molekülion im Massenspektrum angezeigt wird (m/z 169, Abbildung 1B), wohingegen das Hauptfragmentation sowohl für unmarkiertes als auch ^{13}C -markiertes **1** bei m/z 95 detektiert wird (Einbauraten sind in den Hintergrundinformationen angegeben). Die massenspektrometrische Fragmentierung von **1** folgt der im Detail aufgeklärten Fragmentierung des verwandten Ketons Campher nach Weinberg und Djerassi.^[23] Das Fragment **A** (m/z 95, Schema 1) wird durch den Austritt von Aceton, das die zu-



Schema 1. Bildung des Hauptfragmentions **A** (m/z 95) im Massenspektrum von **1** in Anlehnung an die bekannte Fragmentierung von Campher.^[23]

sätzliche Methylgruppe enthält, und die folgende Abspaltung einer der übrigen Methylgruppen gebildet. Folglich stammt die 2-Methylgruppe wie bereits früher vorgeschlagen aus SAM.^[20] Es wurde angenommen, dass die übrigen zehn Kohlenstoffatome aus GPP (Geranylpyrophosphat, Schema 2) stammen, der universellen Monoterpenvorstufe.

Die Fütterung von [4,4,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton und der Einbau von zwei markierten Isopreneinheiten führt zu einem Molekülion von m/z 175, während der ursprüngliche Basispeak in die Fragmentionen m/z 99 und 102 aufspaltet (Abbildung 1C). Dies ist durch den Verlust von entweder CD_3 oder CH_3 erklärbar. Diese Daten stimmen mit dem Markierungsmuster und der Fragmentierung von [$^2\text{H}_7$]-**1** in Sche-



Schema 2. Bausteine in der Biosynthese von **1**.

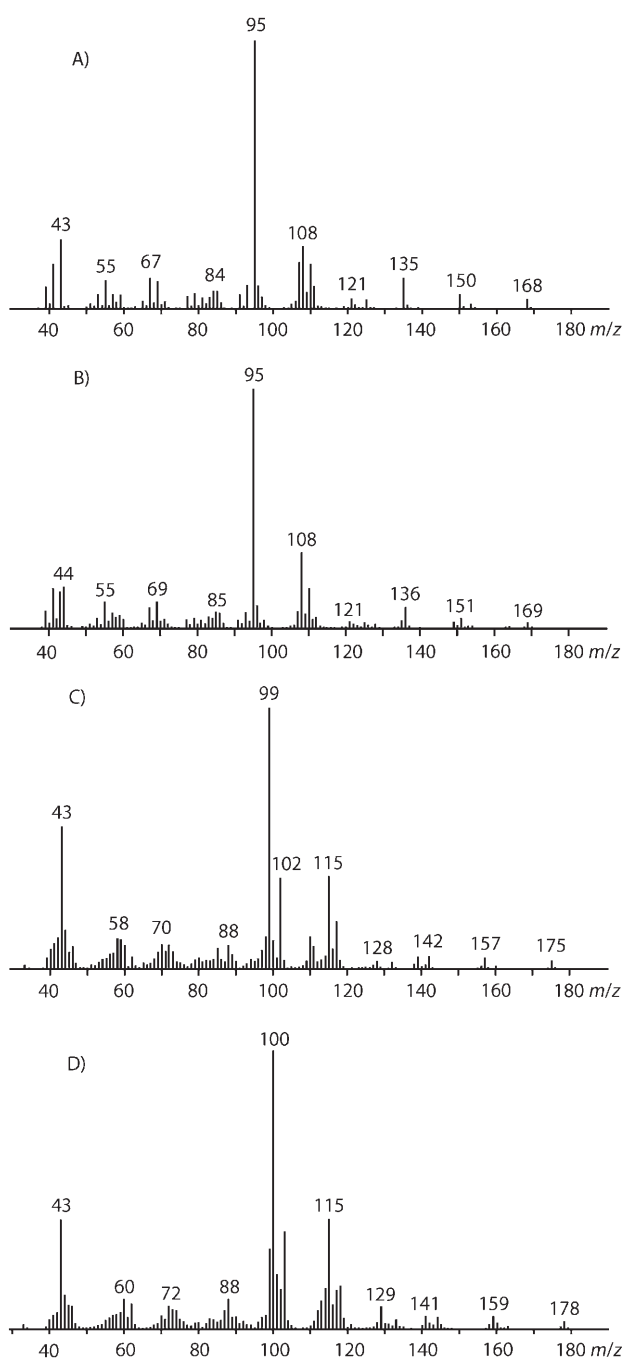
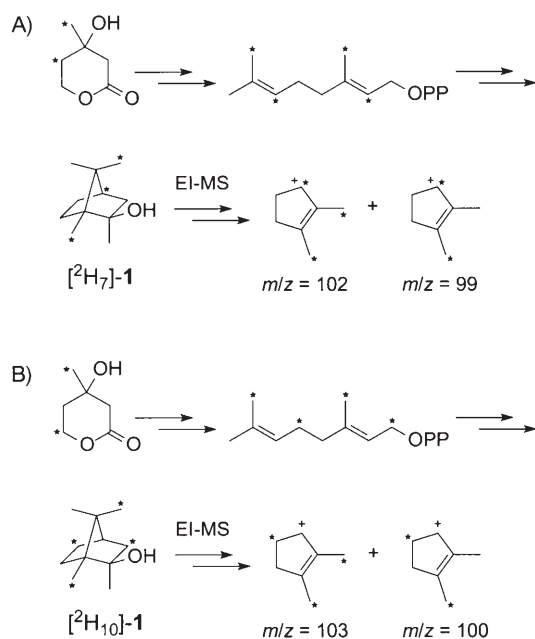


Abbildung 1. Massenspektren von A) **1**, B) [^{13}C]-**1** nach Fütterung von [*Methyl*- ^{13}C]Methionin, C) [$^2\text{H}_7$]-**1** nach Fütterung von [4,4,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton und D) [$^2\text{H}_{10}$]-**1** nach Fütterung von [5,5,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton.

ma 3A überein. Weiterhin wurden zwei gemeinsam eluierende Isotopomere mit lediglich einer markierten Isopreneinheit und Molekülionen von m/z 172 und 171 gefunden, bei denen einmal die erste und einmal die zweite Isopreneinheit in markierter Form vorliegen (Hintergrundinformationen).

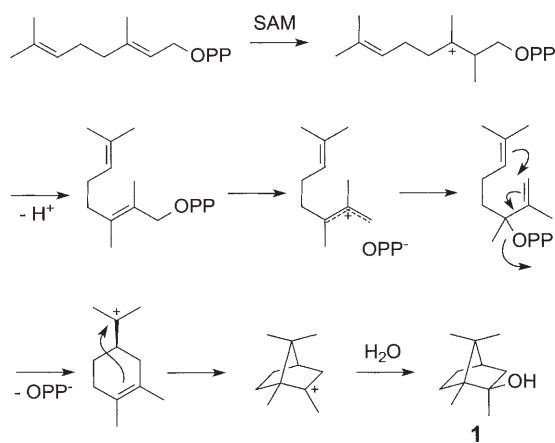
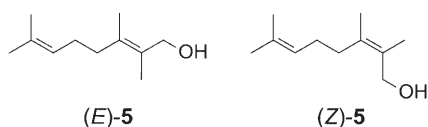
In einem weiteren Experiment wurde [5,5,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton an die Bakterien verfüttert. In diesem Fall ergab der Einbau von zwei markierten Isopreneinheiten ein Molekülion von m/z 178, während diagnostische Fragmentionen



Scheme 3. Markierungsmuster und Fragmentierung von A) [$^2\text{H}_7$]-**1** nach Fütterung von [4,4,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton und B) von [$^2\text{H}_{10}$]-**1** nach Fütterung von [5,5,6,6,6- $^2\text{H}_5$]Mevalonolacton.

bei m/z 100 und 103 gefunden wurden (Abbildung 1D). Die Fragmentierung von [$^2\text{H}_{10}$]-**1** und das in Schema 3B gezeigte Markierungsmuster sind mit diesen Daten konsistent. Zwei von nur einer markierten Isopreneinheit abgeleitete Isotopomere eluieren gemeinsam und weisen beide ein Moleküllon von m/z 173 auf (Hintergrundinformationen).

Da SAM normalerweise als Elektrophil fungiert, kann es Doppelbindungen angreifen, wie beispielsweise in der Biosynthese von Cyclopropyl-Fettsäuren.^[24] Die Cyclisierung von Terpenvorstufen wie GPP oder Farnesylpyrophosphat erfolgt über kationische Intermediate,^[25] die nicht durch Elektrophile angegriffen werden können, sodass die Methylierung entweder vor oder nach der Cyclisierung stattfinden muss. Die Alkoholfunktion von **1** kann durch den abschließenden Angriff von Wasser auf ein spätes kationisches Intermediat eingeführt werden. Wenn jedoch Monoterpenalkohole wie Borneol oder Isoborneol einmal gebildet worden sind, ist ihre C-Methylierung durch SAM nahezu unmöglich. Folglich muss der elektrophile Angriff einer Doppelbindung vor dem Cyclisierungsschritt erfolgen, wobei GPP zu β -Methylgeranylpyrophosphat (β -Methyl-GPP) methyliert wird (Schema 4). Die Methylierung eines früheren Intermediates wie Dimethylallylpyrophosphat ist unwahrscheinlich, da das hypothetische Intermediat Trimethylallylpyrophosphat nicht als Vorstufe für β -Methyl-GPP dienen kann. Andere denkbare Biosynthesewege zu **1** können aufgrund des beobachteten Markierungsmusters ausgeschlossen werden.



Scheme 4. Biosynthese von **1** im Myxobakterium *Nannocystis exedens*.

Die Biosynthese von **1** durch Methylierung von GPP wurde weiterhin durch die Identifizierung von β -Methylgeraniol (**5**), dem Hydrolyseprodukt von β -Methyl-GPP, in der Duftstoffmischung von *N. exedens* bestätigt. Sowohl (*E*)- als auch (*Z*)-**5** wurden durch eine Horner-Wittig-Reaktion von 6-Methylhept-5-en-2-on mit Triethyl-2-phosphonopropionat synthetisiert (Hintergrundinformationen). Durch einen Vergleich der GC-Retentionsindizes und Massenspektren wurde der natürliche Duftstoff als (*E*)-**5** identifiziert. Dies ist höchstwahrscheinlich das Hydrolyseprodukt von (*E*)- β -Methyl-GPP, das intrazellulär durch die enzymatische Methylierung von GPP gebildet wird. Diese Schlussfolgerung wird weiterhin durch den Einbau von [$\text{Methyl-}^{13}\text{C}$]Methionin in (*E*)-**5** gestützt (Hintergrundinformationen). In Übereinstimmung mit der beschriebenen Isomerisierung von GPP während der Biosynthese von Monoterpenen^[25] kann (*E*)- β -Methyl-GPP vor der Cyclisierung zu **1** zunächst zu β -Methylallylpyrophosphat isomerisiert werden (Schema 4).

Unseres Wissens ist der beschriebene Biosyntheseweg einzigartig, da eine Methylierung der universellen Monoterpen-Vorstufe GPP bis heute nicht beschrieben worden ist. Diese Abweichung vom Lehrbuchwissen über die Terpenbiosynthese weist außerdem auf eine mögliche Rolle von **1** in der bakteriellen Kommunikation hin, da die Methylierung einen einzigartigen Biosyntheseweg ausmacht, der streng reguliert werden kann. Diese Hypothese wird gegenwärtig in unseren Laboratorien untersucht.

Zusammenfassend wurden die Duftstoffe analysiert, die von drei Stämmen des Myxobakteriums *N. exedens* emittiert werden. Die faszinierende Biosynthese der Hauptkomponente **1** wurde in klassischen Fütterungsstudien mit markierten Vorstufen aufgeklärt. Die Biosynthese verläuft über die Methylierung von GPP zum neuartigen Biosyntheseintermediat β -Methyl-GPP und dessen anschließende Cyclisierung zu **1**.

Eingegangen am 8. Juni 2007

Online veröffentlicht am 26. September 2007

Stichwörter: Biosynthese · Duftstoffe · Massenspektrometrie · Myxobakterien · Terpene

- [1] S. Schulz, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 814.
- [2] N. N. Gerber, *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **1979**, *7*, 191.
- [3] S. Schulz, J. Fuhlendorff, H. Reichenbach, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3863.
- [4] J. S. Dickschat, S. C. Wenzel, H. B. Bode, R. Müller, S. Schulz, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 778.
- [5] J. S. Dickschat, H. Reichenbach, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4141.
- [6] J. S. Dickschat, T. Martens, T. Brinkhoff, M. Simon, S. Schulz, *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 837.
- [7] J. S. Dickschat, H. B. Bode, S. C. Wenzel, R. Müller, S. Schulz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2023.
- [8] N. N. Gerber, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 508.
- [9] C. E. G. Schöller, H. Gürtler, R. Pedersen, S. Molin, K. Wilkins, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2615.
- [10] M. R. Tellez, K. K. Schrader, M. Kobaisy, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5989.
- [11] D. R. Fravel, W. J. Connick, C. C. Grimm, S. W. Lloyd, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3761.
- [12] M. Toyota, Y. Asakawa, J. P. Frahm, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2334.
- [13] K. K. Schrader, M. E. Dennis, *Water Res.* **2005**, *39*, 2807.
- [14] P. Persson, *Water Sci. Technol.* **1983**, *15*, 1.
- [15] W. F. Young, H. Horth, R. Crane, T. Ogden, M. Arnott, *Water Res.* **1996**, *30*, 331.
- [16] a) D. Kaiser, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 75; b) D. Claessen, W. de Jong, L. Dijkhuizen, H. A. B. Wösten, *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 313; c) C. P. Wolk, A. Ernst, J. Elhai in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Hrsg.: D. A. Bryant), Kluwer, Dordrecht, **1994**, S. 769–823.
- [17] a) W. Plaga, I. Stamm, H. U. Schairer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11263; b) W. E. Hull, A. Berkessel, W. Plaga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11268.
- [18] J. S. Dickschat, H. B. Bode, T. Mahmud, R. Müller, S. Schulz, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5174.
- [19] a) X. F. He, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2678; b) J. Y. Jiang, X. F. He, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8128.
- [20] R. Bentley, R. Meganathan, *FEBS Lett.* **1981**, *125*, 220.
- [21] V. Dimitrov, K. Kostova, M. Genov, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6787.
- [22] A. I. Scott, K. Shishido, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 400.
- [23] D. S. Weinberg, C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 115.
- [24] B. S. Moore, H. G. Floss in *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1* (Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, K. Mori), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 61–82.
- [25] D. E. Cane in *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 2* (Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, D. E. Cane), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 97–153.