

Eine Nahaufnahme der 2-Methylisoborneol-Biosynthese**

Nelson L. Brock, Srinivasa R. Ravella, Stefan Schulz* und Jeroen S. Dickschat*

Ein unangenehmer erdiger oder moderiger Geruch im Trinkwasser hat schon oft zu Beschwerden seitens der Konsumenten über die Trinkwasserqualität geführt. Dieser unerwünschte Geruch kann für gewöhnlich mit Cyanobakterienblüten in Reservoirs korreliert werden^[1] und ist hauptsächlich in der bakteriellen Produktion von 2-Methylisoborneol (2-MIB, **1**) und Geosmin (**2**) begründet (Abbildung 1). Beide Verbindungen können vom Menschen in pikomolaren Kon-

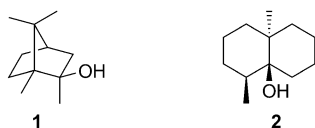


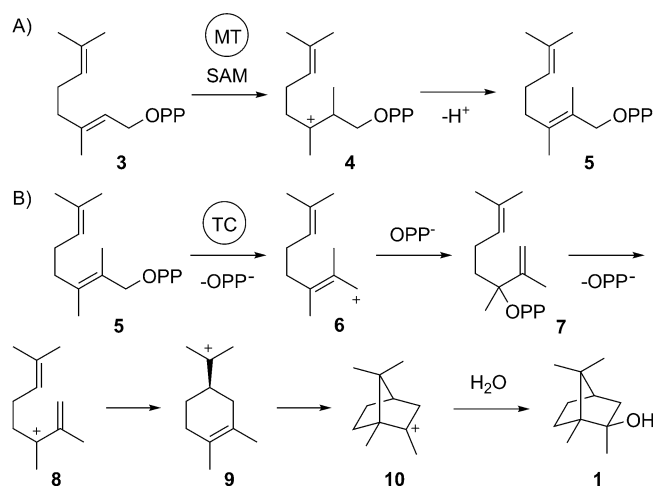
Abbildung 1. Strukturen von 2-MIB (**1**) und Geosmin (**2**).

zentrationen wahrgenommen werden.^[2,3] Obwohl diese Moleküle für den Menschen in den geringen Konzentrationen wie sie im Trinkwasser vorkommen nicht toxisch sind, vermuten Verbraucher oft fälschlich, dass das kontaminierte Trinkwasser ungenießbar sei. Daher müssen diese Verunreinigungen durch eine teure Aufbereitung mit UV-Bestrahlung in Kombination mit einer Ozonbehandlung^[4,5] oder durch Behandlung mit Aktivkohle entfernt werden.^[6] Die weite Verbreitung zusammen mit den unangenehmen Eigenschaften sowie die in beiden Fällen mechanistisch sehr ungewöhnlichen Biosynthesen machen beide Terpenoide zu interessanten Studienobjekten.

2-MIB und Geosmin treten in diversen bakteriellen Phyla auf.^[7–12] 2-MIB ist ein methyliertes Monoterpen, wohingegen Geosmin ein abgebautes Sesquiterpen (C₁₂) darstellt,^[13] allerdings blieben die Details der Biosynthesen lange Zeit obskur und waren Gegenstand jahrzehntelanger kontroverser Diskussionen. Die Biosynthese von Geosmin wurde durch Fütterungsexperimente mit isotoopenmarkierten Vorstufen aufgeklärt,^[14] gefolgt von der Identifizierung der Geosmin-

Synthase^[15] und einer Charakterisierung ihrer Nebenprodukte.^[16,17] Die Identifizierung der Nebenprodukte war von besonderer Bedeutung, da dadurch indirekte Beweise für die Existenz der vorgeschlagenen kationischen Intermediate in der Cyclisierungskaskade erhalten wurden.

Die Biosynthese von 2-MIB wurde ebenfalls zuerst auf Grundlage von Fütterungsexperimenten mit deuterierten Isotopomeren des Mevalonolactons und mit [*methyl*-¹³C]Methionin im Myxobakterium *Nannocystis exedens* etabliert und beinhaltet einen Mechanismus über *S*-Adenosylmethionin-abhängige (SAM) Methylierung von Geranyldiphosphat (GPP) gefolgt von Cyclisierung zu 2-MIB (Schema 1).^[10] In der Folge wurden eine GPP-C-Methyl-



Schema 1. Biosynthese von 2-MIB. A) Methylierung von GPP durch die SAM-abhängige GPP-C-Methyltransferase (MT). B) Cyclisierung von (*E*)-2-Methylgeranyldiphosphat (**5**) durch die 2-MIB-Synthase (TC).

transferase (MT) und eine 2-MIB-Synthase, eine ungewöhnliche bakterielle Terpenocyclase (TC) identifiziert.^[18,19] Wir berichten nun über die Entdeckung einer Serie homoterpener Nebenprodukte, die die vorgeschlagenen kationischen Intermediate auf dem Weg zu 2-MIB bestätigen. Detaillierte mechanistische Einblicke in die Terpenocyclisierung wurden durch Fütterungsstudien mit deuterierten und ¹³C-markierten Verbindungen erhalten. Eine hochempfindliche analytische Methode für Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Verbindungen wurde entwickelt, die eine Substanzreinigung vermeidet.

In der 2-MIB-Biosynthese wird das Produkt der Methylierung von GPP, (*E*)-2-Methylgeranyldiphosphat (**5**), über eine Serie kationischer Intermediate cyclisiert (Schema 1).^[10] Die Sequenz beinhaltet eine Isomerisierung zu 2-Methylalinyldiphosphat (**7**) über das 2-Methylgeranyl-Kation (**6**).

[*] N. L. Brock, S. R. Ravella, Prof. Dr. S. Schulz, 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 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft mit einem Emmy-Noether-Stipendium (an J.S.D., DI1536/1-2) und im Projekt „Duftstoffe aus Actinomyceten“ (DI1536/2-1) sowie durch den Fonds der Chemischen Industrie mit einem Promotionsstipendium (an N.L.B.) gefördert. Wir danken Bertolt Gust und Lutz Heide (Tübingen) für *S. lividans* TK 24, Hans-Peter Fiedler (Tübingen) für *S. violaceusniger* Tü 4113 und dem US Department of Agriculture für *S. scabiei* 87.22.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201209173> zu finden.

Reionisierung von **7** zum 2-Methylallyl-Kation (**8**) ermöglicht den Ringschluss zum 2-Methylterpinyl-Kation (**9**) gefolgt von einer Cyclisierung zum 2-Methylbornyl-Kation (**10**) und Abfangen mit Wasser zu 2-MIB.

Die von Bakterien abgegebenen Duftstoffe können mithilfe eines „Closed-Loop-Stripping“-Apparates (CLSA) in Kombination mit GC-MS analysiert werden.^[20] Wir haben diese Technik jüngst zur Analyse diverser Actinomyceten mit sequenzierten Genomen angewendet.^[21,22] Dabei wurde eine Reihe von Verbindungen mit den Molekülonen m/z 150 (Homomonoterpene) oder m/z 168 (Homomonoterpene-Alkohole) in Actinomyceten detektiert, von denen bekannt war, dass sie die Gene für die 2-MIB-Biosynthese besitzen, was die Bildung der unbekannten Verbindungen über diese Biosynthesemaschinerie nahe legte. Einer der Homomonoterpene-Alkohole, 2-Methylgeraniol (**11**, Abbildung 2), war zuvor

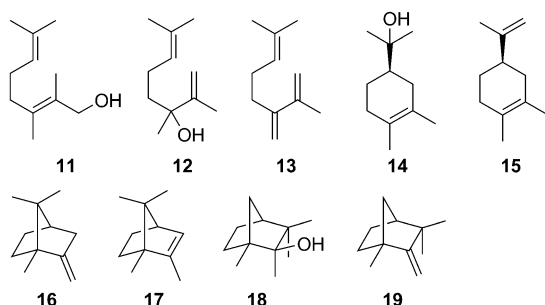


Abbildung 2. Nebenprodukte der 2-MIB-Biosynthese.

schon in *N. exedens* gefunden worden. Dessen Identifizierung war für ein Verständnis der 2-MIB-Biosynthese sehr wichtig, da dadurch eine Methylierung vor der Cyclisierung sowie die Existenz des Kations **6**, aus dem der Alkohol durch Abfangen mit Wasser hervorgeht, bewiesen waren. Die Homomonoterpene **11**, 2-Methylenbornan (**16**) und 1-Methylcamphen (**19**) sind bekannte Produkte einer zur 2-MIB-Synthese hoch homologen Terpen cyclase aus *Pseudomonas fluorescens* PfO-1.^[23] Die Verbindungen **16**, **17** und **19** sind außerdem bereits durch Dehydratisierung aus 2-MIB erhalten worden.^[24]

Für eine Serie zuvor nichtidentifizierter Homoterpene wurden Strukturvorschläge aus ihren Massenspektren durch Vergleich zu regulären Monoterpenen abgeleitet (Abbildung 3). Die Massenspektren der unbekannten Verbindungen zeigten charakteristische Fragmentationen, die um vierzehn Masseneinheiten verschoben sind (fette Linien). Zusammen mit biosynthetischen Überlegungen führte dies zu den Strukturvorschlägen von 2-Methylallyl-ol (**12**), 2-Methylmyrcen (**13**), 2-Methyl- α -terpineol (**14**), 2-Methyllimonen (**15**) und 2-Methyl- β -fenchol (**18**). Weiterhin zeigen die Massenspektren von **14** und α -Terpineol ein Fragmentation bei m/z 59, das eine 2-Hydroxypropan-2-yl-Gruppe anzeigt. Besonders auffällig waren auch das Signal für das durch Retro-Diels-Alder-Fragmentierung entstehende Fragmentation im Massenspektrum von **15** bei m/z 82 (Limonen: m/z 68) und die dominierenden Basispeak-Ionen in den Massenspektren von α -Fenchol und **18** (m/z 81), die aus den jeweils linken Molekülhälften hervorgehen.

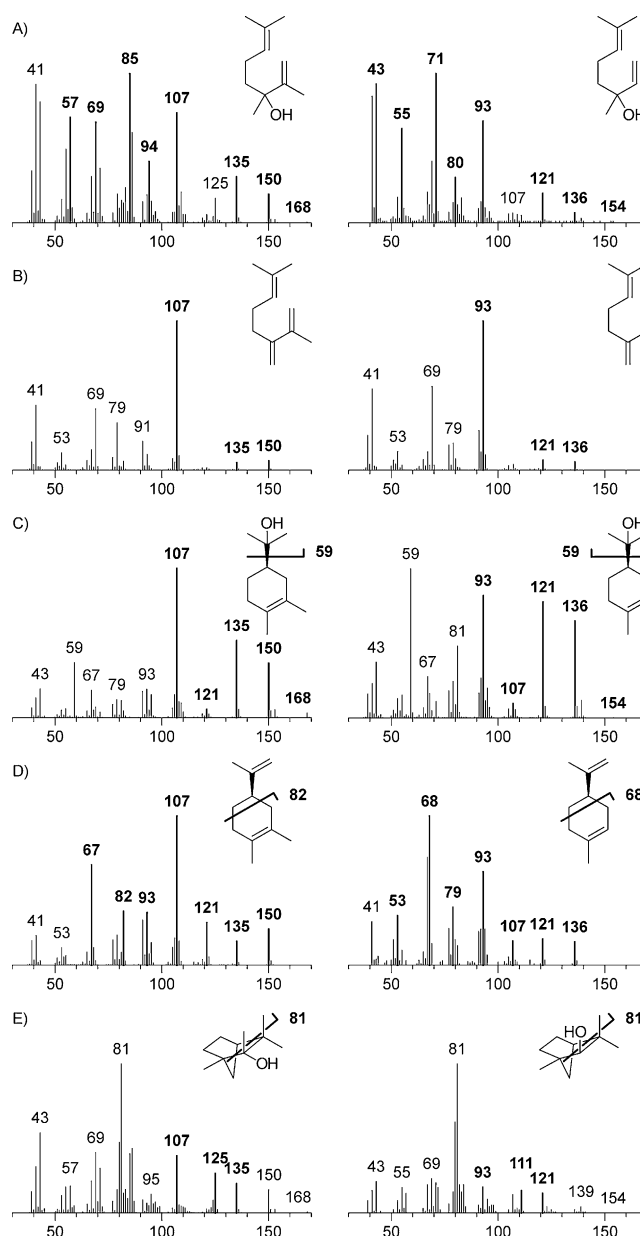


Abbildung 3. Massenspektren der Homomonoterpene im Vergleich zu nichtmethylierten Analoga. A) **12** und Linalool, B) **13** und Myrcen, C) **14** und α -Terpineol, D) **15** und Limonen, E) **18** und α -Fenchol.

Um einen Beweis für die Strukturvorschläge zu erhalten, wurde eine Synthese jeder Verbindung durchgeführt (Schema S1 in den Hintergrundinformationen). Vergleiche der Massenspektren und GC-Retentionszeiten der synthetischen mit denen der natürlichen Verbindungen bestätigten die Strukturen der fünf Substanzen **12–15** und **18**, die allesamt bisher noch nicht beschriebene Naturstoffe sind. Eine erneute Analyse der „Headspace“-Extrakte von fünfzehn Actinomyceten^[21,22] zeigte, dass mit Ausnahme von *Streptomyces ambifaciens* alle Stämme **16** abgeben (Tabelle S1). Die Verbindungen **17** und **19** wurden ebenfalls von diversen Actinomyceten produziert, wohingegen die Homomonoterpene **12–15** und **18** in artspezifischen Mustern auftraten. Die Identifizierung dieser Duftstoffe in 2-MIB-produzierenden



Schema 2. Bildung von Homomonoterpenen durch die 2-MIB-Synthese. Von SAM abgeleitete Methylgruppen sind mit schwarzen Kreisen markiert.

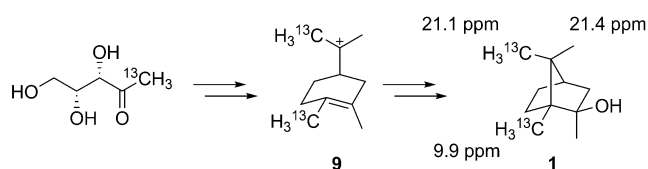
Bakterien ist besonders interessant, da diese aus kationischen Intermediaten auf dem Weg zu 2-MIB hervorgehen und so die Existenz der Intermediate belegen (Schema 2 A).

Die Bildung von **18** und **19** erweitert den Biosyntheseweg zu 2-MIB und erfordert eine zusätzliche Wagner-Meerwein-Umlagerung. Zwei Mechanismen für die Bildung dieser Verbindungen sind möglich. Eine Umlagerung von **10** (Weg b in Schema 2A) würde das Kation **20** ergeben, das die Vorstufe von **18** durch Angriff von Wasser oder von **19** durch Deprotonierung ist. Der Angriff von Wasser an **10** bei der Bildung von 2-MIB und an **20** bei der Bildung von **18** beinhaltet wahrscheinlich dasselbe Wassermolekül und sollte

aus derselben Richtung erfolgen und daher β -**18** ergeben. Ein alternativer Mechanismus für die Bildung von **18** und **19** analog zur Cyclisierung von GPP zu α -Fenchol durch die Fenchol-Synthase aus *Foenicum vulgare*^[25] beginnt bei Kation **9**, das zum 1-Methylpinyl-Kation **21** cyclisiert werden kann, gefolgt von einer Umlagerung zu **20** (Schema 2 B). In diesem Fall sollte der Angriff von Wasser von der *Si*-Seite von **20** her erfolgen und in α -**18** münden, das jedoch nicht gefunden wurde. Obwohl die Strukturen der Kationen **20** in Schema 2 A und B dieselben sind, hat das Kohlenstoffgerüst in den beiden Fällen einen unterschiedlichen biosynthetischen Ursprung, was zum Beispiel anhand der SAM-abgeleiteten Methylgruppen (schwarze Kreise) verfolgt werden kann. Nach Mechanismus A sollte eine Fütterung von [*methyl*-²H₃]Methionin in einem Verlust eines Protons in der Bildung von **19** aus **20** resultieren, wohingegen nach Mechanismus B ein Deuterium verloren werden müsste. Das Fütterungsexperiment zeigte die Bildung von **19** über Mechanismus A (Abbildung S2).

Ein komplementäres Experiment wurde durchgeführt, um den relevanten Biosyntheseweg zu **18** zu identifizieren. Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]-1\text{-Desoxy-D-xylulose}$ (synthetisiert nach Schema S2 der Hintergrundinformationen)^[26,27] resultierte in $[^{13}\text{C}_2]-\mathbf{18}$ (Abbildung S3). Das Basispeak-Ion der markierten Verbindung wurde bei m/z 81 beobachtet, wodurch der Ursprung der 2-Methylgruppe und einer der beiden geminalen 3-Methylgruppen aus C1 von 1-Desoxy-D-xylulose angezeigt wird, wohingegen die 1-Methylgruppe aus SAM stammen muss. Dies deutet ebenfalls auf Mechanismus A, wohingegen Mechanismus B ein Basispeak-Ion bei m/z 82 erfordern würde. Der Weg B wird allerdings möglicherweise beschritten, wenn GPP durch die 2-MIB-Synthase in vitro umgesetzt wird. Es wurde berichtet, dass eine solche Umsetzung von GPP zu Limonen, γ -Terpinen, α - und β -Pinen führt,^[19] die aus den Desmethyl-Analoga von **9** und **21** hervorgehen (fehlende SAM-abgeleitete Methylgruppen). Bornen, das Deprotonierungsprodukt des Desmethyl-Analogons von Kation **10**, wurde nicht beobachtet. Solch ein Analogon von **10** wird wahrscheinlich nicht gebildet, da es ein wenig stabiles sekundäres Kation repräsentiert. Die initiale Methylierung von GPP ist für eine effiziente Bildung des 2-MIB-Gerüsts über das tertiäre Kation **10** wichtig, wodurch der Biosyntheseweg zu 2-MIB potenziell effizienter ist als der vergleichbare Weg zu Bornyldiphosphat in *Salvia officinalis*.^[28]

Duftstoffextrakte von *Micromonospora olivasterospora* beinhalten große Mengen von 2-MIB, aber nur wenig andere Verbindungen. Dieser Stamm wurde für Untersuchungen zum stereochemischen Verlauf der 2-MIB-Cyclisierung in Fütterungsexperimenten mit $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-1-Desoxy-D-xylulose}$ ausgewählt. Diese Verbindung wird zum doppelt markierten Kation **9** umgesetzt (Schema 3). Der abschließende Ringschluss kann selektiv von der *Re*-Seite des kationischen Zentrums oder von beiden Seiten aus erfolgen, wenn eine Rotation der Isopropylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms sterisch möglich und schneller als die Reaktion zu **10** ist. Die Gesamtmenge an flüchtigem Material, das per CLSA von einer Agarplatte gesammelt werden kann, ist für eine NMR-spektroskopische Analyse nicht ausreichend. Wenn



Schema 3. Stereochemischer Verlauf der 2-MIB-Biosynthese und ^{13}C -NMR-Verschiebungen der Methylgruppen in **1**.

aber eine ^{13}C -markierte Vorstufe verfüttert und effizient in einen Naturstoff eingebaut würde, könnte eine Analyse mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie wertvolle Einblicke geben. Eine Untersuchung der Duftstoffextrakte von *M. olivasterospora* nach Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]\text{-1-Desoxy-D-xylulose}$ per GC-MS zeigte die Produktion von 2-MIB (64% des gesamten flüchtigen Materials durch Peakintegration des Totalionenstrom-Chromatogramms), 2-Methylenbornan (10%), Geosmin (6%) und (8*S*,10*S*)-8,10-Dimethyl-1-octalin (**22**, 1%) mit hohen Einbauraten (ca. 75%) für alle vier Verbindungen (Abbildung 4 A). Eine ^{13}C -NMR-spektroskopische Analyse

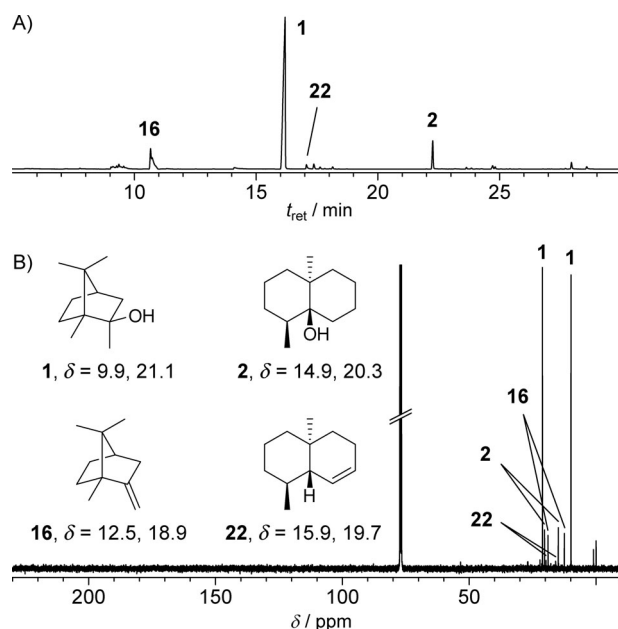


Abbildung 4. Analyse der Duftstoffextrakte von *M. olivasterospora* per A) GC-MS und B) ^{13}C -NMR-Spektroskopie nach Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]\text{-1-Desoxy-D-xylulose}$.

zeigte Signale bei 9.9 und 21.1 ppm (Abbildung 4B). Vergleiche mit den vollständig zugeordneten NMR-Daten für 2-MIB (siehe die Hintergrundinformationen) stützen eine Cyclisierung von **9** zu **10** mit spezifischem Angriff des kationischen Zentrums von der *Re*-Seite. Das Signal bei 21.4 ppm war nicht detektierbar, wodurch die hohe Genauigkeit des Cyclisierungsschrittes demonstriert wird. Diese strikte Kontrolle des stereochemischen Verlaufs ist vermutlich das Ergebnis einer Kation- π -Wechselwirkung von **9** mit einem hochkonservierten Phenylalaninrest (F309, Abbildung S4) im aktiven Zentrum der 2-MIB-Synthase (Abbildung 5).^[29]

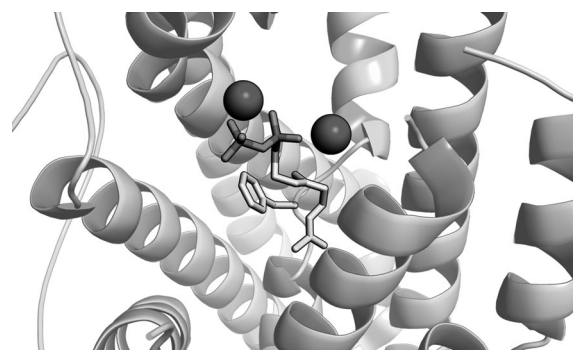


Abbildung 5. Aktives Zentrum der 2-MIB-Synthase aus *S. coelicolor* A2(3) komplexiert mit Mg^{2+} und dem Substratanalogon Geranyl-S-thioiodophosphat (PDB-Nummer: 3V1V).^[29] Der an Kation- π -Wechselwirkungen beteiligte hochkonservierte Phenylalaninrest (F309) ist ebenfalls dargestellt.

Weitere ^{13}C -NMR-Signale wurden bei 12.5/19.0, 14.9/20.3 und 15.9/19.7 ppm beobachtet und stehen für den Einbau in 2-Methylenbornan,^[30] Geosmin^[31] und (8*S*,10*S*)-8,10-Dimethyl-1-octalin.^[16]

Zusammenfassend läuft die 2-MIB-Biosynthese über kationische Intermediate ab, die indirekt durch die Bildung von Nebenprodukten beobachtbar werden. Fütterungsexperimente ermöglichen die Unterscheidung von zwei möglichen Wegen zu umgelagerten Nebenprodukten und zeigen, dass die Kationen im aktiven Zentrum des Enzyms in ihrer Konformation durch Kation- π -Wechselwirkungen mit einem hochkonservierten Phenylalaninrest fixiert sind. Eine neue Methode wurde etabliert, die die CLSA-Technik mit Fütterungen von ^{13}C -markierten Vorstufen und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen der erhaltenen Extrakte kombiniert. Vorteile sind die Vermeidung von Extraktionen mit Lösungsmitteln und arbeitsaufwendigen Substanzenreinigungen.

Eingegangen am 15. November 2012
Online veröffentlicht am 11. Januar 2013

Stichwörter: 2-Methylisoborneol · Biosynthesen · Duftstoffe · Stereochemie · Terpene

- [1] G. Izaguirre, C. J. Hwang, S. W. Krasner, M. J. McGuire, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, 43, 708–714.
- [2] B. Ceas, J. Zoeteman, G. J. Piet, *Sci. Total Environ.* **1974**, 3, 103–115.
- [3] P.-E. Persson, *Aqua Fenn.* **1979**, 9, 48–52.
- [4] K. Kutschera, H. Börnick, E. Worch, *Water Res.* **2009**, 43, 2224–2232.
- [5] F. Qi, B. Xu, Z. Chen, J. Ma, D. Sun, L. Zhang, *Water Environ. Res.* **2009**, 81, 2411–2419.
- [6] D. Cook, G. Newcombe, P. Sztajnbock, *Water Res.* **2001**, 35, 1325–1333.
- [7] L. L. Medsker, D. Jenkins, J. F. Thomas, C. Koch, *Environ. Sci. Technol.* **1969**, 3, 476–477.
- [8] N. N. Gerber, *J. Antibiot.* **1969**, 22, 508–509.
- [9] N. N. Gerber, H. A. Lechevalier, *Appl. Microbiol.* **1965**, 13, 935–938.

- [10] J. S. Dickschat, T. Nawrath, V. Thiel, B. Kunze, R. Müller, S. Schulz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8436–8439; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8287–8290.
- [11] J. S. Dickschat, S. C. Wenzel, H. B. Bode, R. Müller, S. Schulz, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 778–787.
- [12] S. Schulz, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 814–842.
- [13] R. Bentley, R. Meganathan, *FEBS Lett.* **1981**, *125*, 220–222.
- [14] J. S. Dickschat, H. B. Bode, T. Mahmud, R. Müller, S. Schulz, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5174–5182.
- [15] J. Jiang, X. He, D. E. Cane, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 711–715.
- [16] T. Nawrath, J. S. Dickschat, R. Müller, J. Jiang, D. E. Cane, S. Schulz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 430–431.
- [17] J. Jiang, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 428–429.
- [18] M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7422–7427.
- [19] C.-M. Wang, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8908–8909.
- [20] S. Schulz, J. Fuhlendorff, H. Reichenbach, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3863–3872.
- [21] C. A. Citron, J. Gleitzmann, G. Laurenzano, R. Pukall, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 202–214.
- [22] C. A. Citron, P. Rabe, J. S. Dickschat, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1765–1776.
- [23] W. K. W. Chou, H. Ikeda, D. E. Cane, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6627–6632.
- [24] R. Schumann, P. Pendleton, *Water Res.* **1997**, *31*, 1243–1246.
- [25] R. Croteau, J. Shaskus, D. E. Cane, A. Saito, C. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1142–1143.
- [26] J.-L. Giner, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2479–2482.
- [27] C. A. Citron, N. L. Brock, P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4129–4133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4053–4057.
- [28] D. A. Whittington, M. L. Wise, M. Urbansky, R. M. Coates, R. B. Croteau, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15375–15380.
- [29] M. Köksal, W. K. W. Chou, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2012**, *51*, 3011–3020.
- [30] M. K. Tse, M. Klawonn, S. Bhor, C. Döbler, G. Anilkumar, H. Hugl, W. Mägerlein, M. Beller, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 987–990.
- [31] N. N. Gerber, D. Z. Denney, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 2025–2027.