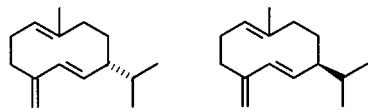


Biosynthese von (+)- und (-)-Germacren D in *Solidago canadensis*: Isolierung und Charakterisierung zweier enantioselektiver Germacren-D-Synthasen^{**}

Claus O. Schmidt, Harro J. Bouwmeester,*
Jan-Willem de Kraker und Wilfried A. König*

Sesquiterpene werden sowohl von Pflanzen als auch von Pilzen, Bakterien und marinen Organismen synthetisiert.^[1] Große Bedeutung als Duftstoffe^[2] haben vor allem ihre oxygenierten Produkte, die aber auch als Antibiotika,^[3] als Insektenabwehrstoffe und Pheromone^[4, 5] sowie gegen bakterielle Infektionen^[6] wirken können. Die Biosynthese der Sesquiterpene erfolgt durch Cyclisierung von Farnesyldiphosphat (FPP) mit Synthasen (Cyclasen).^[7] Viele Sesquiterpene sind chiral, und Pflanzen bilden gewöhnlich nur eines der beiden Enantiomere; es gibt allerdings auch Fälle, in denen eine Pflanze beide Enantiomere eines Sesquiterpens enthält.^[8] Germacren D **1** wird als ein wichtiges Zwischenprodukt der Biosynthese von Sesquiterpenen angesehen.^[9] Während die meisten höheren Pflanzen nur (-)-Germacren D **1b**

**1a****1b**

produzieren, findet man im ätherischen Öl mehrerer *Solidago*-Arten^[10, 11] (+)-Germacren D **1a** und (-)-Germacren D **1b** in ähnlichen Mengen. Oxygenierte Produkte von Germacren D lassen sich dagegen nicht nachweisen.

Wir wollten nun prüfen, ob an der Biosynthese von **1a** und **1b** in *S. canadensis* eine oder zwei unterschiedliche Synthasen beteiligt sind. Die Hauptkomponenten des ätherischen Öls von *S. canadensis* sind **1a** und **1b** und in vielen Fällen Cyclocolorenon **2**. Die Enantiomere **1a** und **1b** können durch

enantioselektive Gaschromatographie^[12] getrennt und quantifiziert werden (Abb. 1a). Zur Isolierung der Germacren-D-Synthasen wurde zunächst ein Enzymrohextrakt aus *S. canadensis* gewonnen. Die Inkubationsprodukte wurden durch Radio-

enzymatische Analyse (Abb. 1b–d) analysiert (Abb. 1b–d). Die Inkubationen des Enzymrohextraktes mit (*E,E*)-³H]FPP lieferten vier Hauptprodukte: enantiomerenreines (-)- α -Gurjunen **3**, **1a**, **1b** und (*E,E*)-Farnesol **4** (Abb. 1b). Da α -Gurjunen im

Gaschromatographie analysiert (Abb. 1b–d). Die Inkubationen des Enzymrohextraktes mit (*E,E*)-³H]FPP lieferten vier Hauptprodukte: enantiomerenreines (-)- α -Gurjunen **3**, **1a**, **1b** und (*E,E*)-Farnesol **4** (Abb. 1b). Da α -Gurjunen im

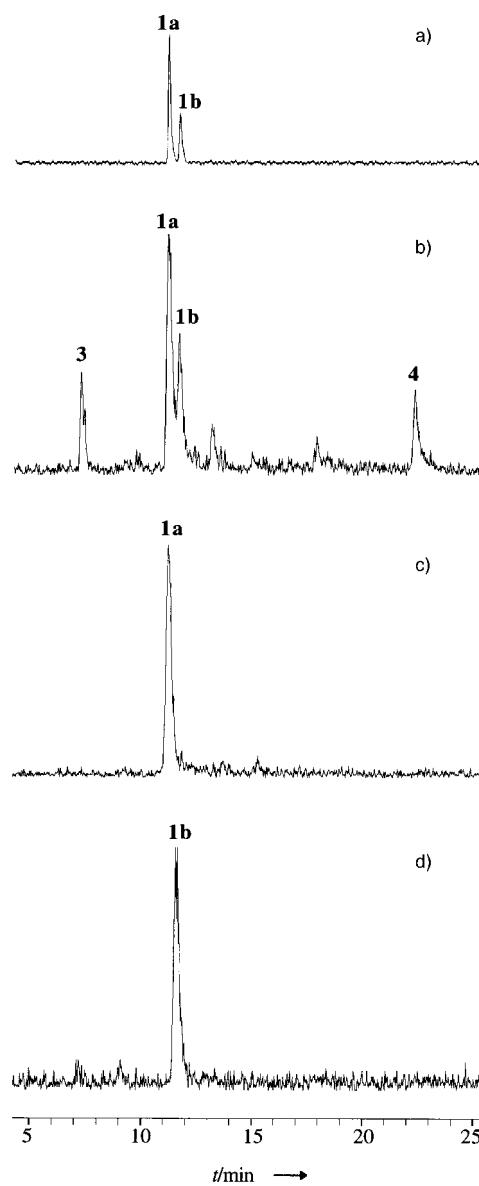


Abb. 1. Gaschromatogramme an einer Quarzglaskapillare (25 m) mit Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin (50 Gew.-% in OV1701); Temperaturprogramm: 14 min bei 116°C, mit 15°C min⁻¹ auf 170°C, 20 min bei 170°C (a) Flammenionisations-, b)–d) Radioaktivitätsdetektor). a) (+)/(-)-Germacren-D-Standard (durch präparative Gaschromatographie aus dem Wasserdampfdestillat von *S. canadensis* isoliert); b) Inkubationsprodukte (Assay 2) des Enzymrohextraktes; c) [³H](+)-Germacren D als Inkubationsprodukt (Assay 2) der gereinigten (+)-Germacren-D-Synthase; d) [³H](-)-Germacren D als Inkubationsprodukt (Assay 2) der gereinigten (-)-Germacren-D-Synthase.

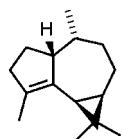
[*] Dr. H. J. Bouwmeester
Research Institute for Agrobiology and Soil Fertility (AB-DLO)
P.O. Box 14, NL-6700 AA Wageningen (Niederlande)
Fax: (+31) 317-423110
E-mail: h.j.bouwmeester@ab.dlo.nl

Prof. Dr. W. A. König, Dipl.-Chem. C. O. Schmidt
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg
Fax: (+49) 40-4123-2893
E-mail: wkoenig@chemie.uni-hamburg.de

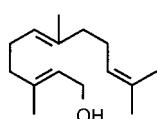
J.-W. de Kraker
Research Institute for Agrobiology and Soil Fertility (AB-DLO) und
Department of Organic Chemistry, Wageningen Agricultural University, Wageningen (Niederlande)

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

ätherischen Öl der Pflanze – anders als im Enzymrohextrakt – nur in geringen Mengen vorkommt, ist anzunehmen, daß α -Gurjunen in vivo eine Vorstufe von **2** ist. Die Bildung von Farnesol **4** ist auf die hohe Phosphohydrolase-Aktivität im Enzymrohextrakt zurückzuführen.



3



4

Die Enzyme wurden durch Ionenaustauschchromatographie (DEAE-52), Farbstoffligandenchromatographie (Red 120) und Fast-Protein-Liquid-Chromatography (FPLC) an einer MonoQ-Phase isoliert. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden zwei aktive Fraktionen erhalten: Die eine bildet in den [³H]FPP-Inkubationen ausschließlich **1a** (Abb. 1c), die andere nur **1b** (Abb. 1d). Beide Enzyme wurden um den Faktor 123 gereinigt (Tabelle 1). Dieses Ergebnis beweist, daß

Tabelle 1. Isolierung der (+)- und (-)-Germacren-D-Synthasen.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [nmol h ⁻¹]	spezifische Aktivität [nmol h ⁻¹ mg ⁻¹]	Ausb. [%]	Reinigungs faktor
Enzymrohextrakt	63.2	834.1	13.20	100	1.0
DEAE-52-Eluat	7.1	714.9	100.7	86	7.63
Dye Red 120	1.5	226.9	151.3	27	11.5
MonoQ					
(+)-Germacren-D-Synthase	0.04	64.7	1618	7.8	123
(-)-Germacren-D-Synthase	0.06	97.3	1622	12	123

die Biosynthese von **1a** und **1b** in *S. canadensis* von zwei enantioselektiven Synthasen gesteuert wird. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß eine Pflanze zwei Enzyme enthält, die die Biosynthese von enantiomeren Sesquiterpenen katalysieren. Ein ähnliches Enzymverhalten wurde bisher nur bei Monoterpen-Synthasen gefunden.^[13]

Die vorläufige Charakterisierung der beiden Enzyme ergab für beide Cyclasen eine molare Masse von 51 kDa (jeweils ein Monomer), die sowohl durch Gelfiltration^[14] (native molare Masse) als auch durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese bestimmt wurde. Das pH-Optimum betrug 7.0 für (+)- und 7.1 für (-)-Germacren-D-Synthase, die *K_M*-Werte der Synthasen für (*E,E*)-³H]FPP lagen bei 9.97 bzw. 4.24 μM. Diese Werte sind mit denen anderer bisher charakterisierter Sesquiterpencyclasen in Einklang.^[15]

Die Cyclisierungsmechanismen der beiden Synthasen sind bisher noch nicht untersucht. Einer Hypothese zufolge^[10] cyclisiert (*E,E*)-FPP zunächst zu einem Germacrenylkation, aus dem durch 1,3-Hydridverschiebung **1b** und durch doppelte 1,2-Hydridverschiebung **1a** entstehen würde. Andere Autoren^[16] haben hingegen festgestellt, daß (2*Z,6E*)-FPP ein Substrat für die Biosynthese von **1a** im Lebermoos *Heteroscyphus planus* ist. Nach unseren Ergebnissen ist (*E,E*)-FPP eindeutig das Substrat für die Biosynthese von **1a** und **1b** in *S. canadensis*.

Anhand NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Untersuchungen^[17] mit isotopenmarkiertem FPP sollen nun die Mechanismen aufgeklärt werden, nach denen die beiden Synthasen die Cyclisierungen katalysieren. Ferner

wird die Bestimmung der Primärstruktur beider Synthasen angestrebt.

Experimentelles

[³H]FPP wurde von der Firma Amersham (Großbritannien) bezogen. Alle Enzymisolierungen und Assay-Präparationen erfolgten bei 4 °C oder auf Eis.

Enzymrohextrakt:^[18] 15 g junge Blätter einer *S.-canadensis*-Pflanze (gesammelt in Hamburg) und 1.5 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP, Sigma) wurden in Puffer A (25 mM 3-(*N*-Morpholino)-2-hydroxypropan sulfonsäure (Mopso, Sigma), 25 mM Na₂S₂O₅, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 25 mM Ascorbinsäure, 20proz. Glycerin, pH 7.0) gemörsert. Der Extrakt wurde mit 7.5 g XAD-4 verrührt und anschließend durch Seihtuch filtriert. Das Filtrat wurde 20 min bei 20000 g (Pellet verworfen) und 90 min bei 100000 g zentrifugiert. Der 100000-g-Überstand wurde weiterverarbeitet.

Ionenaustauschchromatographie mit Diethylaminoethylcellulose (DEAE, vorgequollen, DE-52, Whatman):^[18] Der 100000-g-Überstand wurde auf eine mit Puffer B (15 mM Mopso, 10 mM MgCl₂, 2 mM Na₂S₂O₅, 10proz. Glycerin, pH 7.0) äquilierte DE-52-Säule gegeben und mit einem linearen Gradienten von 0.0–0.5 M KCl in Puffer B eluiert. Aktive Fraktionen wurden mit dem Assay 1 ermittelt, vereinigt und in Puffer C (15 mM Mopso, 10 mM MgCl₂, 10proz. Glycerin, pH 7.0) entsalzt (Econo-Pac-10-DG-Säule, Biorad).

Farbstoffligandenchromatographie:^[19] Das DEAE-52-Eluat wurde auf eine mit Puffer C äquilierte reaktive Red-120-Säule (Sigma) gegeben und mit 1.5 M KCl-Puffer C eluiert. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und in Puffer C entsalzt.

FPLC mit MonoQ-Phase:^[18b] Das Red-120-Eluat wurde auf eine mit Puffer C äquilierte MonoQ-Säule (Pharmacia) geladen und mit einem KCl-Gradienten von 0.0–2.0 M KCl in Puffer C eluiert. Die beiden aktiven Fraktionen wurden getrennt zur Enzymcharakterisierung verwendet.

Assay 1:^[18] 20 μL Enzymextrakt wurden mit 80 μL Puffer C und danach mit 20 μM [³H]FPP (50 Ci mol⁻¹) versetzt. Nach Überschichten mit 1 mL Hexan wurde 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion abgebrochen und die Hexanphase mit 40 mg Kieselgel versetzt, um Farnesol zu binden. Ein Aliquot der Hexanphase wurde im Flüssigkeits-Szintillationspektrometer auf Radioaktivität untersucht.

Assay 2:^[18] 1 mL Enzymextrakt wurde mit 20 μM [³H]FPP (50 Ci mol⁻¹) versetzt, mit 1 mL Pentan überschichtet und 60 min bei 30 °C inkubiert. Nach Ausschütteln des Reaktionsgemisches mit Diethylether wurden die vereinigten organischen Phasen über eine Aluminiumoxid-Säule gereinigt, eingeengt und so für die Radio-Gaschromatographie verwendet.

Radio-Gaschromatographie:^[18a, 20] Es wurde ein Carlo-Erba-Gerät 4160 GC mit einem RAGA-93-Radioaktivitätsdetektor (Raytest, Straubhardt) verwendet.

Eingegangen am 11. Dezember 1997 [Z11251]

Stichwörter: Enantiomere • Enzymkatalyse • Gaschromatographie • Sesquiterpene

[1] a) G. Rücker, *Angew. Chem.* **1973**, 85, 895–907; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, 12, 793–806; b) W. A. Ayer, L. M. Browne, *Tetrahedron* **1981**, 37, 2199–2248; c) R. R. Izac, P. Schneider, M. Swain, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 817–820; d) A. D. Rodriguez, *Tetrahedron* **1995**, 51, 4571–4618; e) G. M. König, A. D. Wright, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3837–3840.

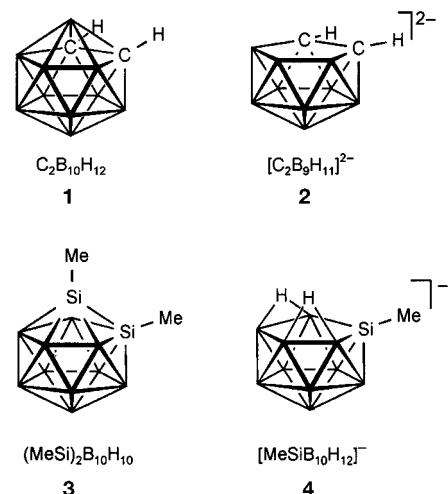
[2] a) G. Ohloff, *Riechstoffe und Geruchsstoffe*, Springer, Berlin, 1990; b) *Scent and Fragrances*, Springer, Berlin, 1994.

[3] D. E. Cane, J. S. Oliver, P. H. M. Harrison, C. Abell, B. R. Hubbard, C. T. Kane, R. Lattman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4513–4524.

[4] S. C. Jain, S. Nowicki, T. Eisner, J. Meinwald, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4639–4642.

[5] C. J. Persoons, P. E. J. Verwiel, F. J. Ritter, E. Talman, P. J. F. Nooijen, W. J. Nooijen, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2055–2058.

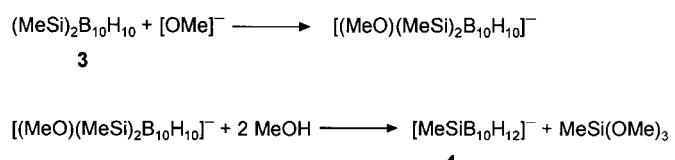
- [6] E. M. Davies, J. Tsuji, G. D. Davies, M. L. Pierce, M. Essenberg, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1047–1055.
 [7] D. E. Cane, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1089–1103.
 [8] I. H. Hardt, A. Rieck, C. Fricke, W. A. König, *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 165–171.
 [9] K. Yoshihara, Y. Ohta, T. Sakai, Y. Hirose, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2263–2264.
 [10] M. Niwa, M. Iguchi, S. Yamamura, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 997–999.
 [11] N. Bülow, W. A. König, unveröffentlichte Ergebnisse.
 [12] W. A. König, A. Rieck, I. Hardt, B. Gehrcke, K.-H. Kubeczka, H. Muhle, *J. High Res. Chromatogr.* **1994**, *17*, 315–320.
 [13] a) T. J. Savage, H. Ichii, S. D. Hume, D. B. Little, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *320*, 257–265; b) H. Gambliel, R. Croteau, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 740–748.
 [14] R. Croteau, F. Karp, *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *198*, 523–532.
 [15] a) L. Belingheri, A. Cartayrade, G. Pauly, M. Gleizes, *Plant Sci.* **1992**, *84*, 129–136; b) T. M. Hohn, R. D. Plattner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *272*, 137–143; c) F. Salin, G. Pauly, J. Charon, M. Gleizes, *J. Plant Physiol.* **1995**, *146*, 203–209.
 [16] K. Nabeta, M. Fujita, K. Komuro, K. Katayama, T. Takasawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 2065–2070.
 [17] D. E. Cane, M. Tandon, P. C. Prabhakaran, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8103–8106.
 [18] a) H. J. Bouwmeester, J. Gershenzon, M. C. J. M. Konings, R. Croteau, *Plant Physiol.*, im Druck; b) H. Cano-Camacho, E. López-Romero, E. Lozoya-Gloria, *Plant Sci.* **1997**, *124*, 23–31; c) S. L. Munck, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *282*, 58–64.
 [19] N. Lanznaster, R. Croteau, *Protein Expression Purif.* **1991**, *2*, 69–74.
 [20] P. McGready, H.-J. Pyun, R. M. Coates, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *299*, 63–72.



Schema 1. *o*-Carboran und *o*-Silaboran sowie ihre Abbauprodukte.

Reaktivitätsmuster dieses ikosaedrischen Clusters und im besonderen die der Siliciumzentren. Der nucleophile Abbau war die erste Reaktion des *o*-Silaborans, die aufgeklärt wurde.^[3] Nach Entfernung einer Siliciummecke aus dem ikosaedrischen Cluster kann man in fast quantitativer Ausbeute das Sila-*nido*-undecaborat(1[–]) **4** isolieren. Dieser elfeckige Cluster ist damit eine gut zugängliche Ausgangsverbindung für die Synthese von Übergangsmetallkomplexen mit Silicium-Metall-Wechselwirkung.^[4, 5]

Hier geben wir einen ersten Einblick in den nucleophilen Abbau des *o*-Silaborans. Unter Angriff eines Äquivalentes OH^- in H_2O , MeO^- in $MeOH$ oder mit reinem NH_3 wurde eine Siliciummecke aus dem *closo*-Cluster **3** entfernt.^[3] Nach einem für den Abbau plausiblen Mechanismus wird im ersten Schritt ein Addukt aus dem Nucleophil und dem *closo*-Cluster gebildet (Schema 2). Dieses Addukt sollte mit dem protischen Lösungsmittel unter Bildung des isolierten Produktes reagieren.



Schema 2. Nuclephiler Abbau des *o*-Silaborans **3** zum Sila-*nido*-undecaborat(1[–]) **4**.

Um Hinweise auf das erwartete Addukt zu finden, untersuchten wir den Angriff eines Nucleophils in einem aprotischen Lösungsmittel NMR-spektroskopisch. **3** wurde mit einem Äquivalent $LiNEt_2$ in THF umgesetzt, und das ¹¹B-NMR-Spektrum (Abb. 1) dieses Reaktionsgemisches zeigt die quantitative Bildung einer neuen Verbindung. Vier Signale im ¹¹B-NMR-Spektrum für zehn Boratome deuten darauf hin, daß das Produkt immer noch C_{2v} -symmetrisch ist. Eine Verschiebung des ²⁹Si-Signals von -38 auf -76 ppm weist auf eine Erhöhung der Koordinationszahl der Siliciumatome im Cluster hin. Das Siliciumsignal wurde indirekt mit der HMQC-¹H/²⁹Si-NMR-Pulsfolge gemessen. Wie erwartet,

Ein überraschendes Addukt eines *closo*-Clusters**

Lars Wesemann*, Yves Ramjoie, Michael Trinkaus, Beate Ganter und Jens Müller*

1968 veröffentlichten Hawthorne et al. die Synthese und Charakterisierung des 7,8-Dicarba-*nido*-undecaborats(1[–]) **2**, das durch nucleophilen Abbau von *o*-Carboran **1** entsteht (Schema 1):^[1] Die Umsetzung von Dicarba-*closo*-dodecaboran(12) **1** mit Kaliumhydroxid in Ethanol lieferte das elfeckige Cluster-Anion **2**. Als mögliches Zwischenprodukt wurde ein Addukt aus dem angreifenden Ethoxid-Ion und dem neutralen *closo*-Cluster formuliert. Im *o*-Silaboran^[2] **3** sind die Siliciumatome in der einmaligen Situation, in das Gerüst eines Boranclusters eingebaut zu sein. Wir interessieren uns für die

[*] Priv.-Doz. Dr. L. Wesemann, Dr. J. Müller, Dipl.-Chem. Y. Ramjoie, Dipl.-Chem. M. Trinkaus, Dr. B. Ganter
Institut für Anorganische Chemie der Technischen Hochschule
Professor-Pirlet-Straße 1, D-52056 Aachen
Fax: (+49)241-8888288
E-mail: lars.wesemann@ac.rwth-aachen.de
jens.mueller@ac.rwth-aachen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Schwerpunktprogramm „Polyeder“) gefördert. Wir danken dem Rechenzentrum der RWTH Aachen für die großzügige Bereitstellung von Rechenzeit. Insbesondere danken wir T. Eifert und J. Risch für ihre Hilfe.