

diesen Produkten standen die neuen, bemerkenswerten Strukturprinzipien mit sowohl trigonal-planar als auch tetraedisch von Chalkogenatomen koordiniertem Boratom im Vordergrund. Für die Bildung des ungewöhnlichen Clusters **2**, der den Wade-Regeln gehorcht, werden die kurzen Reaktionszeiten als möglicher Grund angesehen. Ob es sich bei dieser Substanz um eine Zwischenstufe auf dem Weg zu Selenoboraten handelt, kann sicherlich in weiteren Experimenten gezeigt werden. Die verbrückenden Substituenten, die in dieser Form bei Borclustern nicht bekannt sind, erniedrigen die Ikosaedersymmetrie auf D_{3d} . Im Festkörper hat das Anion lediglich kristallographische Inversionssymmetrie. Ein Substituent, der wie in dem hier vorgestellten Clusteranion zwei benachbarte Atome des Ikosaedergerüsts überbrückt, wurde in Form eines anellierten Sechsrings am Azadodecaboran von Paetzold et al. und am *o*-Carbaboran von Wade et al. vorgestellt.^[13] Bei offenen Derivaten ist in zwei Fällen die Überbrückung zweier benachbarter Boratome durch einen Triazeniumliganden nachgewiesen worden.^[14]

Die Faszination, die von Verbindung **2** ausgeht, wird zum einen sicherlich durch ihre ästhetische Struktur und zum anderen durch ihre Synthese hervorgerufen, die einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen dem Element Bor und einem substituierten Borancluster herstellt.

Stichwörter: Bor · Cluster · Ikosaeder · Selen

- [1] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie der Elemente*, VCH, Weinheim, 1988.
 [2] T. Lundström in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* (Hrsg.: R. B. King), Wiley, New York, 1994.

- [3] A. Stock, *Hydrides of Boron and Silicon. The George Fisher Baker Non-Resident Lectureship in Chemistry at Cornell University*, Cornell University Press, Ithaca, New York, 1933.
 [4] K. Wade, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **1976**, *18*, 1–66.
 [5] a) T. L. Heying, J. W. Ager, Jr., S. L. Clark, D. J. Mangold, H. L. Goldstein, M. Hillman, R. J. Polak, J. W. Szymanski, *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 1089–1092; b) L. I. Zakharkin, V. I. Stanko, V. A. Brattsev, Y. A. Chapovskii, Y. T. Struchkov, *Izv. Akad. Nauk. SSSR Ser. Khim.* **1963**, 2069; c) W. H. Knoth, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1274–1275; d) J. L. Little, S. S. Pao, K. K. Sugathan, *Inorg. Chem.* **1974**, *13*, 1752–1756; e) J. Plešek, S. Heřmánek, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, 127–128; f) G. D. Friesen, L. J. Todd, *ibid.* **1978**, 349–350; g) J. L. Little, *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 1598–1600; h) T. D. Getman, S. G. Shore, *ibid.* **1988**, *27*, 3439–3440; i) N. S. Hosmane, J. A. Maguire, *Adv. Organomet. Chem.* **1989**, *30*, 99–150; j) T. D. Getman, H.-B. Deng, L.-Y. Hsu, S. G. Shore, *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 3612–3616; k) D. Seyferth, K. Büchner, W. S. Rees, Jr., W. M. Davis, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 911–913; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 918–920; l) J. Müller, J. Runsink, P. Paetzold, *ibid.* **1991**, *103*, 201 bzw. **1991**, *30*, 175; m) R. W. Chapman, J. G. Kester, K. Folting, W. E. Streib, L. J. Todd, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 979–983; n) L. Wesemann, U. Englert, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 586–587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 527.
 [6] W. Hiller, K.-W. Klinkhammer, W. Uhl, J. Wagner, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 182–183; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 179–180.
 [7] A. R. Pitochelli, M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3228–3229.
 [8] a) Gmelin, *Handbuch der Anorganischen Chemie, Ergänzungswerk zur 8. Aufl., Bd. 54, Borverbindungen, Teil 20, Bor-Wasserstoff-Verbindungen*, Springer, Heidelberg **1979**; b) siehe Lit. [8a], S. 216–222, zit. Lit.
 [9] C. Harzendorf, H. Niederprüm, H. Odenbach, *Z. Naturforsch. B* **1970**, *25*, 6–10.
 [10] M. F. Hawthorne, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 997–1033; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 950–986.
 [11] Lit. [8a], S. 231–239, zit. Lit.
 [12] J. Küper, O. Conrad, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1995–1996; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1903–1904, zit. Lit.
 [13] a) L. Schneider, U. Englert, P. Paetzold, *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 87–90; b) R. C. B. Copley, M. A. Fox, W. R. Gill, J. A. K. Howard, J. A. H. MacBride, R. J. Peace, G. P. Rivers, K. Wade, *Chem. Commun.* **1996**, 2033–2034.
 [14] a) S. Küpper, P. J. Carroll, L. G. Sneddon, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4914–4915; b) F. Meyer, P. Paetzold, U. Englert, *Chem. Ber.* **1992**, *125*, 2025–2026.

Biosynthese von Taxol

Jürgen Rohr*

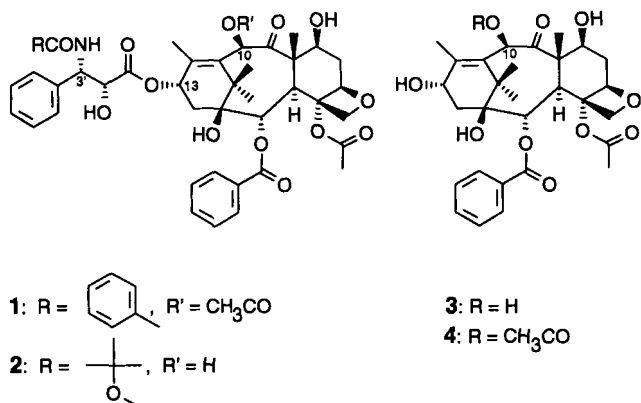
Eiben enthalten eine große Zahl an Wirkstoffen.^[1] Ihre Zweige wurden daher – und das ist literarisch eindrucksvoll festgehalten – schon von „Chemikerinnen“ des Mittelalters als wichtige Bestandteile in bestimmten Rezepturen geschätzt (Shakespeare: Macbeth IV, 1).^[1b,c] Heute interessiert man sich besonders für Taxol **1** (Paclitaxel),^[2] ein in der Rinde der nordamerikanischen Eibenart *Taxus brevifolia* vorkommendes Cytostaticum mit neuartigem Wirkprinzip. Taxol, die damit verwandten Taxoide und das semisynthetisch hergestellte Taxotère **2** (Docetaxel)^[2a] wirken antimitotisch, d. h. sie verhindern die Zellteilung und damit die Vermehrung von Krebszellen, indem sie, vermutlich,^[2b] die Spindelfasern durch Hemmung der Depolymerisation von Tubulin, ihrem Hauptbestandteil, stabilisieren. Die hohlen Spindelfasern spielen eine entscheidende

Rolle bei der Mitose (Zellteilung), da sie die beiden Chromosomen zu entgegengesetzten Polen der Zelle ziehen. Das kürzlich vielfach hervorgehobene Epothilon^[3] ist ein weiterer Naturstoff mit diesem Wirkmechanismus.^[2b, 3] Taxol und Taxotère werden gegen eine Reihe spezieller Tumore eingesetzt, insbesondere Eierstock- (auch im fortgeschrittenen, metastasierenden Stadium) und Brustkrebs.

Das Problem, das der medizinischen Nutzung des lipophilen Wirkstoffs Taxol lange Zeit entgegenstand, war sein Zugang: Aus einem Kilogramm Baumrinde können nur 100–170 mg des Wirkstoffs isoliert werden; die sehr langsam wachsenden Eiben (ein Baum braucht ca. 200 Jahre, um auszuwachsen) müssen dazu gefällt werden (ca. 1000 Bäume für 1 kg Taxol). Die Behandlung eines Krebspatienten verlangt mindestens 3 g, ca. 50 000 Patientinnen sterben jährlich allein in den USA an Eierstock- und Brustkrebs.^[1,4] Eine alternative, die Naturressourcen schonende Quelle, die derzeit sowohl für Taxol als auch für Taxotère genutzt wird, ist die Semisynthese. Man benutzt das aus nachwachsenden Eibennadeln verschiedener Eibensorten

[*] Prof. Dr. J. Rohr
 Institut für Organische Chemie der Universität
 Tammannstraße 2, D-37077 Göttingen
 Telefax: Int. + 551/39-9660
 E-mail: jrohr@gwdg.de

extrahierbare 10-Desacetylbaaccatin III **3** oder Baaccatin III **4** als Vorstufe und überführt es semisynthetisch in Taxotère **2** bzw. Taxol **1** durch Anhängen der synthetisch zugänglichen Seitenketten.^[4, 5]



Taxol **1** wurde bereits mehrfach totalsynthetisch hergestellt,^[4, 6] keine Totalsynthese bietet jedoch eine realistische Chance für eine kommerzielle Produktion, obwohl die neueste, vom Konzept her attraktivste Totalsynthese von P. A. Wender et al.^[6d] (die sogenannte Pinenroute) gegenüber früheren eine etwa zehnfache Ausbeutesteigerung bietet.

Ein realistischerer Weg für die Taxolproduktion bahnt sich dagegen über (endophytische) Pilze an, z. B. *Taxomyces andreanae*,^[7a] *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Alternaria alternata* ssp. *Taxus hicksii* etc., die aus der pazifischen Eibe oder aus *Taxus hicksii* isoliert worden sind.^[7a, 7b] Diese Pilze haben die Taxolbiosynthese vermutlich über horizontalen Gentransfer vom Baum „gelernt“.^[7c] Die Fermentation von *Alternaria alternata* erreicht bereits Größenordnungen von ca. 116 mg Taxol pro Liter.^[7b] Weitere, zukünftig sicherlich immer besser nutzbare Möglichkeiten bieten auch pflanzliche Zellkulturen (es werden schon Produktionsraten von ca. 55 mg Taxol pro Liter pro Woche erreicht^[7d]) oder ein zellfreier Biosyntheseapparat, an dem gearbeitet wird.^[8] Für die Optimierung solcher „komplett-biochemischer“ Verfahren ist jedoch die genaue Kenntnis der Taxolbiosynthese und der daran beteiligten Enzyme Voraussetzung, und hierbei sind in jüngster Zeit enorme Fortschritte gemacht worden.^[9–18]

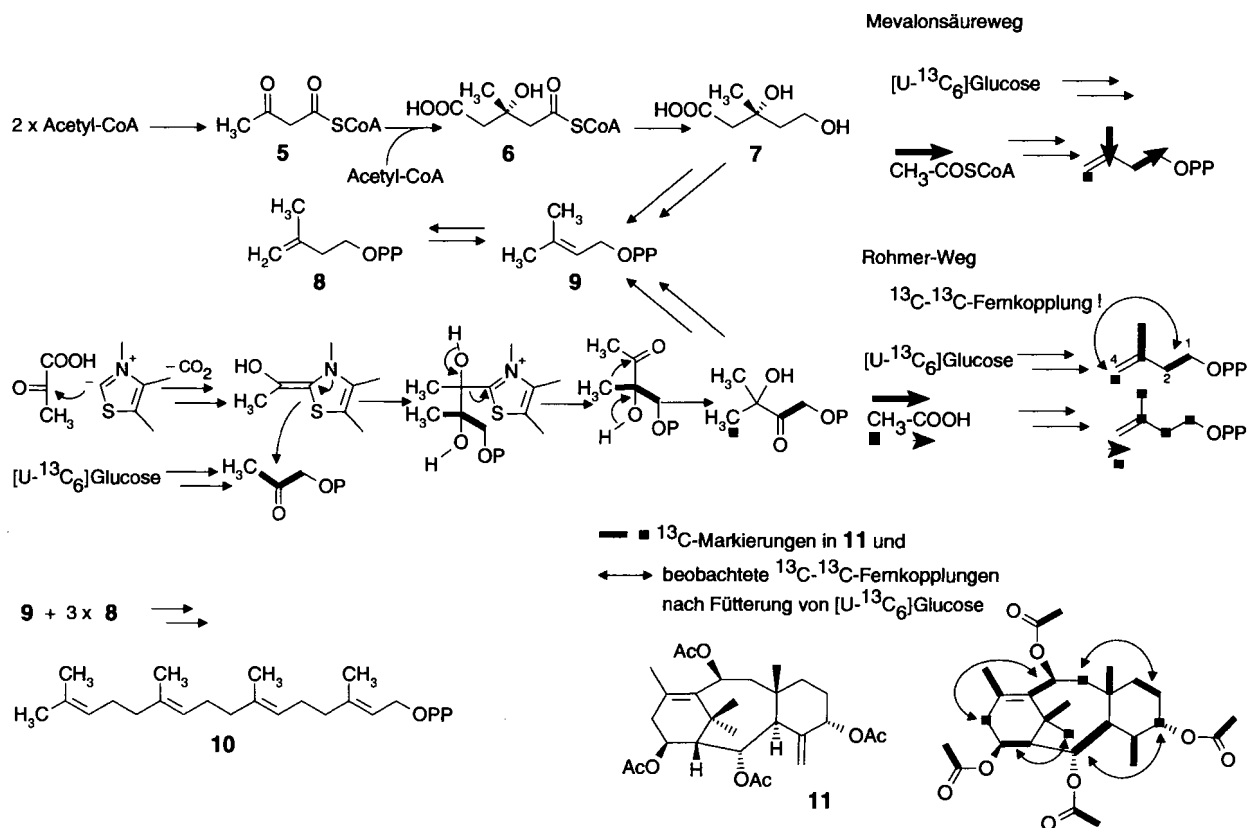
Erste Biogenesestudien, durchgeführt von Zamir et al. an *Taxus-baccata*- und *Taxus-canadensis*-Arten unter Verwendung von radiomarkierten Vorstufen,^[9b] erbrachten erwartungsgemäß die Quellbausteine Phenylalanin (für die Seitenkette), Acetat (für die Acetylreste) und Mevanolat **7** für das Taxangerüst. Es ergaben sich aber nur sehr geringe Mevanolat-Einbauraten, Abbaureaktionen zur genaueren Lokalisierung des Einbaues wurden nicht durchgeführt (siehe unten). Auch wurden auf der Grundlage von Molecular-Modelling-Studien und der Isolierung von Nebenprodukten weitere Biosynthesehypothesen abgeleitet.^[9c]

Genaue Biosyntheseuntersuchungen gibt es erst seit jüngster Zeit, und über die frühe Taxolbiosynthese war bis vor zwei Jahren fast nichts bekannt. Diese wurde intensiv vor allem von R. Croteau et al., teilweise in Zusammenarbeit mit H. G. Floss, untersucht.^[12–15] Auch die Münchener Arbeitsgruppen um

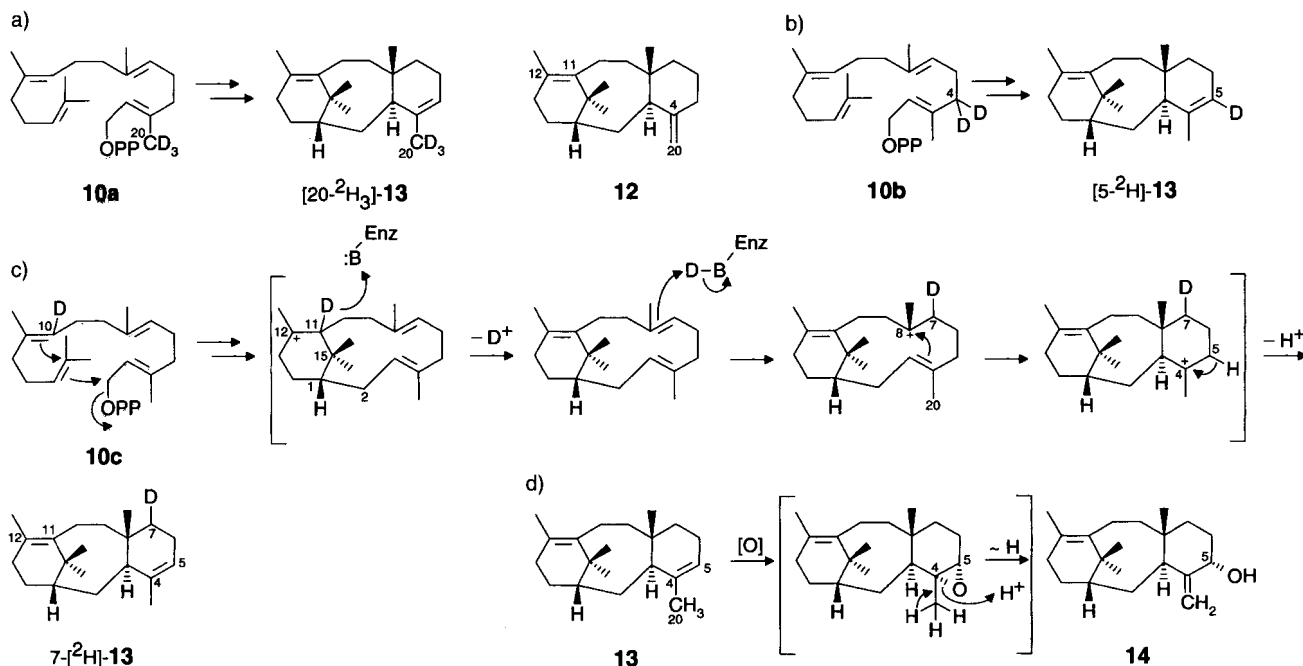
M. H. Zenk und A. Bacher trugen interessante Ergebnisse bei.^[10] Zunächst wird der vielfach bei Pflanzenbiosynthesen verwendete Diterpenbaustein Geranylgeranyldiphosphat **10** biosynthetisiert. Dabei stellte sich heraus, daß das Taxangerüst doch nicht mevalonoiden Ursprungs ist.^[10] Einbauversuche an Zellkulturen von *Taxus chinensis* mit [U-¹³C₆]Glucose, [1-¹³C]Glucose und [1,2-¹³C₂]Acetat ergaben (NMR-Analyse), daß das markierte Acetat nur in die Acetylreste, aber nicht in das Taxanringgerüst eingebaut wurde, wogegen die Markierungen aus Glucose sowohl in die Acetylgruppen als auch in das Taxanringgerüst des mit **1** verwandten Taxuyunnanin C **11** eingebaut wurden (Schema 1). Interessantes ergab die Analyse von ¹³C, ¹³C-Fernkopplungen nach Einbau von [U-¹³C₆]Glucose (**11**, Schema 1): Es konnte in jeder Isopreneinheit eine intramolekulare Umlagerung bei der Bildung des Isoprenoidvorläufers nachgewiesen werden, die nicht konsistent mit dem üblichen Mevalonsäureweg^[11a] ist, aber dem alternativen Isoprenoidbiosyntheseweg auffällig ähnelt, der kürzlich von Rohmer et al. als maßgeblich für die Biosynthese von Hopan-Triterpenoiden und Ubichinonen in Eubakterien gefunden wurde (Schema 1).^[11b]

Die Grundbausteine aller Isoprenoide, also auch von Terpenen wie Geranylgeranyldiphosphat **10**, sind Isopentenylpyrophosphat **8** (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat **9** (DMAPP). Sie werden über Acetoacetyl-CoA **5**, 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA **6** (HMG-CoA) und Mevalonsäure **7** (MVA) biosynthetisiert.^[11a] IPP **8** steht mit DMAPP **9** über eine Isomerase im Gleichgewicht. Daraus folgt ein Markierungsmuster mit überall gleichen Einbauraten bei Verwendung von [1,2-¹³C₂]Acetat oder [U-¹³C₆]Glucose (Schema 1). Im von Rohmer et al. gefundenen alternativen Weg^[11b] werden IPP und DMAPP vermutlich über thiaminaktivierten Acetaldehyd (entsteht im Zuge der Decarboxylierung von Pyruvat) und Dihydroxyacetonphosphat aufgebaut. Nach Abspaltung des Thiaminrestes folgen eine Umlagerung (CH₃-Verschiebung) und weitere Reduktionen, Dehydratisierungs- und Phosphorylierungsschritte (Schema 1). So biosynthetisiertes IPP **8** und DMAPP **9** haben prinzipiell die gleichen charakteristischen Markierungen wie auf klassischem Weg biosynthetisiertes **8** und **9**, aber unterschiedliche Einbauraten für die C-Atome aus dem C₂- oder C₃-Vorläufer, wenn [U-¹³C₆]Glucose die Isotopenquelle ist (Schema 1), und lassen sich im Gegensatz zu ihren klassisch aufgebauten Pendants nicht direkt über Acetat markieren (man findet entweder keine merkliche Markierung oder „Scrambling“, d. h. indirekten Einbau nach weiterer Verstoffwechselung, Schema 1). Daß dieser Weg möglicherweise in vielen anderen Organismen verwirklicht ist,^[11c] z. B. auch beim Menschen, kann man schon daraus schließen, daß die als Cholesterinbiosyntheseschwerer verbreiteten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Compactin oder Mevinolin (Lovastatin) die Biosynthese des für die Funktion der mitochondrialen Atmungskette essentiellen Ubichinons nicht stören, was fatale Folgen hätte.

Der erste entscheidende Biosyntheseschritt zum Aufbau des tricyclischen Taxangerüsts wird durch die Taxadien-Synthase katalysiert, ein Enzym, das drei C-C-Bindungen knüpft.^[12] Sein Endprodukt ist Taxa-4(5),11(12)-dien **13**, und nicht das isomere 4(20),11(12)-Dien **12**, das allgemein wegen des Vorkommens solcher Taxane (siehe **11**!) favorisiert wurde (Schema 2). Daß **13** das erste Cyclisierungsprodukt von Geranylgeranyldiphos-



Schema 1. Mevalonsäure- und „nicht-mevalonoide“ Biosyntheseweg (Rohmer-Weg) zu Isopentenylpyrophosphat 8 und Dimethylallylpyrophosphat 9. Die Markierung im Taxoid 11 nach Einbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ und die NMR-spektroskopischen ^{13}C , ^{13}C -Fernkopplungen innerhalb der Isoprenoidbausteine weisen auf „nicht-mevalonoide“ Biosynthese des Taxangerüsts hin (Näheres siehe Text).



Schema 2. Versuche zur Untersuchung der Taxadien-Synthese-Reaktion (Näheres siehe Text). Die Taxa-4(5),11(12)-dien(13)-Oxygenase-Reaktion verläuft unter 4,5- α -Epoxidierung und anschließender Umlagerung zum Taxa-4(20),11(12)-Dienol 14.

phat 10 ist, wurde durch Verfüttern von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{Geranylgeranyldiphosphat}$ nachgewiesen. So radiomarkiertes Taxa-4(5),11(12)-dien wurde weiterhin erfolgreich in Baccatin III 4, Taxol 1 und andere Taxane umgewandelt, was seine Rolle als

Biosyntheseintermediat beweist. Verwendet wurde für diese Versuche ein zellfreies Enzymsystem, das aus den Stämmen junger *Taxus-brevifolia*-Bäume (ca. vier Jahre alt) gewonnen worden war.^[12] Konsequenterweise wurde daraufhin nach der verant-

wortlichen Taxadien-Synthase gesucht. Um ihre codierenden Gene zu finden, wurden DNA-Primer konstruiert, auf der Grundlage konservierter Genabschnitte mutmaßlicher, verwandter Terpen-Cyclasen. Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte aus zwei dieser Primer ein 83 Basenpaare (bp) langer DNA-Abschnitt amplifiziert werden, dessen Sequenz einer Cyclase entsprach. Damit wurde wiederum eine cDNA-Bibliothek aus *Taxus-brevifolia*-DNA durchsucht. Eines der damit hybridisierenden cDNA-Stücke wurde in *E. coli* exprimiert, das resultierende Protein (862 Aminosäuren, $98\,303\text{ g mol}^{-1}$) erwies sich als die gesuchte Taxadien-Synthase, die die Umsetzung von Geranylgeranyldiphosphat **10** in Taxa-4(5),11(12)-dien **13** katalysiert. Damit waren die Wege für eine genauere mechanistische Untersuchung dieses Schlüsselenzyms der Taxolbiosynthese offen.^[13]

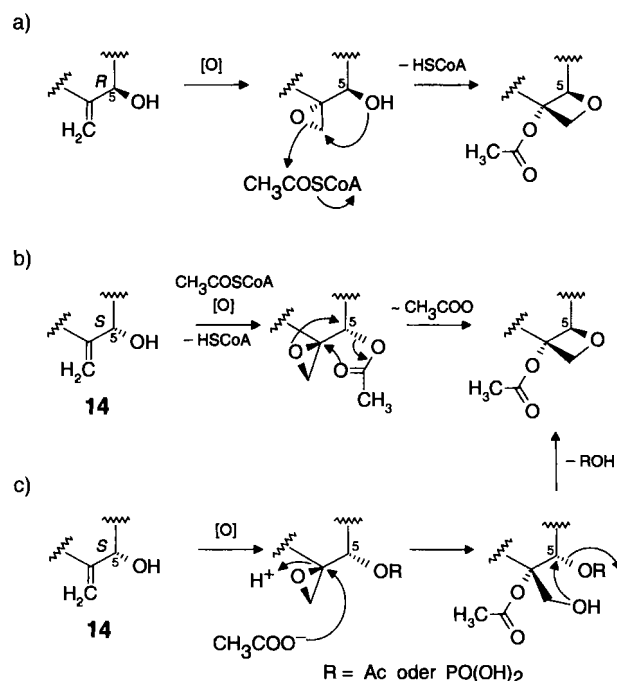
So konnte eine Taxa-4(20),11(12)-dien-Zwischenstufe und seine Umlagerung in das thermodynamisch stabilere **13** endgültig dadurch ausgeschlossen werden, daß $[20\text{-}^2\text{H}_3]$ Geranylgeranyldiphosphat **10a** seine drei Deuteriumatome bei der Taxadien-Synthase-Reaktion erhielt (Schema 2a), umgekehrt ging ein Deuteriumatom bei dem entsprechenden Versuch mit $[4\text{-}^2\text{H}_2]$ Geranylgeranyldiphosphat **10b** verloren, was auf eine direkte H^+ -Abstraktion von C-5 und damit direkte Bildung von **13** schließen läßt (Schema 2b). Als besonders interessant erwies sich ein Einbauversuch mit $[10\text{-}^2\text{H}]$ Geranylgeranyldiphosphat **10c**: Hier tritt die Markierung in der 7-Position von **13** wieder auf. Damit ist erstmals belegt, daß die C-11/C-15- und die C-1/C-2-Verknüpfungen vor der Bildung der C-3/C-8-Bindung erfolgen; denn die Abstraktion eines Protons von C-11 (das entspricht dem 10-H in **10**), die zur Bildung der 11,12-Doppelbindung führt, muß vor dessen Wiederanlagerung an C-7 stattfinden. Durch letzteren Schritt entsteht aber erst das Kation, das die letzte, die C-3/C-8-Verknüpfung, beim Taxangerüstaufbau vorbereitet. Nach der C-3/C-8-Bindungsbildung entsteht ein Kation an der 4-Position; eine H^+ -Abstraktion von C-5 und die Bildung der 4,5-Doppelbindung schließen die Reaktionskaskade zum Taxa-4(5),11(12)-dien **13** ab (Schema 2c).^[14]

Um jetzt vom Taxa-4(5),11(12)-dien **13** weiter zum Taxol **1** zu gelangen, muß das Taxangerüst weitgehend modifiziert werden, was überwiegend durch Sauerstoffeinbau (acht Oxygenierungsschritte) geschieht. Dabei wird u. a. der wichtige Oxetanring aufgebaut. Kürzlich gelang es, den ersten und vielleicht wichtigsten dieser Oxygenierungsschritte aufzuklären.^[15] Es handelt sich dabei um die 5α -Hydroxylierung, katalysiert durch die Taxadien-5-Hydroxylase, unter gleichzeitiger Umlagerung der Doppelbindung von der 4,5- in die 4,20-Position. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym Taxa-4(5),11(12)-dien- 5α -Hydroxylase konnte eindeutig als eine membrangebundene, NADPH-abhängige P450-Oxygenase charakterisiert werden, die molekularen Sauerstoff umsetzt. Zellfreie Präparationen aus *Taxus-brevifolia*-Bäumchen und *Taxus-cupsidata*-Zellkulturen, die diese Oxygenase enthalten, katalysieren die Umsetzung von radioaktivem $[^3\text{H}]$ - und von $[20\text{-}^2\text{H}_3]$ Taxa-4(5),11(12)-dien. Aus letzterem Experiment ergab sich ein Verlust eines Deuteriumatoms, was mit der Umlagerung von der 4,5- in die 4,20-Position zu erklären ist. Ersteres Experiment verschaffte Zugang zu radiomarkiertem Taxa-4(20),11(12)-dien- 5α -ol **14**, dessen Rolle als Biosyntheseintermediat durch seine weitere Umwandlung in 10-Desacetylbaaccatin III **3** und Taxol **1** plausibel gemacht wer-

den konnte. Der Nachweis, daß es sich bei dem Biosyntheseintermediat um den 5α - und nicht um den 5β -Alkohol handelt, gelang über den dünnstschichtchromatographischen Vergleich mit den totalsynthetisch hergestellten Verbindungen.^[15]

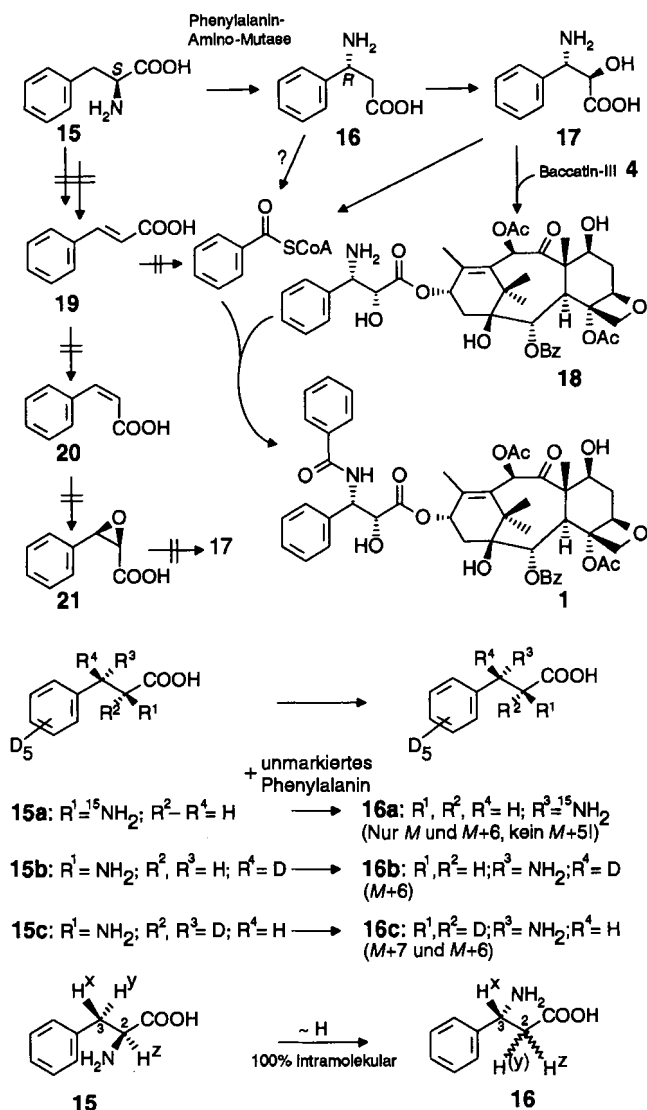
Mit dem Beweis, daß **14** das unmittelbar auf **13** folgende Biosyntheseintermediat auf dem Weg zum Taxol **1** ist, und daß die 5α -Hydroxylierung (mit gleichzeitiger Verlagerung der Doppelbindung) der erste Oxygenierungsschritt der Taxolbiosynthese ist, ergaben sich interessante mechanistische Konsequenzen, besonders bezüglich der Bildung des Oxetanringes in **1** und verwandten Taxanen. Die Bildung des Oxetanringes über eine Epoxidierung der 4,20-Doppelbindung war schon immer postuliert worden,^[16] weshalb auch Taxa-4(20),11(12)-dien **12** lange als Biosyntheseintermediat favorisiert wurde (siehe oben). Es gibt Hinweise,^[15a] daß das Dienol **14** über eine 4,5-Epoxidierung und anschließende Öffnung durch H-Wanderung gebildet wird (Schema 2d). Daß ein 4,20-Olefin im Zuge der 5 -Hydroxylierung gebildet wird, bestätigt alle Hypothesen für die Epoxidierung als ersten Schritt zur Oxetanbiosynthese. Die Konfiguration (5α -OH in **14** und des Oxetans in **1**) schließt jedoch einen einfachen Angriff der 5-OH-Gruppe auf ein 4,20-Epoxid (Schema 3a) aus, statt dessen muß eine kompliziertere Acetatumlagerung unter gleichzeitiger Öffnung des Epoxids und eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion an C-5 formuliert werden (Schema 3b). Offen ist noch, ob es sich dabei um eine intramolekulare Acetatwanderung (Schema 3b) oder um eine intermolekulare Acetatöffnung (Schema 3c) handelt. Vom Taxa-4(20),11(12)-dien- 5α -ol **14** zum Taxol **1** ist es sicher noch ein weiter Weg, der nach wie vor weitgehend unklar ist.

Späte Biosyntheseschritte, die die Taxolseitenkette betreffen, wurden eingehend von H. G. Floss et al. untersucht. Die Seitenkette wird ausschließlich aus Phenylalanin **15** aufgebaut.^[9, 17] Desbenzoyltaxol **18** ist ein Zwischenprodukt, das letzte Intermediat der Biosynthesekaskade zu **1**. Beim Aufbau der für die



Schema 3. Alternative Mechanismen zur Oxetanbildung in Taxol **1**. Die Stereochemie im Taxadienol **14** schließt eine einfache intramolekulare Epoxidöffnung wie in a) aus. Die in b) und c) dargestellten Alternativen sind noch offen.

Antitumoraktivität essentiellen Phenylisoserin(17)-Seitenkette spielt eine Reaktion eine Schlüsselrolle, die zuvor in Pflanzen völlig unbekannt war: eine Phenylalanin-Aminomutase-Reaktion, in der aus Phenylalanin die entsprechende β -Aminosäure **16** durch Verschieben der Aminogruppe um ein C-Atom entsteht (Schema 4). Eine plausible Alternative über Zimtsäure **19**,



Schema 4. Späte Biosyntheseschritte zu Taxol 1. Beide Phenylgruppen der Seitenkette stammen aus Phenylalanin **15**, das zuerst in β -Phenylalanin **16** umgelagert wird. Ein alternativer Weg über Zimtsäure **19** konnte ausgeschlossen werden (Näheres siehe Text). Versuche zur Aufklärung der Phenylalanin-Aminomutase-Reaktion führten zur Annahme des unten dargestellten stereochemischen Verlaufs der strikt intramolekularen Reaktion.

ihre Isomerisierung zum (Z)-Isomer **20**, Epoxidierung zu **21** und anschließende „aminierende Öffnung“ konnte wegen nicht erfolgtem Einbau von $[{}^2\text{H}_5]$ -**19** und analog markiertem (Z)-Epoxid **21** ausgeschlossen werden. Das interessante Enzym Phenylalanin-Aminomutase wurde inzwischen mit zellfreien Extrakten aus *Taxus-brevifolia*-Gewebe- und MS-Analytik charakterisiert. Mit $[{}^2\text{H}_5, {}^{15}\text{N}]$ Phenylalanin **15a** konnte gezeigt werden, daß die Aminogruppenumlagerung strikt intramolekular verläuft, denn unter Zugabe von unmarkiertem Phenylala-

nin ergaben sich immer nur die Molekülonen M^+ und $M + 6$, niemals $M + 5$.^[17b] Weiterhin konnte der sterische Verlauf der Reaktion aufgeklärt werden: Versuche mit $[3R\text{-}^2\text{H}]$ - und $[2S, 3R\text{-}^2\text{H}_2]$ -markiertem Phenylalanin (**15b** bzw. **15c**) ergaben Retention des pro-R-Wasserstoffatoms in der 3-Position bzw. (teilweise) Wanderung des pro-S-Wasserstoffatoms aus der 3-Position (in **15**) in die 2-Position des β -Phenylalanins **16** (Schema 4).^[17b] Auch der Benzoatrest der Seitenkette wird von *Taxus brevifolia* anders als üblicherweise (das ist über Zimtsäure **19**) in Pflanzen biosynthetisiert; denn die Einbauversuche mit $[{}^2\text{H}_5]$ - β -Phenylalanin ließen teilweise einen doppelten Einbau erkennen ($M + 10$ -Peak im Massenspektrum!). Daher muß auch die Benzoylgruppe über β -Phenylalanin **16** (oder auch Phenylisoserin **17**) aufgebaut werden.

Zwar sind noch viele Fragen der Biosynthese von Taxol 1 offen, aber die Untersuchungen haben bereits „Flaschenhälse“ zutage gefördert, d.h., zeitraubende und umsatzlimitierende Reaktionen wurden erkannt. Das sind vor allem die Taxadien-Synthase- und die darauf folgende Oxygenase-Reaktion. Nun gilt es, diese zu beschleunigen, wozu das übliche gentechnische Methodenarsenal eingesetzt werden soll. Ein Transformatio-nsystem zum Einbringen von z. B. amplifizierten Genen für die limitierenden Schritte oder von Genen, die die Regulation der Biosynthese oder bestimmter Schritte verändern, steht bereits zur Verfügung.^[18] Es basiert auf dem mutagenen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens*, das vielfach zur Mutation von Pflanzen oder pflanzlichen Zellkulturen herangezogen wird. Damit könnten sich die pflanzlichen Zellkulturen zu Höchstleistungen in der Taxolsynthese stimulieren lassen. Eine Alternative bieten weitere gezielte Veränderungen an taxolproduzierenden Pilzen. Möglicherweise wird es auch bald ein von jedweden Organismus unabhängiges zellfreies Enzymsystem geben,^[8c] daran gearbeitet wird jedenfalls bereits.^[8c]

Stichwörter: Biosynthese · Cytostatica · Enzyme · Isotopenmarkierungen · Taxol

- [1] a) B. Schneider, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1994**, *134*, 3389–3400, zit. Lit.; b) W. Shakespeare, *The Complete Works of William Shakespeare*, Avenel Books, New York, **1975**, S. 1060; c) J. Mann, *Murder, Magic and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, **1992**, S. 1–2.
- [2] a) Taxol ist seit kurzem ein Warenzeichen der Firma Bristol-Myers-Squibb, der generische Name ist Paclitaxel; Taxotère ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Rhône-Poulenc Rorer, der generische Name ist Docetaxel. Wegen der größeren Bekanntheit werden im Text ausschließlich die geschützten Namen verwendet. b) Es gibt noch weitere mikrotubulabilisierende Substanzen, die aber nicht cytostatisch wirken, weshalb die einfache Beziehung Depolymerisationshemmer = cytotoxische Substanz fraglich ist.
- [3] a) G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671–1673; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1567–1569; b) K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 560–563; c) L. Wessjohann, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 739–742; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 738–742.
- [4] a) P. Poirier, S. Irseer Naturstofftage, Kloster Irsee, **1993**, siehe auch: J. Rohr, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1993**, *41*, 559–564; b) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 38–69; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 45–76.
- [5] a) J.-N. Denis, A. Correa, A. E. Greene, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1957–1959; b) G. Li, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 449–452; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 448–451; c) C. Gennari, A. Vulpetti, M. Donghi, N. Mongelli, E. Vanotti, *ibid.* **1996**, *108*, 1809–1812 bzw. **1996**, *35*, 1723–1725, zit. Lit.
- [6] a) R. A. Holton, C. Somoza, H.-B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile, J. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597–1600; b) K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Natermet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paul-

- vannan, E. J. Sorensen, *Nature* **1994**, 367, 630–634; c) S. J. Danishesfsky, J. J. Masters, W. B. Young, J. T. Link, L. B. Snyder, T. V. Magee, D. K. Jung, R. C. A. Isaacs, W. G. Bornmann, C. A. Alaimo, C. A. Coburn, M. J. Di Grandi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2843–2859; d) P. A. Wender, N. F. Badham, S. P. Conway, P. E. Floreancig, T. E. Glass, J. B. Houze, N. E. Krauss, D. Lae, D. G. Marquess, P. L. McGrane, W. Meng, M. G. Natchus, A. J. Shuker, J. C. Sutton, R. E. Taylor, *ibid.* **1997**, 119, 2757–2758; e) L. Wessjohann, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1011–1013; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 959–961.
- [7] a) A. Stierle, G. Strobel, D. Stierle, *Science* **1993**, 260, 214–216; b) J. S. Dahiya (Novopharm Ltd.), WO 9632490 A1, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, 125, 326527; c) Der horizontale Gentransfer könnte natürlich auch umgekehrt verlaufen oder sogar co-evolutiv entwickelt worden sein. Da Taxoide jedoch typische Pflanzenprodukte sind, ist die hier favorisierte Richtung am wahrscheinlichsten; d) Y. Yukimune, *Nat. Biotech.* **1996**, 14, 1129.
- [8] a) C. A. Roessner, A. I. Scott, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 325–330; b) A. I. Scott, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2559–2578; c) persönliche Mitteilung, **1996**.
- [9] a) S. Borman, *Chem. Eng. News* **1996**, 74(27), 27–29; b) L. O. Zamir, M. E. Nedeia, F. X. Garneau, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5235–5236; c) Y. Boulanger, A. Khat, Z.-H. Zhou, G. Caron, L. O. Zamir, *Tetrahedron* **1996**, 52, 8957–8968.
- [10] W. Eisenreich, B. Menhard, P. J. Hylands, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6431–6436.
- [11] a) D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1994**, S. 639–659; b) M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, 295, 517–524; c) H. Seto, H. Watanabe, K. Furihata, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7979–7982.
- [12] A. E. Koepp, M. Hezari, J. Zajicek, B. Stofer Vogel, R. E. LaFever, G. N. Lewis, R. Croteau, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 8686–8690.
- [13] M. R. Wildung, R. Croteau, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 9201–9204.
- [14] X. Lin, M. Hezari, A. E. Koepp, H. G. Floss, R. Croteau, *Biochemistry* **1996**, 35, 2968–2977.
- [15] a) J. Hefner, S. M. Rubenstein, R. E. B. Ketchum, D. M. Gibson, R. M. Williams, R. Croteau, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 479–489; b) S. M. Rubenstein, R. M. Williams, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7215–7233.
- [16] a) F. Guéritte-Voegelein, D. Guénard, P. Poitier, *J. Nat. Prod.* **1987**, 50, 9–18; b) H. G. Floss, U. Mocek in *Taxol: Science and Applications* (Hrsg.: M. Suffness), CRC, Boca Raton, FL, USA, **1995**, S. 191–208.
- [17] a) P. E. Fleming, U. Mocek, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 805–807; b) H. G. Floss, persönliche Mitteilung, **1997**.
- [18] K.-H. Han, P. Fleming, K. Walker, M. Loper, W. S. Chilton, U. Mocek, M. P. Gordon, H. G. Floss, *Plant Sci.* **1994**, 95, 187.