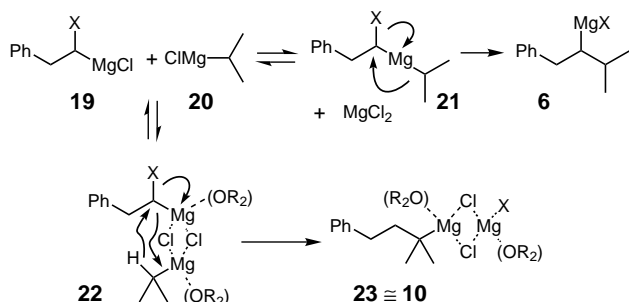


12 ist. Daher postulieren wir, dass die tertiäre Grignard-Verbindung **10** aus einem gemischten Aggregat **22** der beiden Grignard-Reagentien **19** und **20** gebildet wurde. In weniger koordinierenden Lösungsmitteln wie Diethylether oder *tert*-Butylmethylether sollten solche, über Halogenatome verbrückte Aggregate bevorzugt auftreten.^[1] Außerdem ist bekannt, dass Lithiumcarbenoide R-CHX-Li durch THF stabilisiert werden, während sie in Diethylether schneller zerfallen.^[6] Die Tendenz, Carbene zu bilden, bzw. die elektrophile Reaktivität der Carbenoide ist in diesen unpolaren Lösungsmitteln größer. Wir postulieren daher, dass das Carbenoid **22** eine C-H-Insertion innerhalb des Aggregats (direkt oder indirekt) in die α -C-H-Bindung des sekundären Grignard-Reagens **20** eingeht, wobei das Produktaggregat **23**, d. h. das tertiäre Grignard-Reagens **10** gebildet wird.



Dieser postulierte Mechanismus stimmt mit der Beobachtung überein, dass die tertiäre α -C-H-Bindung des Isopropyl-Grignard-Reagens bei dem elektrophilen Angriff durch das Carbenoid in größerem Ausmaß reagierte als die sekundäre α -C-H-Bindung des Ethyl-Grignard-Reagens. Außerdem entspricht der Einfluss des Halogenatoms der α -Halogenalkylmagnesiumverbindung **1** auf die Reaktion mit einer Alkylmagnesiumverbindung insoweit den Erwartungen, als beispielsweise die Iodverbindungen weniger geneigt sind, carbenoide Einschleppungsreaktionen einzugehen als die anderen Halogenverbindungen.

Unabhängig davon, ob der vorgeschlagene Mechanismus in Zukunft durch andere Erklärungen ersetzt werden muss, konnten wir zeigen, dass sich die Carbenoid-Homologisierungsreaktion in einen neuen Prozess umsteuern lässt, der zu „umgelagerten“ Grignard-Reagentien führt.

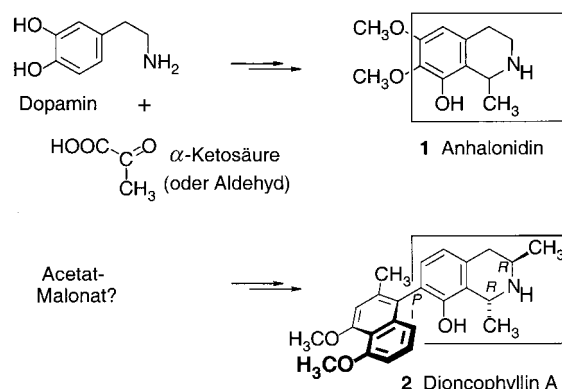
Eingegangen am 23. Dezember 1999 [Z14458]

- [1] B. J. Wakefield, *Organomagnesium Methods in Organic Synthesis*, Academic Press, **1995**, S. 58.
 [2] a) J. Villieras, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 1511–1520; b) R. C. Hahn, J. Tompkins, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 937–940; c) C. DeLima, M. Julia, J.-N. Verpeaux, *Synlett.* **1992**, 133–134.
 [3] V. Schulze, M. Brönstrup, V. P. W. Böhm, P. Schwerdtfeger, M. Schimeczek, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 869–871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 824–826.
 [4] a) D. S. Matteson, R. W. H. Mah, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2599–2603; b) D. S. Matteson, G. D. Hurst, *Heteroat. Chem.* **1990**, 1, 65–74.
 [5] C. W. Kamienski, J. F. Eastham, *J. Organomet. Chem.* **1967**, 8, 542–546.
 [6] a) G. Köbrich, H. R. Merkle, H. Trapp, *Tetrahedron Lett.* **1965**, 969–972; b) G. Köbrich, F. Ansari, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2011–2020; c) J. Villieras, R. Tarhouni, B. Kirschleger, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, 825–830; d) J. Villieras, *Organomet. Chem. Rev. A* **1971**, 7, 81–94.

Ein neuer Biosyntheseweg zu Alkaloiden in Pflanzen: acetogenine Isochinoline**

Gerhard Bringmann,* Michael Wohlfarth, Heiko Rischer, Matthias Grüne und Jan Schlauer

Die Tetrahydroisochinolin-Alkaloide bilden eine große Familie von mehr als 2500^[1] bekannten, meist pharmakologisch bedeutsamen pflanzlichen Sekundärmetaboliten – von einfachen 1-Alkylisochinolininen wie Anhalonidin **1**^[2] (Schema 1) zu komplexen polycyclischen Benzylisochinolininen wie



Schema 1. Bekannt^[2] biogenetischer Ursprung von Tetrahydroisochinolininen wie Anhalonidin über Pictet-Spengler-Kondensation und der vorgeschlagene neue Weg zu Dioncophyllin A **2**.

dem Analgetikum Morphin.^[3] Bislang wurde allgemein angenommen, dass sie sich alle von aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin ableiten – über einen gemeinsamen biosynthetischen Schlüsselschritt, die Pictet-Spengler-Kondensation von 2-Arylethylaminen wie Dopamin mit Aldehyden (oder α -Ketosäuren). Die letztlich beobachtete Strukturvielfalt der natürlich vorkommenden Isochinoline^[4] ergibt sich aus der Variation der Aldehydvorstufe und den anschließenden Transformationen des ursprünglich gebildeten Tetrahydroisochinolinins.

Die Strukturen von Dioncophyllin A **2** (Schema 1) und anderen Naphthylisochinolin-Alkaloiden^[5] passen allerdings nicht in dieses bislang allgemein anwendbare Biosyntheschema. Im Folgenden berichten wir über die Entdeckung

[*] Prof. Dr. G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, Dr. M. Grüne, Dr. J. Schlauer
 Institut für Organische Chemie
 Universität Würzburg
 Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)
 Fax: (+49) 931-888-4755
 E-mail: bringman@chemie.uni-wuerzburg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 251 und Graduiertenkolleg „NMR in vivo und in vitro“), vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Max-Buchner-Stiftung gefördert. Wir danken Dr. D. Marek und Dr. D. Moskau, Bruker AG, Fällanden (Schweiz), die uns die Kryoprobenkopftechnik zur Verfügung gestellt haben, Prof. L. Aké Assi, Centre National de Floristique, Abidjan (Elfenbeinküste), für eine lange und ergebnisreiche Kooperation auf dem Gebiet der Dioncophyllaceen- und Ancistrocladaceenpflanzen und Dr. D. Scheutzw, Universität Würzburg, für wertvolle Hinweise.

eines grundlegend andersartigen Biosyntheseweges zu 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-Alkaloiden in höheren Pflanzen: Wir konnten zweifelsfrei nachweisen, dass das gesamte Kohlenstoffgerüst von Dioncophyllin A aus *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae)^[6] über einen Acetat-Malonat-Weg aufgebaut wird.

Hinweise auf die chemische Plausibilität eines acetogenen Ursprungs von Naphthylisochinolin-Alkaloiden hatten sich bereits aus frühen biomimetischen Polyketid-Cyclisierungen ergeben,^[7] die zur effizienten Synthese beider Molekülteile aus identischen Vorstufen und damit zu ersten Totalsynthesen dieser Verbindungen geführt hatten.^[6]

Bei direkter Verfütterung von [¹⁴C]- und [¹³C]-markiertem Acetat und Malonat an kultivierte oder wild wachsende Pflanzen der Ancistrocladaceen waren keine nennenswerten Einbauraten erhalten worden. Zellkulturen von *Ancistrocladus heyneanus* (Ancistrocladaceae) bildeten große Mengen an Naphthochinonen und Tetralonen, die mit dem Naphthalinanteil der Alkaloide verwandt sind,^[8] aber nicht die Alkaloide selbst in ausreichenden Mengen. In jüngerer Zeit gelang es uns zum ersten Mal, Zellkulturen von *T. peltatum* anzulegen.^[9] Es zeigte sich, dass diese sowohl Naphthochinone als auch Naphthylisochinoline, vornehmlich Dioncophyllin A **2**, bilden können.

An diese Kulturen wurde die vermutliche Vorstufe Acetat in [¹³C₂]-markierter Form verfüttert. Nach einer zuvor optimierten Inkubationszeit wurde **2** isoliert und mit Hochfeld-NMR-Spektroskopie untersucht.^[10] Sein ¹H-entkoppeltes ¹³C-NMR-Spektrum, aufgenommen mit einem 600-MHz-Gerät, zeigte komplexe Signalmuster. Wegen überlappender Signale

und wegen des Grundlinienrauschens, das die ¹³C-Satelliten überlagerte, war es allerdings nicht möglich, endgültige Schlüsse zu ziehen. Wir haben diese Probleme durch Verwendung des 2D-INADEQUATE-Experiments^[11] zur Identifizierung direkter C-C-Konnektivitäten^[12] gelöst. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde zudem durch die Datenaufnahme mit einem Kryoprobekopf^[13] an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer ganz erheblich verbessert.

Das so erhaltene Spektrum (Abbildung 1) zeigt klar ausschließlich paarweise auftretende C-C-Korrelationen, die sich aus dem Einbau intakter Acetateinheiten ohne Bindungsbruch in Dioncophyllin A **2** ergeben.^[14] Bei näherer Betrachtung folgt daraus, dass sich die gesamten Kohlenstoffgerüste beider Molekülhälften von **2** von Acetat ableiten und dass sie – im Hinblick auf die einander entsprechenden isocyclischen Ringe – ein identisches Polyketidfaltungsmuster aufweisen. Ferner ist es offensichtlich, dass in beiden Molekülhälften Decarboxylierungen an homologen Positionen stattfinden, wobei schließlich das 1-Methyl- und das C-3'-Kohlenstoffatom zurückbleiben.^[15] Diese Ergebnisse beweisen eindeutig unser Biosynthese-Postulat^[6] eines acetogenen Ursprungs dieser Alkaloide.

Demgemäß werden, ausgehend von jeweils sechs Acetateinheiten, sowohl die Naphthalin- als auch die Isochinolinhälften von Dioncophyllin A über identische β -Polycarbonylvorstufen als Zwischenstufen divergent durch Cyclisierung und (im Fall des Isochinolinanteils) Stickstoffeinbau gebildet. Die so entstehenden Molekülhälften werden danach konvergent miteinander zum vollständigen Alkaloid Dioncophyllin A **2** verknüpft (Schema 2). Weitere Stoffwechselschritte

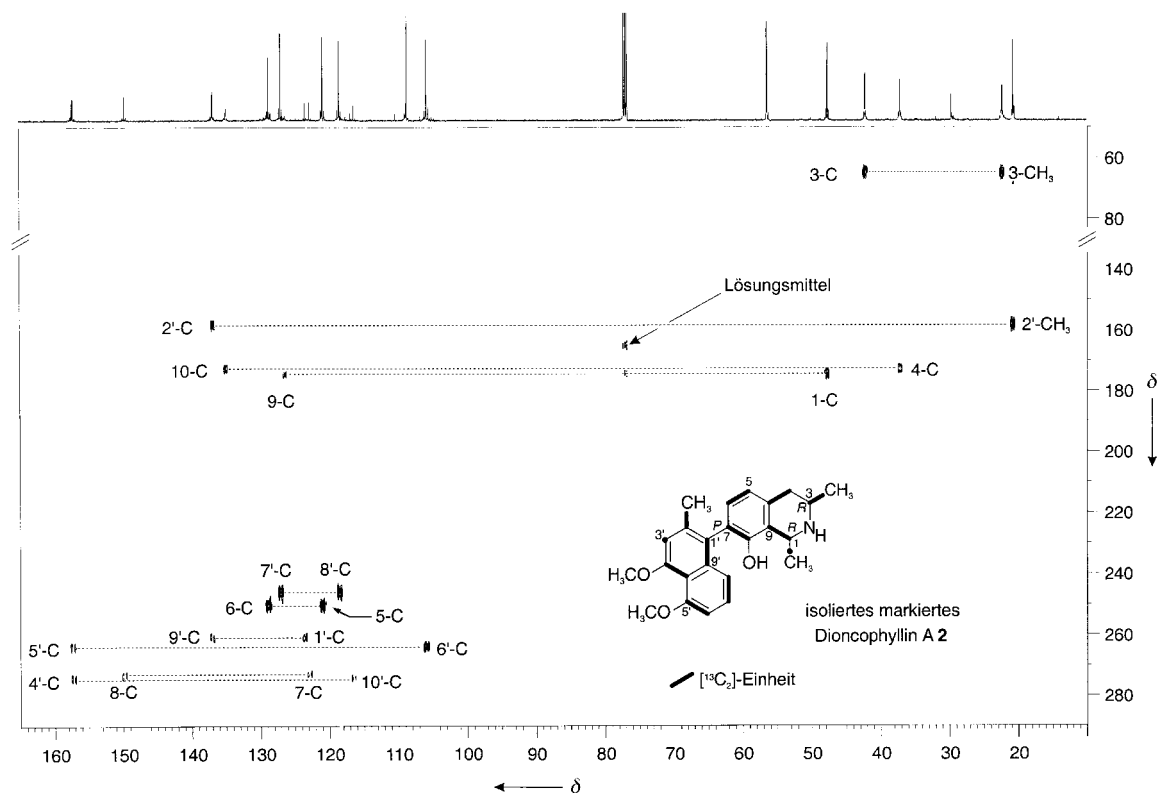
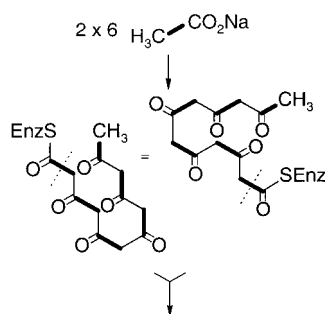


Abbildung 1. 2D-INADEQUATE-NMR-Spektrum ([²H]CHCl₃, 30 °C) von Dioncophyllin A **2** aus Bindungsmarkierungsexperimenten mit [¹³C₂]Natriumacetat; zu erkennen sind die paarweisen ¹³C-¹³C-Korrelationen der eingebauten [¹³C₂]-Einheiten.



Dioncophyllin A 2

Schema 2. Der neue Biosyntheseweg zu Isochinolinen über acetogenine Vorstufen.

wie Reduktionen, Oxidationen oder Methylierungen führen zur bekannten Vielzahl von Strukturen,^[6] die alle auf gemeinsamen Vorstufen beruhen.

Der nun erfolgreich nachgewiesene biogenetische Ursprung des Naphthylisochinolin-Alkaloids Dioncophyllin A 2 über den Acetat-Polymalonat-Weg bahnt den Weg für weitere Untersuchungen der Schlüsselschritte dieser interessanten Biosynthese und der entsprechenden Enzyme. Die Ergebnisse betonen ferner die große Bedeutung des Polyketidstoffwechsels,^[16] die bei Mikroorganismen bereits anerkannt ist,^[17] bei höheren Pflanzen aber bislang unterschätzt wurde.

Experimentelles

[1,2-¹³C]₂NaOAc (99 % Isotopenanreicherung) wurde von Promochem (Wesel, Deutschland) bezogen. Für die Verfütterung wurde eine sterilfiltrierte Lösung von 0,05 M markiertem NaOAc in destilliertem Wasser, eingestellt auf pH 5,8, verwendet.

Kalluskulturen von *T. peltatum* wurden angelegt wie in Lit. [9] beschrieben. Für die Fütterungsexperimente wurden sie auf dem gleichen Festmedium gehalten, das auch für allgemeine Erhaltungskulturen verwendet wurde. Über einen Zeitraum von zwei Monaten wurden insgesamt 250 mg markiertes NaOAc an 832 mg (Trockengewicht) Kallus verabreicht.

Das gefriergetrocknete Kallusmaterial wurde mit MeOH + 1 % 0,1 N HCl (v/v) extrahiert. Der Methanolextrakt wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, mit NH₃ neutralisiert und mit CH₂Cl₂ zurückextrahiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wurde die organische Phase mit Umkehrphasen-MPLC (Lobar C-18, MeOH/H₂O (70/30) + 0,1 % TFA (v/v), Normalphasen-MPLC (Lobar Si-60, CH₂Cl₂/MeOH (9/1) + 1 % NEt₃ (v/v) und präparativer HPLC über eine chirale Phase (Chiralcel OD, Hexan/*i*PrOH (8/2) + 1 % NEt₃ (v/v) gereinigt, was 1,7 mg **2** gab. Zu dieser Probe wurden 2,5 mg unmarkiertes **2** gemischt, die aus Wurzelmaterial von *T. peltatum*^[18] gewonnen worden waren. Die abschließende Reinigung durch Säulenchromatographie (desaktiviertes Kieselgel, CH₂Cl₂/MeOH (80/1)) lieferte 4,0 mg **2**.

Zur Zuordnung der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale wurden NMR-Spektren einer unmarkierten Probe in [²H]CHCl₃ auf einem Bruker-DMX600-Spektrometer aufgenommen, unter Einbezug von Standard-1D- und -2D-HMQC-, HMBC-, COSY-, TOCSY- und ROESY-NMR-Experimenten. Zur Ermittlung von C-C-Konnektivitäten wurde ein 2D-INADEQUATE-Spektrum^[19] (optimiert für ¹J(¹³C,¹³C) = 50 Hz) von markiertem Dioncophyllin A bei 125,7 MHz auf einem Bruker-DRX-500-Spektrometer bei einer Messzeit von 39 h aufgenommen. Für dieses Experiment wurde ein Prototyp eines 5-mm-¹³C-Kryoprobenkopfs mit einer ¹H-Entkopplungsspule verwendet, dessen Spulen und Vorverstärker auf 20 K gekühlt waren.

Eingegangen am 27. Dezember 1999 [Z14468]

- [1] T. M. Kutchan, H. Dittich, D. Bracher, M. H. Zenk, *Tetrahedron* **1991**, 47, 5945–5954.
- [2] J. Staunton, *Planta Med.* **1979**, 36, 1–20.
- [3] C. Szantáy, G. Dörnyei, G. Blaskó in *The Alkaloids*, Vol. 45 (Hrsg.: G. A. Cordell, A. Brossi), Academic Press, San Diego, **1994**, S. 128–232.
- [4] K. W. Bentley, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 367–388.
- [5] Solche – üblicherweise axialchiralen – Alkaloide aus den paläotropischen Pflanzenfamilien Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae sind wegen ihrer vielversprechenden Antimalaria- und Anti-HIV-Aktivitäten interessant.^[6]
- [6] G. Bringmann, F. Pokorny in *The Alkaloids*, Vol. 46 (Hrsg.: G. A. Cordell), Academic Press, New York, **1995**, S. 127–271.
- [7] G. Bringmann, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 205; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 200.
- [8] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Rückert, J. Schlauer, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8445–8448.
- [9] G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **2000**, 53, 339–343.
- [10] a) T. J. Simpson, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 195, 1–48; b) I. D. Spenser, R. L. White, *Angew. Chem.* **1997**, 97, 1096–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1033–1046.
- [11] J. Bauer, H. Buddrus, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 642–659; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 625–643.
- [12] W. Eisenreich, E. Kupfer, W. Weber, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 864–874.
- [13] P. Styles, N. F. Soffe, C. A. Scott, D. A. Cragg, F. Row, D. J. White, P. C. J. White, *J. Magn. Reson.* **1984**, 60, 397–404.
- [14] Die beobachteten ¹³C-Satelliten wiesen Signalintensitäten von 33–59 % bezogen auf ihre Zentralsignale auf.
- [15] Der acetogenine Ursprung der Kohlenstoffatome C-3' und 1-Me kann aus den hier beschriebenen Experimenten nicht direkt abgeleitet werden, kann aber aus den Inkorporationsmustern biogenetisch verwandter Verbindungen wie Isoshinanolon und Plumbagin^[8] geschlossen werden.
- [16] S. Eckermann, G. Schröder, J. Schmidt, D. Strack, R. A. Edrada, Y. Helariutta, P. Elomaa, M. Kotilainen, I. Kilpelainen, P. Proksch, H. Teeri-Teemu, J. Schröder, *Nature* **1998**, 396, 387–390.
- [17] C. W. Carreras, R. Pieper, C. Khosla, *Top. Curr. Chem.* **1997**, 188, 86–126.
- [18] G. Bringmann, M. Rübenacker, J. R. Jansen, D. Scheutzw, L. Aké Assi, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 639–642.
- [19] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2102–2104.