

## Rekonstitution von Kanalproteinen in (polymerisierten) ABA-Triblockcopolymern-Membranen\*\*

Wolfgang Meier,\* Corinne Nardin und  
Mathias Winterhalter

Lipiddoppelschichten sind das grundlegende Bauelement biologischer Membranen. Die Lipide dienen dabei als fluide Matrix für Membran- und membranassoziierte Proteine, die für Schlüsselfunktionen wie Signalübertragung oder Transport verantwortlich sind. Viele dieser Proteine sind für pharmakologische oder biotechnologische Anwendungen relevant. Für solche Anwendungen müssen sie in einem künstlichen Membransystem immobilisiert werden. Dadurch entsteht ein Biosensor, der beispielsweise für das schnelle Wirkstoff-Screening in der Pharmazie genutzt werden kann. Planare, frei stehende Filme bieten den großen Vorteil eines direkten Zugangs zu beiden Seiten der Membran. An ihnen können beispielsweise Leitfähigkeitsmessungen vorgenommen werden, um Transportvorgänge über die Membran zu untersuchen oder kleine Veränderungen an rekonstituierten Kanalproteinen zu detektieren. Ein altbekanntes Modellsystem frei stehender Filme sind die „schwarzen Lipidmembranen“, deren Name auf das Phänomen zurückzuführen ist, dass während des Ausdünnens der Membran die Intensität des reflektierten Lichts abnimmt und die Membran schließlich im reflektierten Licht schwarz erscheint. Natürliche Lipidmembranen haben über ihre biologische Funktion hinaus einzigartige Materialeigenschaften. So sind sie zur gleichen Zeit hochflexibel und mechanisch enorm stabil. Im Gegensatz dazu sind künstliche, frei stehende Lipidmembranen sehr empfindlich und daher von recht geringem technischem Interesse. Mechanisch stabile, festkörperunterstützte Lipidmembranen weisen oberhalb einer bestimmten Größe Defekte auf, weshalb Leitfähigkeitsmessungen als Detektionsmethode ausscheiden. Hier stellen wir eine neuartige Matrix für Membranproteine vor. Das verwendete Material ist mechanisch stabil, defektfrei und erlaubt die Herstellung von dichten, großflächigen, planaren Membranen.

Ähnlich wie konventionelle Lipide sind auch amphiphile Blockcopolymere in der Lage, membranartige Überstrukturen in wässriger Lösung zu bilden.<sup>[1-6]</sup> Daher können sie als höhermolekulare Analoga zu Lipiden aufgefasst werden. Darüber hinaus erlaubt die Breite der Blockcopolymerche-

mie eine Vielzahl neuartiger künstlicher Membranstrukturen, die mit konventionellen Lipiden nicht zugänglich sind. Beispielsweise lassen sich problemlos das Molekulargewicht, das Blocklängenverhältnis, die chemische Konstitution und selbst die molekulare Architektur dieser Moleküle verändern. Aufgrund ihrer größeren Dimensionen und langsameren Dynamik können amphiphile Blockcopolymere deutlich stabiler Aggregate als konventionelle Lipide bilden.<sup>[1-3, 5-8]</sup> Die Struktur solcher Aggregate lässt sich noch weiter stabilisieren, wenn die einzelnen Blockcopolymermoleküle durch kovalente Bindungen zu einem riesigen „Supermakromolekül“ vernetzt werden.<sup>[3, 4, 6]</sup>

Kürzlich berichteten wir über die Synthese eines neuartigen amphiphilen ABA-Triblockcopolymers. Dieses Polymer enthielt einen Mittelblock aus flexiblem, hydrophobem Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) und zwei Seitenblöcke aus wasserlöslichem Poly(2-methyloxazolin) (PMOXA). Zusätzlich waren die Enden dieses ABA-Triblockcopolymers mit Methacrylatgruppen funktionalisiert, die eine vernetzende Polymerisation ermöglichten. Das Phasenverhalten dieses PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymers ( $M_{n,PMOXA} = 1800$  Da,  $M_{n,PDMS} = 5400$  Da;  $M_w/M_n = 1.7$ ) im Temperaturbereich von 0 °C bis 90 °C ist in Abbildung 1 gezeigt. Bei

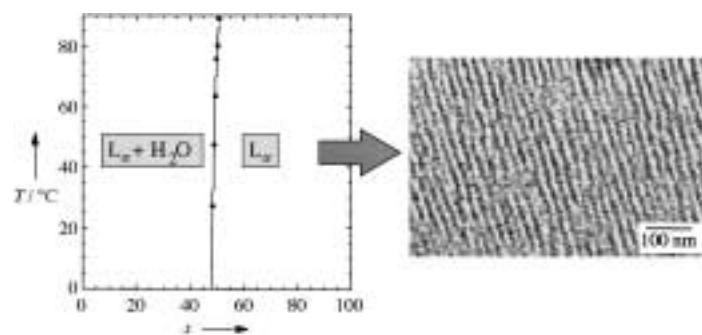


Abbildung 1. Phasendiagramm des PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymers in Wasser und Cryo-TEM-Aufnahme der lamellaren Phase bei  $x = 50$ .  $x$  = Polymeranteil im Wasser in Gew.-%,  $L_\alpha$  = lamellar flüssigkristalline Phase.

Blockcopolymerkonzentrationen über 48 Gew.-% bildet das System eine homogene, lamellar flüssigkristalline Phase. Diese lamellare Phase kann direkt mittels Kryotransmissions-elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) sichtbar gemacht werden. Die Proben werden dazu als dünne Filme (Dicke unter 500 nm) präpariert, indem ein Tropfen der Lösung auf ein Polymer-Kohlenstoff-beschichtetes TEM-Gitter gegeben und mit Filterpapier abgesaugt wird. Anschließend werden die Proben in flüssigem Ethan eingefroren. Die Aufnahmen werden bei einer Temperatur unter -160 °C angefertigt. Hierbei wird einige Mikrometer unterfokussiert, um den Phasenkontrast zu erhöhen. Eine repräsentative Cryo-TEM-Aufnahme der lamellaren Phase bei 50 Gew.-% Triblockcopolymer ist in Abbildung 1 ebenfalls dargestellt. Die dunklen, geordneten Linien stellen eine Seitenansicht der Triblockcopolymer-Membranen dar. Der lamellare Wiederholungsabstand lässt sich bei dieser Zusammensetzung zu ungefähr 20 nm und die Dicke des hydrophoben Bereichs, der durch die PDMS-Blöcke gebildet wird, zu etwa 10 nm abschätzen. Dies

[\*] Priv.-Doz. Dr. W. Meier, Dipl.-Phys. C. Nardin  
Institut für Physikalische Chemie  
Universität Basel  
Klingelbergstrasse 80, 4056 Basel (Schweiz)  
Fax: (+41) 61-2673855  
E-mail: wolfgang.meier@unibas.ch

Prof. Dr. M. Winterhalter  
IPBS-CNRS UPR 9062, Université Paul Sabatier  
31077 Toulouse (Frankreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Wir danken Dr. T. Hirt und Dr. J. Leukel für die Synthese des Triblockcopolymers, Dr. P. Van Gelder und Dr. F. Dumas für hilfreiche Diskussionen sowie T. Haefele für seinen Beitrag zum experimentellen Teil.

stimmt gut mit Kapazitätsmessungen an frei stehenden Blockcopolymer-Membranen überein, die ebenfalls 10 nm für die Dicke des hydrophoben Membranbereichs lieferten.<sup>[6]</sup> Unter 48 Gew.-% Polymer zeigt das System eine breite Mischungslücke, in der die lamellare Phase und überschüssiges Wasser koexistieren. Das heißt, Lamellen mit einem hydrophoben PDMS-Kern und einer hydratisierten PMOXA-Korona sind über den ganzen Zusammensetzungsbereich die grundlegende morphologische Einheit. Es muss betont werden, dass das Phasenverhalten des Triblockcopolymers sehr ähnlich dem typischer Doppelschichten-bildender Lipide wie Lecithin ist.<sup>[9]</sup>

Kürzlich konnten wir zeigen, dass dieses PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymer in verdünnter wässriger Lösung vesikuläre Strukturen aus sphärisch geschlossenen Triblockcopolymer-Membranen bildet.<sup>[3]</sup> Darüber hinaus konnten frei stehende Filme mit einer Fläche bis zu 1 mm<sup>2</sup> und einer Dicke von nur 10 nm hergestellt werden.<sup>[6]</sup> Interessanterweise lassen sich die Methacrylat-Endgruppen in diesen selbstorganisierten Überstrukturen unter Erhaltung der charakteristischen Membranstruktur polymerisieren. Die vernetzende Polymerisation führt dazu, dass die individuellen Triblockcopolymermoleküle kovalent miteinander verknüpft sind, was eine beträchtliche mechanische Stabilisierung der gesamten Membranstruktur zur Folge hat. Da die polymerisationsfähigen Gruppen in den Makromonomeren an die äußersten Enden der hydrophilen Blöcke gebunden sind, behält der hydrophobe Mittelblock trotz der Vernetzungsreaktion eine gewisse Mobilität in der Membran.<sup>[3, 6, 10, 11]</sup>

Konventionelle schwarze Lipidmembranen werden häufig als Modellsysteme zur Rekonstitution von Transmembranproteinen verwendet (Abbildung 2).<sup>[12, 15]</sup> Wir verwendeten eine an unser System angepasste Standardprozedur für konventionelle, niedermolekulare Lipide zur Herstellung planarer, frei stehender PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymer-Membranen mit einer Fläche von 0.2 mm<sup>2</sup>.<sup>[6, 13, 15]</sup> Blockcopolymer-Membranen sind wegen der größeren Dimensionen der zugrundeliegenden Blockcopolymermoleküle gewöhnlich dicker als konventionelle Lipiddoppelschichten. Das Hydrophil-hydrophob-Muster von Membranproteinen ist selbstverständlich bezüglich der dünneren biologischen Membranen optimiert, und es steht zu erwarten, dass beispielsweise der hydrophobe Teil von Kanalproteinen zu kurz ist, um durch eine Polymermembran zu passen. Es ist daher nicht evident, ob und inwieweit die Proteine ihre Aktivität in einer Blockcopolymer-Membran beibehalten. Allerdings erlauben die hohe Flexibilität und die konformative Freiheit der zugrundeliegenden Polymere eventuell eine Anpassung der Membran an die spezifischen geometrischen und dynamischen Bedürfnisse von Membranproteinen, ohne dass dabei viel Gibbs-Energie verloren geht. In einem solchen Fall sollte das Protein seine Funktion beibehalten.

Für die Rekonstitutionsexperimente verwendeten wir die wohlcharakterisierten bakteriellen Porine OmpF und Malto-porin als Modellsysteme.<sup>[14–17]</sup> Beide Porine sind Transmembranproteine, die trimere Kanäle in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien bilden. Die wassergefüllten Kanäle erlauben eine passive Diffusion kleiner gelöster Stoffe, wie Ionen, Nährstoffe oder auch Antibiotika, durch die Membran.

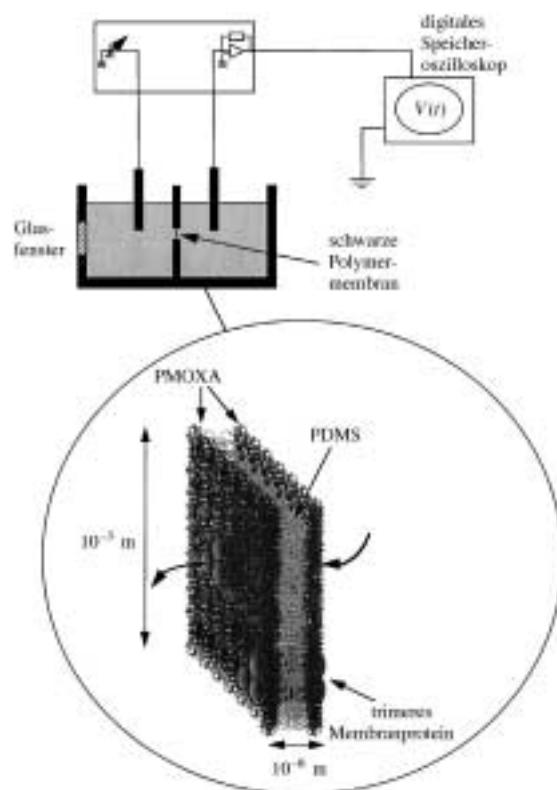


Abbildung 2. Schematische Darstellung einer proteinhaltigen (polymerisierten) PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymer-Membran (unten) und des experimentellen Aufbaus zur Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit über die Membran (oben).

Der Einbau solcher Kanäle in planare, frei stehende Filme kann daher direkt durch Leitfähigkeitsmessungen verfolgt werden.<sup>[12, 15]</sup>

In einer ersten Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob diese Membranproteine tatsächlich in einer vorher gebildeten PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymer-Membran rekonstituiert werden können. Dazu wurden etwa 1–5 µL einer Porinstammlösung (ca. 0.2–1.5 mg mL<sup>-1</sup> in 1proz. Octyl-Polyoxyethylen, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 100 mM NaCl und 2.5 mM Hepes, pH 7.6) auf beiden Seiten der Messkammer (jeweiliges Volumen: 5 mL) zugegeben. Der Porineinbau in die Blockcopolymer-Membran wurde durch ein an die Membran angelegtes Potential von 20 mV erleichtert. Die Leitfähigkeit über den frei stehenden Film wurde mit Ag/AgCl-Elektroden und einem Stromverstärker (BLM120, Biologic, Claix, Frankreich) gemessen (siehe Abbildung 2).

In Abbildung 3 ist der charakteristische zeitliche Verlauf der Leitfähigkeit über eine Triblockcopolymer-Membran in Gegenwart von OmpF gezeigt. Überraschenderweise steigt trotz der extremen Dicke der Polymermembran die Leitfähigkeit einige Minuten nach der Zugabe des Porins an. Dies entspricht völlig dem stufenweisen Einbau von OmpF-Trimeren in Lipidmembranen.<sup>[18]</sup> In natürlichen Lipidmembranen ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (Puffer, Temperatur) der Beitrag eines jeden OmpF-Trimers zur Gesamtleitfähigkeit 2 nS. Unter der Annahme, dass der Leitfähigkeitsbeitrag eines Porinkanals in der Blockcopolymer-Membran gleich dem in einer natürlichen Lipidmembran

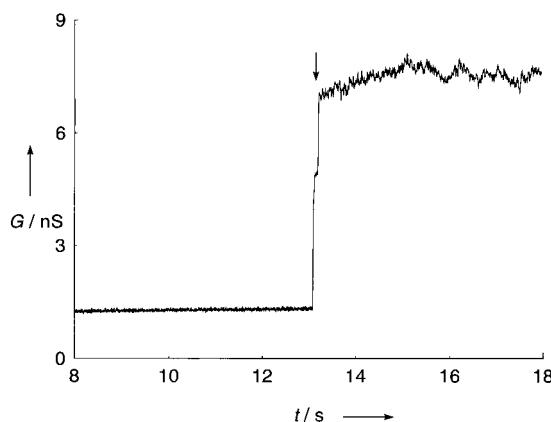


Abbildung 3. Charakteristischer zeitlicher Verlauf der elektrischen Leitfähigkeit  $G$  über eine PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymembran in Gegenwart des bakteriellen Porins OmpF. Der Pfeil markiert den OmpF-Einbau.

ist, folgt aus der Leitfähigkeitszunahme in Abbildung 3 eine Insertion von drei OmpF-Trimeren.

Zusätzlich versuchten wir, die OmpF-Kanäle durch Anlegen eines elektrischen Feldes zu schließen.<sup>[12, 19, 20]</sup> Dies gelang jedoch bis zu einer Spannung von 200 mV nicht. Ähnliche Ergebnisse wurden für OmpF in konventionellen, lösungsmittelhaltigen schwarzen Lipidfilmen berichtet.<sup>[20]</sup> Das Auftreten des spannungsinduzierten Verschließens hängt erheblich von den Membran-Herstellungsbedingungen ab. In weichen Membranen schließt sich das Porin OmpF nur bei sehr hohen Spannungen. Im Gegensatz dazu schließt es sich in steiferen, lösungsmittelfreien Membranen bereits bei etwa 100 mV. Die lösungsmittelfreie Herstellungsmethode führt jedoch bei PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymeren nicht zu stabilen Membranen und kann daher nicht verwendet werden.

Die PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymere tragen Methacrylatgruppen an beiden Enden, die in den Membranen UV-induziert radikalisch polymerisiert werden können. Dann sind die individuellen Triblockcopolymere durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft, wodurch die gesamte Überstruktur quasi eingefroren wird. Es ist naheliegend, dass die Bildung einer kovalent vernetzten Polymernetzwerkstruktur sowohl die laterale Beweglichkeit als auch die Konformation der Triblockcopolymermoleküle in der Membran beeinflusst. Daher kann nach der Polymerisation keine Proteininsertion mehr stattfinden.

In einer anderen Versuchsreihe setzten wir ein zweites bakterielles Porin ein, das LamB-Protein oder Maltoporin. Maltoporin bildet sehr enge Kanäle mit einer Leitfähigkeit von nur 150 pS in 1M KCl<sup>[15, 18]</sup> und enthält im Innern der wässrigen Kanäle stereospezifische Bindungsstellen für Maltooligosaccharide, die deren passive Diffusion durch die Membran erleichtern.<sup>[14–16, 21, 22]</sup> Mit dem in Abbildung 2 beschriebenen experimentellen Aufbau konnte direkt der Einbau des Maltoporins in die Polymermembran untersucht werden. Beim Titrieren mit Zuckern binden diese in Abhängigkeit von ihrer Konzentration im Innern der Kanäle und verschließen sie. Daher erhält man aus der Abnahme der Leitfähigkeit als Funktion der Zuckerkonzentration die Affinität des Proteins für Maltooligosaccharide.<sup>[15]</sup>

Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Leitfähigkeit einer Polymermembran beim Einbau von Maltoporinkanälen. Zum Vergleich ist die Leitfähigkeit einer Polymermembran ohne Kanäle gezeigt. Nach dem Einbau betrug die Leitfähigkeit ca. 4 nS. Da die Leitfähigkeit eines einzelnen Maltoporinkanals in 1M KCl unabhängig davon zu 150 pS bestimmt

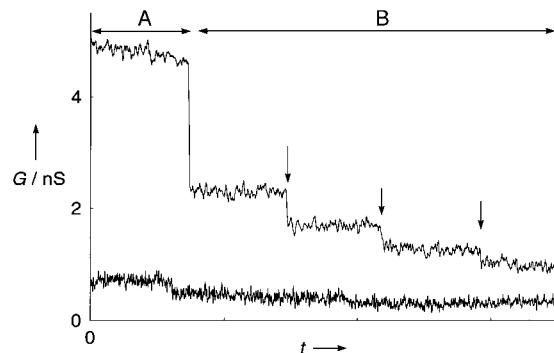


Abbildung 4. Elektrische Leitfähigkeit einer Maltoporin enthaltenden PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblockcopolymembran (obere Kurve) und einer proteinfreien Membran (untere Kurve) A) vor und B) nach der Polymerisation sowie bei wiederholter Zugabe von 6  $\mu\text{L}$  einer  $10^{-1}\text{M}$  Maltohexaose-Lösung (senkrechte Pfeile).

wurde, schließen wir auf den Einbau von ca. 27 Maltoporin-Trimeren. Anschließend wurde die Präparation polymerisiert. Überraschenderweise reduzierte sich die Leitfähigkeit. Dies könnte auf ein Schließen oder auf ein Verschwinden von einigen Kanälen durch die Vernetzungsreaktion hindeuten. Bei der Polymerisation entstehen Spannungen durch eine Kontraktion der wasserlöslichen Blöcke.<sup>[3, 6]</sup> Solcherart erzeugte Spannungen sollten sehr empfindlich von der Länge der wasserlöslichen Blöcke abhängen. Dies gilt es in Zukunft noch genauer zu untersuchen. Diese Hypothese wird auch durch den Leitfähigkeitsabfall während der Vernetzung der proteinfreien Membran unterstützt (siehe Abbildung 4). Vermutlich induziert die Vernetzungsreaktion eine Umstrukturierung des Filmes, wodurch kleinere Defekte ausheilen können.

Die Maltoporinkanäle in der polymerisierten Membran wurden anschließend mit Maltodextrin titriert. Abbildung 4 zeigt den Leitfähigkeitsabfall nach jeder Zugabe von 6  $\mu\text{L}$  einer  $10^{-1}\text{M}$  Maltohexaose-Lösung. Die Leitfähigkeitdaten wurden in der üblichen Weise<sup>[15, 16]</sup> ausgewertet und die Konstante für die Bindung der Maltohexaose an die Zuckerbindungstelle zu  $K = 7100 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Interessanterweise entspricht die Affinitätskonstante für Maltoporin in den polymerisierten Blockcopolymer-Membranen früheren Daten mit natürlichen Lipidmembranen.<sup>[12, 15]</sup> Offensichtlich wird die Konformation des Proteins nicht durch die umgebende Membran beeinflusst und seine Funktionalität bleibt vollständig erhalten.

Die vorliegende Untersuchung zeigt eindeutig, dass voll funktionsfähige Proteine in diese künstlichen, ultradünnen Filme eingebaut werden können. Dies ermöglicht es, die hohe Stabilität und die große Bandbreite von Blockcopolymer-Aggregaten mit den spezifischen Funktionen von Membranproteinen zu verbinden. Hierdurch eröffnet sich ein breites

Anwendungsgebiet für diese Protein-Polymer-Hybridmaterialien in Bereichen wie Diagnostik, Sensortechnik, Protein-Kristallisation und kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung.

Eingegangen am 11. Mai,  
ergänzte Fassung am 28. August 2000 [Z15109]

- [1] L. Zhang, A. Eisenberg, *Science* **1995**, *268*, 1728.
- [2] A. S. Jenekhe, X. L. Chen, *Science* **1998**, *279*, 1903.
- [3] C. Nardin, T. Hirt, J. Leukel, W. Meier, *Langmuir* **2000**, *16*, 1035.
- [4] Y.-Y. Won, H. T. Davis, F. S. Bates, *Science* **1999**, *283*, 960.
- [5] B. M. Fisher, Y.-Y. Won, D. S. Ege, J. C. M. Lee, F. S. Bates, D. E. Fisher, D. A. Hammer, *Science* **1999**, *284*, 1143.
- [6] C. Nardin, M. Winterhalter, W. Meier, *Langmuir*, im Druck.
- [7] C. Wang, R. J. Stewart, J. Kopecek, *Nature* **1999**, *397*, 417.
- [8] D. A. Hajduk, M. B. Kossuth, M. A. Hillmyer, F. S. Bates, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4269.
- [9] D. D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [10] T. Hirt, R. C. Baron, D. Lohman, W. Meier, WO-A 99/12059, **1999**.
- [11] W. Meier, *Macromolecules* **1998**, *31*, 2212.
- [12] R. Benz, K. Bauer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *176*, 1.
- [13] P. Mueller, D. P. Rudi, H. T. Tien, W. C. Wescott, *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 534.
- [14] H. Nikaido, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 435.
- [15] M. Winterhalter, *Colloids Surf. A* **1999**, *149*, 547.
- [16] T. Schirmer, T. A. Keller, Y.-F. Wang, J. P. Rosenbusch, *Science* **1995**, *267*, 512.
- [17] B. Eisenberg, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 117.
- [18] R. Benz, A. Schmid, R. E. W. Hancock, *J. Bacteriol.* **1985**, *162*, 722.
- [19] N. Saint, K. L. Lou, C. Widmer, M. Luckey, T. Schirmer, J. P. Rosenbusch, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20676.
- [20] J. H. Lakey, *FEBS Lett.* **1987**, *211*, 1.
- [21] Y.-F. Wang, R. Dutzler, P. J. Rizkallah, J. P. Rosenbusch, T. Schirmer, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 56.
- [22] R. Dutzler, Y.-F. Wang, P. J. Rizkallah, J. P. Rosenbusch, T. Schirmer, *Structure* **1996**, *4*, 128.

## Totalsynthese von Lankacyclinol\*\*

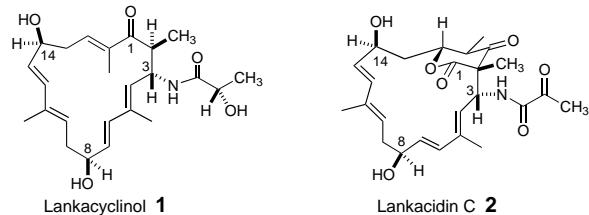
David R. Williams,\* Guillermo S. Cortez,  
Stéphane L. Bogen und Christian M. Rojas

Die aus den Gärmisschungen von *Streptomyces griseofuscus*, *S. violaceoniger* und *S. rochei* var. isolierten Lankacidine gehören zu einer einzigartigen Klasse von Antibiotika.<sup>[1]</sup> Sie zeigen starke Antitumoraktivität gegen L1210 Leukämie-, B16 Melanom- und feste Lymphosarkomzellen.<sup>[2]</sup> Lankacyclinol **1**, auch bekannt als T-2636 G,<sup>[3]</sup> ist ein seltenes Beispiel für einen natürlich vorkommenden siebzehngliedrigen Car-

[\*] Prof. D. R. Williams, G. S. Cortez, Dr. S. L. Bogen, C. M. Rojas  
Department of Chemistry, Indiana University  
800 East Kirkwood Avenue, Bloomington, IN 47405 (USA)  
Fax: (+1)812-855-8300  
E-mail: williamd@indiana.edu

[\*\*] Wir danken den National Institutes of Health (NIH) für die großzügige finanzielle Unterstützung (GM41560). G.S.C. dankt den NIH für ein Promotionsstipendium (GM18547). Ferner danken wir Dr. Tsuneaki Hida und Dr. Yoshio Kozai, Takeda Chemical Ltd. (Japan), für die zur Verfügung gestellte Probe natürlichen Lankacyclinols sowie für Kopien der Orginal-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren.

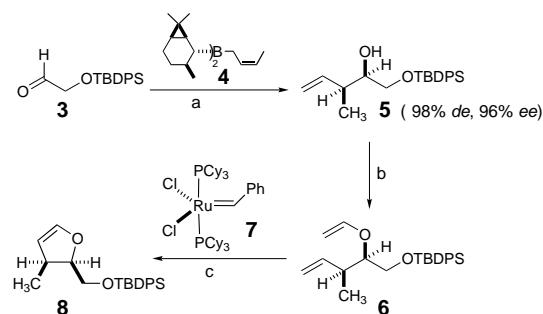
bocylus. Strukturell interessante Charakteristika sind zwei Pentadienylalkoholeinheiten sowie eine aus der Natur bisher unbekannte  $\beta$ -Amidoketoneinheit. Die relative Konfiguration von C3, C8 und C14 und die absolute Konfiguration wurden durch einen Vergleich der analytischen Daten von **1** mit Lankacidin C **2** zugeordnet, dessen Struktur bereits durch



eine Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt worden war.<sup>[4]</sup> Biosynthetische Studien ergaben, dass **2** durch enzymatische Reduktion des 2'-Oxopropionamids und nachfolgende basen-induzierte Decarboxylierung in Lankacyclinol überführt werden kann.<sup>[5]</sup>

Auch nach der von Kende et al. abgeschlossenen Totalsynthese von **2**<sup>[6]</sup> verblieb die Konfiguration von C2 in Lankacyclinol **1** unbestimmt. Während unserer Studien zum Aufbau von 4,5-Dihydrofuranen über Domino-Acylnitren-Insertionen und Wittig-Reaktionen, entwickelten wir einen neuen stereokontrollierten Zugang zu  $\beta$ -Amidoestern.<sup>[7]</sup> Die ermutigenden Ergebnisse dieser Vorarbeiten führten zur Planung einer Totalsynthese von **1**, wobei die zu erwartende Säure- und Basenlabilität sowie die unklare Konfiguration der Zielverbindung bei der Synthese zu berücksichtigen waren. Hier beschreiben wir die erste enantioselektive, konvergente Synthese von (–)-Lankacyclinol, die die abgebildete relative und absolute Konfiguration von **1** bestätigte.

Zunächst wurde das C1–C6 Fragment von **1** in Form des *cis*-disubstituierten Dihydrofurans **8** durch eine Ringschluss-Olefin-Metathese(RCM)-Strategie enantioselektiv hergestellt (Schema 1). Addition von (Z)-Crotyl-di-(2-isocaryanyl)-boran **4** (Brown et al.)<sup>[8]</sup> an den Aldehyd **3** ergab den *syn*-Homoallylalkohol **5** als einziges Diastereomer.<sup>[9]</sup> Die Umsetzung zum Vinylether **6** gelang mit Ethylvinylether in Gegenwart geringer Mengen an Quecksilbertrifluoracetat.<sup>[10]</sup> Unter Nutzung des von Grubbs et al. entwickelten Ruthenium-Katalysators **7**<sup>[11]</sup> wurde **6** in einer RCM-Reaktion zum 4,5-Dihydrofuran **8** cyclisiert. **8** entstand als einziges Produkt und



Schema 1. a) **4**,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , THF,  $-78^\circ\text{C}$ , 62%; b)  $\text{Hg}(\text{O}_2\text{CCF}_3)_2$ , Ethylvinylether,  $\text{Et}_3\text{N}$ , Rückfluss, 60%; c) **7**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Rückfluss, 48%. TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, Cy = Cyclohexyl.