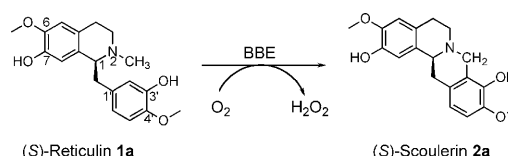


Biokatalytische enantioselektive oxidative C-C-Kupplung durch C-H-Aktivierung mit molekularem Sauerstoff**

Joerg H. Schrittwieser, Verena Resch, Johann H. Sattler, Wolf-Dieter Lienhart, Katharina Durchschein, Andreas Winkler, Karl Gruber, Peter Macheroux und Wolfgang Kroutil*

Reaktionen zur C-C-Bindungsknüpfung ermöglichen den Aufbau des Kohlenstoff-Grundgerüsts organischer Moleküle und bilden damit die Basis der organischen Synthesechemie. In jüngster Zeit hat insbesondere die organo- und metallkatalytische Bindungsknüpfung durch C-H-Aktivierung^[1] verstärkte Aufmerksamkeit erfahren.^[2] Unseres Wissens konnte bisher hingegen keine biokatalytische oxidative C-C-Verknüpfungsreaktion für die Synthese genutzt werden. Tatsächlich stellt die Biokatalyse zurzeit nur eine begrenzte Anzahl an Enzymen zur synthetischen C-C-Kupplung^[3] zur Verfügung – etwa Aldolasen,^[4] Transketolasen,^[4d,5] Hydroxynitril-Lyasen^[3,6] und Thiamindiphosphat(ThDP)-abhängige Enzyme.^[3,7] Einige weitere Enzymreaktionen zur Knüpfung von C-C-Bindungen werden erst seit kurzem erforscht.^[8] Bei allen erwähnten Enzymen handelt es sich um Lyasen oder Transferasen, nicht jedoch um Redox-Enzyme.^[9]

Ein Beispiel für eine C-C-kuppelnde Oxidoreduktase ist das Berberin-Brücken-Enzym (BBE) [EC 1.21.3.3], welches (S)-Reticulin (**1a**) – ein 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin – zum Berberin-Derivat (S)-Scoulerin (**2a**) umsetzt. Diese Reaktion stellt eine intramolekulare C-C-Verknüpfung dar, die über die Aktivierung der N-Methyl-Gruppe durch molekularen Sauerstoff verläuft (Schema 1).^[10] Das Enzym kommt vor allem in Pflanzen der Familie der Mohngewächse vor, wo es eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Benzophenantridin-Alkaloiden einnimmt.^[11,12] Erst vor kurzem ist es ge-

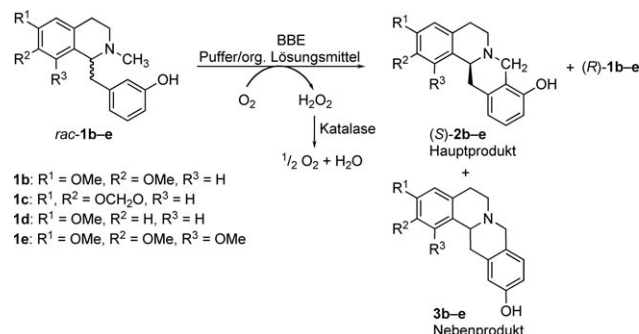


Schema 1. Von BBE in der Natur katalysierte Reaktion. Bildung der „Berberin-Brücke“ durch oxidative C-C-Kupplung unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff.

lungen, BBE aus *Eschscholzia californica* (Kalifornischer Goldmohn) in *Pichia pastoris*^[13] zu exprimieren, wodurch erstmals ausreichende Mengen des Enzyms für Kristallisationsstudien und die Untersuchung des Reaktionsmechanismus zur Verfügung standen.^[10,14]

BBE ist also in Bezug auf seine biochemischen Eigenschaften und den katalytischen Mechanismus eingehend untersucht worden. Das Potenzial dieses Biokatalysators für die präparative Umsetzung nichtnatürlicher Substrate wurde bisher hingegen noch nicht erforscht. Dabei schien es fraglich, ob nichtnatürliche Substanzen überhaupt umgesetzt werden können, da Pflanzenenzyme tendenziell als sehr substratspezifisch gelten. Darüber hinaus stehen keine Daten zur Enantioselektivität des Biokatalysators für die Umsetzung nichtnatürlicher Substrate zur Verfügung. Die biochemischen Untersuchungen mit BBE wurden im Mikrogramm-Maßstab^[10] bei niedriger Substratkonzentration (0.5 mM)^[15] durchgeführt. Für präparative Zwecke müssen sowohl Substratmenge als auch Substratkonzentration signifikant erhöht werden.

Für unsere Studien wurde das racemische Tetrahydroisochinolin *rac*-**1b** (Schema 2) als Modells substrat ausgewählt, da es vergleichsweise einfach in ausreichenden Mengen herge-



Schema 2. Biokatalytische enantioselektive oxidative C-C-Knüpfung durch BBE. Als Hauptprodukte der kinetischen Racematspaltung entstehen enantiomerenreines (R)-**2b-e** und (S)-**2b-e**.

[*] J. H. Schrittwieser,^[a] V. Resch,^[a] J. H. Sattler, W.-D. Lienhart, K. Durchschein, Prof. Dr. W. Kroutil
Institut für Chemie, Organische und Bioorganische Chemie
Karl-Franzens-Universität Graz
Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-380-9840
E-Mail: wolfgang.kroutil@uni-graz.at

Dr. A. Winkler, Prof. Dr. P. Macheroux
Institut für Biochemie, Technische Universität Graz
Petersgasse 12, 8010 Graz (Österreich)
Prof. Dr. K. Gruber
Institut für Molekulare Biowissenschaften
Karl-Franzens-Universität Graz
Humboldtstraße 50/III, 8010 Graz (Österreich)

[*] Beide Autoren haben gleichwertig zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Studie wurde durch den Österreichischen Fonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung finanziert (FWF Projekt P20903-N17 und P22115-N17). Wir danken der Europäischen Kommission (MC-ITN Biotrains, Grant agreement no.: 238531) für finanzielle Unterstützung. Christoph Göbl danken wir für die Aufnahme der CD-Spektren und Bernd Werner für die NMR-spektroskopischen Messungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006268> zu finden.

stellt werden konnte. Modellsubstrat **rac-1b** trägt an Position 7 eine Methoxygruppe statt der Hydroxygruppe in Reticulin und hat keinen 4'-Substituenten; es konnte in 40 % Ausbeute über fünf Stufen synthetisiert werden (siehe Hintergrundinformationen). Eine erste Messung der Reduktionsgeschwindigkeiten für **rac-1b** zeigte, dass BBE durchaus im Stande ist, dieses nichtnatürliche Substrat umzusetzen ($k_{\text{red}} = 2 \text{ s}^{-1}$). Die Identifizierung des Reaktionsprodukts als **2b** wurde durch eine erste präparative Umsetzung (8 mg) unter nichtoptimierten Bedingungen ermöglicht und erfolgte anhand eines Vergleichs des Massenspektrums mit Literaturwerten.^[16]

In der Folge wurde **rac-1b** als Substrat für weitere Optimierungstudien herangezogen. Dabei wurde schnell klar, dass bei höheren Substratkonzentrationen das als Beiprodukt gebildete H_2O_2 das Enzym inhibiert oder schädigt. Um dies zu verhindern, wurde Katalase eingesetzt, die das gebildete Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert.^[17]

Da das Substrat **rac-1b** nur eine geringe Löslichkeit in Puffer zeigte, wurden verschiedene wassermischbare, aber auch nichtmischbare organische Lösungsmittel für dessen Solubilisierung eingesetzt. Für diese Lösungsmittelstudie wurde eine Substratkonzentration von 2 g L^{-1} gewählt – eine erste Erhöhung der Konzentration im Vergleich zu den biochemischen Experimenten. Bei einem Lösungsmittelanteil von 10 % v/v zeigte BBE eine unerwartet hohe Stabilität in Gegenwart einer Reihe von Lösungsmitteln (Abbildung 1). So wurde etwa in Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) ein Umsatz von beinahe 50 % erreicht, was dem besten im einphasigen System erzielten Wert entspricht. Auch Dioxan, Formamid, Methanol, Ethanol und sogar Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) waren ohne weiteres einsetzbar, wobei Methanol bereits in vorangegangenen Studien zur Solubilisierung des natürlichen Substrats (*S*)-Reticulin verwendet worden war. Die Verwendung von Tetrahydrofuran (THF) führte hingegen zu niedrigen Umsätzen. Ähnlich niedrig waren die Umsätze bei Verwendung einiger mit Wasser nicht mischbarer Lösungsmittel wie etwa Dichlormethan oder Ethylacetat. Die besten Ergebnisse wurden mit Benzol, Toluol und Diphenylether im Zweiphasensystem erzielt. Schließlich wurde Toluol für die weiteren Studien ausgewählt, da es weniger toxisch ist als Benzol und die Aufar-

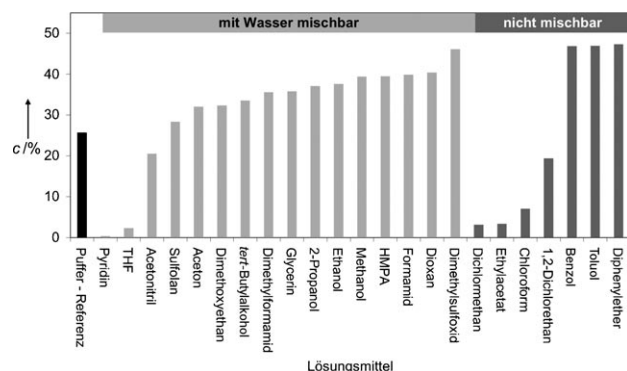


Abbildung 1. Umsatz *c* des Substrats **rac-1b** durch BBE in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (10 % v/v) und Puffer.

beitung des Reaktionsgemischs einfacher ist als bei einphasigen Lösungsmittelsystemen. Tests mit höheren Toluol-Anteilen zeigten, dass ein Umsatz von 50 % selbst bei 80 % v/v Toluol, 4 g L^{-1} Substratkonzentration und 0.1 g L^{-1} BBE innerhalb von 24 h erreicht wird (Abbildung 2). Sogar bei

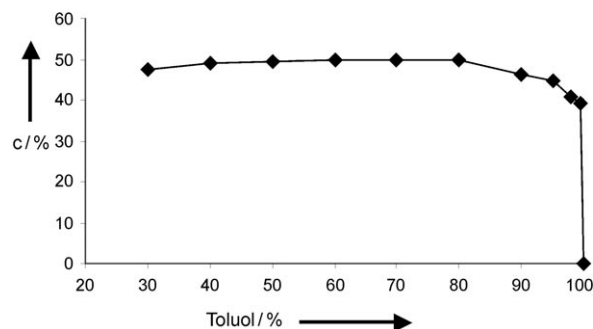


Abbildung 2. Enzymatische Umsetzung von Substrat **rac-1b** in Gegenwart von steigenden Mengen an Toluol (% v/v).

einem Volumenanteil von 99 % Toluol ist das Enzym noch erstaunlich aktiv, lediglich in wasserfreiem Toluol war kein Umsatz mehr feststellbar. Letzteres Experiment wurde mit gefriergetrocknetem BBE durchgeführt; zusätzliche Versuche zeigten, dass die Gefrier Trocknung dem Enzym nicht schadet: Nach Rehydratisierung zeigte es die volle Aktivität.

Beim Versuch, **2b** als Referenzmaterial über eine Pictet-Spengler-Reaktion^[18] aus N-demethyliertem **1b** und Formaldehyd herzustellen, wurde ein Gemisch der racemischen Regioisomere **2b** und **3b** erhalten, wobei das Verhältnis **2b**/**3b** laut GC-MS-Analyse bei etwa 40:60 lag. Die Produkte wurden in geringen Ausbeuten von 30 % bzw. 15 % isoliert. Die enzymatische Umsetzung ist somit nicht nur in Bezug auf die katalytische Reaktion bemerkenswert, sondern auch was die Regioselektivität betrifft. Dennoch wurde das Regioisomer **3b** auch bei den enzymatischen Umsetzungen im Rahmen der Lösungsmittel-Studie in geringer Menge gebildet. Der Anteil von **3b** am Gesamtprodukt war dabei von 1) der Art des Lösungsmittels und 2) der Lösungsmittelkonzentration abhängig. So war das Verhältnis von **2b** zu **3b** bei Einsatz von Toluol (99.4 % v/v) etwa 96:4, während in Gegenwart von Acetonitril (10 % v/v) beinahe gleiche Mengen an Produkt **2b** und Regioisomer **3b** entstanden.^[17]

Nachdem mit Toluol ein geeignetes Cosolvens zur Verfügung stand, wurden weitere Reaktionsparameter optimiert, wie etwa das Puffersalz und dessen Konzentration, der pH-Wert, die Temperatur, die Schüttelgeschwindigkeit und die eingesetzte Menge an Katalase. Als beste Wahl erwies sich ein 10 mM Tris-HCl-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid) bei pH 9.0 mit Zusatz von 10 mM MgCl_2 . Die Reaktionen wurden im Dunklen durchgeführt,^[19] und es wurde Katalase, gereinigtes BBE (1 g L^{-1}) und ein zweiphasiges Toluol/Puffer-System 70:30 v/v bei einer Substratkonzentration von 20 g L^{-1} eingesetzt. Eine Zeitstudie zeigte, dass die Reaktion unter diesen Bedingungen nach 12 h ihren maximalen Umsatz von 50 % erreicht. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von $20 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und einer Turnover-Zahl von 1850.

Bei keiner der Reaktionen mit dem racemischen Substrat *rac*-**1b** stieg der Umsatz über 50 %, was bereits darauf hindeutet, dass das Enzym außerordentlich enantioselektiv arbeitet. In der Tat belegte die Analyse der Reaktionen mittels HPLC auf einer chiralen stationären Phase, dass nur ein Substrat-Enantiomer umgesetzt wurde, während das zweite nicht reagiert hatte; dementsprechend wurde auch ein enantiomerenreines Produkt erhalten. BBE katalysiert also die kinetische Racematspaltung von *rac*-**1b**, wobei die Produkte (*S*)-**2b** und (*R*)-**1b** in Enantiomerenüberschüssen > 97 % (HPLC) gebildet werden. Für die Enantioselektivität *E* des Enzyms ergibt sich demnach ein Wert > 200.

Um festzustellen, ob auch andere racemische Benzylisochinolin-Derivate umgesetzt werden können, wurden die Substrate **1c–e** synthetisiert und in der BBE-katalysierten Ringschlussreaktion getestet. Im Substrat *rac*-**1c** sind die beiden Sauerstoffatome am Isochinolinring durch eine Methylenbrücke verknüpft, während *rac*-**1d** nur eine und *rac*-**1e** drei Methoxygruppen am Isochinolinring trägt. Alle drei Substanzen erwiesen sich als gute Substrate und wurden enantioselektiv zu den entsprechenden Berbin-Derivaten umgesetzt. Der Großteil der gebildeten Produkte ist in der Literatur weder in racemischer noch in enantiomerenreiner Form beschrieben worden. Die Verbindungen **1c** und **2c** sind nur als Racemate bekannt, während eine geringe Menge (5 mg) des Produkts **2b** (Trivialname: Manibacatin) aus der Rinde von *Anila canelilla* isoliert worden war.^[16] Die biokatalytische C-C-Verknüpfung durch BBE ermöglicht daher einen Zugang zu neuartigen, enantiomerenreinen Alkaloiden.

Um die Eignung dieser biokatalytischen Methode für den präparativen Maßstab aufzuzeigen, wurden alle vier nicht-natürlichen Substrate (**1b–e**) in 500-mg-Ansätzen umgesetzt. In allen Fällen verlief die kinetische Racematspaltung vollständig und mit hoher Enantioselektivität, sodass die Produkte (*R*)-**1b–e** und (*S*)-**2b–e** in guten bis hervorragenden Ausbeuten und exzellenten Enantiomerenreinheiten isoliert werden konnten (Tabelle 1).

Benzylisochinoline und Berbine sind zwei eng verwandte Gruppen von Alkaloiden,^[21] die eine Reihe von biologischen Aktivitäten aufweisen. So wurde bei 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin eine krampflösende^[22] und blutdruck-

senkende Wirkung^[23] festgestellt. Berbine zeigen zahlreiche Effekte, wie etwa analgetische, sedative, hypnotische, blutdrucksenkende oder muskelentspannende Wirkung.^[24] 1-Chlorscoulerin wird sogar als aussichtsreiche Leitsubstanz für die Entwicklung von Schizophrenie-Therapeutika betrachtet.^[25]

Die chemische asymmetrische Synthese dieser wichtigen Alkaloide wurde anhand verschiedenster Strategien durchgeführt, doch im Allgemeinen sind mehrstufige, die Ausbeuten stark einschränkende Reaktionssequenzen nötig.^[26] Auch finden sich unter den publizierten Synthesen nur wenige katalytische Varianten, etwa die metallkatalytische asymmetrische Hydrierung,^[27] die intramolekulare allylische Aminierung^[28] sowie metall- oder organokatalytische asymmetrische Alkylierungsreaktionen.^[29] Trotz der enormen Fortschritte in diesen Bereichen konnten nur selten enantiomerenreine Substanzen (*ee* > 99 %) erhalten werden. Das hier vorgestellte Konzept ermöglicht einen völlig neuen Zugang zu enantiomerenreinen Benzylisochinolin und Berbinen.

Das Berberin-Brücken-Enzym aus dem kalifornischen Goldmohn wurde für eine hochgradig enantioselektive biokatalytische oxidative C-C-Verknüpfung eingesetzt, durch welche neue enantiomerenreine Berbin-Derivate und Tetrahydrobenzylisochinoline hergestellt werden konnten. Die beschriebene Reaktion, die Sauerstoff als Oxidationsmittel verwendet und unter milden Bedingungen verläuft, wurde im Maßstab von 500 mg durchgeführt. Sie ist ein Schritt hin zu sauberen und selektiveren organisch-chemischen Umsetzungen und erweitert das Repertoire der biokatalytischen C-C-Kupplungen.^[30]

Experimentelles

Repräsentative präparative C-C-Kupplung: Substrat **1b** (500 mg, 1.6 mmol, Endkonzentration: 20 g L⁻¹ = 65 mM) wurde in Toluol (17.5 mL) gelöst und mit Puffer (7.5 mL, Tris-HCl, 10 mM, pH 9, 10 mM MgCl₂), welcher BBE (1.5 mL Enzymlösung, Endkonzentration: 1 g L⁻¹ = 0.017 mM) und Katalase (125 mg Roh-Präparation) enthielt, gemischt. Der Reaktionsansatz wurde in einem Rundkolben (50 mL) unter Lichtausschluss mittels eines Inkubator Mini Shaker (VWR, radial, Orbit 3 mm) bei 200 rpm und 40 °C 24 h geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Phasentrennung gestoppt, und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 × 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (Na₂SO₄), und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 60, 0.040–0.063 mm, Merck, Lot.: 1.09385.9025 mobile Phase: CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH = 97/2/1) gereinigt, wobei 207 mg (*S*)-**1b** (42 % Ausbeute, > 97 % *ee*) und 249 mg (*S*)-**2b** (49 % Ausbeute, > 97 % *ee*) erhalten wurden (Details zur Substanzcharakterisierung, wie NMR-Spektren, HPLC-Daten, Drehwerte, HRMS oder CD-Spektren, sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen).

Eingegangen am 6. Oktober 2010

Online veröffentlicht am 18. Januar 2011

Tabelle 1: Präparative oxidative C-C-Verknüpfung durch BBE.^[a]

Subst.	<i>c</i> ^[b] [%]	(<i>R</i>)- 1 [mg (%)]	<i>ee</i> (1) ^[c] [%]	(<i>S</i>)- 2 [mg (%)]	<i>ee</i> (2) ^[c] [%]	<i>E</i> ^[d]
1b	50	249 (50)	> 97	207 (42)	> 97	> 200
1c	50	231 (46)	> 97	155 (31)	> 97	> 200
1d	50	181 (36)	> 97	177 (36)	> 97	> 200
1e	50	237 (47)	> 97	194 (39)	> 97	> 200

[a] Die Reaktionen wurden unter Lichtausschluss in Toluol/Puffer 70:30, pH 9 durchgeführt; Substratkonzentration 20 g L⁻¹, BBE 1 g L⁻¹, Katalase 0.05 g L⁻¹; 40 °C, 24 h. [b] Der Umsatz wurde mittels HPLC auf einer achiralen stationären Phase (C18) bestimmt. Je nach Substrat wurden 4–10 % der Regioisomere **3b–e** gebildet: **1b**: 8 %, **1c**: 7 %, **1d**: 4 %, **1e**: 10 %. [c] Der Enantiomerenüberschuss wurde mittels HPLC auf einer chiralen stationären Phase bestimmt. [d] Die Enantioselektivität *E* wurde aus den Enantiomerenüberschüssen von Substrat und Produkt ermittelt.^[20]

Stichwörter: Alkaloide · Asymmetrische Synthesen · C-C-Kupplungen · C-H-Aktivierung · Enzymkatalyse

- [1] a) W. Liu, H. Cao, A. Lei, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2048–2052; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2004–2008; b) K. Godula, D. Sames, *Science* **2006**, *312*, 67–72.
- [2] a) Y. Wei, H. Zhao, J. Kan, W. Su, M. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2522–2523; b) Z.-H. Guan, Z.-Y. Yan, Z.-H. Ren, X.-Y. Liu, Y.-M. Liang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2823–2825; c) M. Chen, X. Zheng, W. Li, J. He, A. Lei, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4101–4103; d) F. Benfatti, M. G. Capdevila, L. Zoli, E. Benedetto, P. G. Cozzi, *Chem. Commun.* **2009**, 5919–5921; e) Z. Li, L. Cao, C.-J. Li, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6625–6627; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6505–6507.
- [3] M. Pohl, A. Liese in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry* (Hrsg.: R. N. Patel), CRC, Boca Raton, **2007**, S. 661–676.
- [4] a) P. Clapés, W.-D. Fessner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 154–167; b) D. G. Gillingham, P. Stallforth, A. Adibekian, P. H. Seeberger, D. Hilvert, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 102–105; c) S. M. Dean, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1308–1320; d) W.-D. Fessner, S. Jennewein in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry* (Hrsg.: R. N. Patel), CRC Press, Boca Raton, **2007**, S. 363–400.
- [5] R. Wohlgenuth, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *61*, 23–29.
- [6] a) J. Holt, U. Hanefeld, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 15–37; b) F. Effenberger, S. Förster, C. Kobler in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry* (Hrsg.: R. N. Patel), CRC, Boca Raton, **2007**, S. 677–698; c) T. Purkarthofer, W. Skranc, C. Schuster, H. Griengl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 309–320.
- [7] Beispiele: a) C. Dresen, M. Richter, M. Pohl, S. Ludeke, M. Müller, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6750–6753; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6600–6603; b) P. Lehwald, M. Richter, C. Röhr, H.-w. Liu, M. Müller, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2439–2442; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2389–2392; c) M. Müller, D. Gocke, M. Pohl, *FEBS J.* **2009**, *276*, 2894–2904.
- [8] Beispiele: mit Methyltransferasen: a) H. Stecher, M. Teng, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl, M. Gruber-Khadjawi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9710–9712; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9546–9548; b) Hydroxynitril-Lyase-katalysierte Henry-Reaktion: T. Purkarthofer, K. Gruber, M. Gruber-Khadjawi, K. Waich, W. Skranc, D. Mink, H. Griengl, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3532–3535; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3454–3456; c) Ringöffnung von Epoxiden mit Cyanid katalysiert durch Halohydrin-Dehalogenasen: M. M. Elenkov, B. Hauer, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 579–585; d) Peroxidase-katalysierte Kupplung von Festphasen-gebundenen *ortho*-Methoxyphenolen: S. Antonietti, J. S. Dordick, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1119–1124; e) enzymkatalysierte aromatische Prenylierung: L. A. Wessjohan, B. Sontag, M.-A. Desoy in *Bioorganic Chemistry* (Hrsg.: U. Diederichsen, T. K. Lindhorst, B. Westermann, L. A. Wessjohann), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 79–88.
- [9] Ausschließlich Laccasen wurden für die Aktivierung von großteils phenolischen Verbindungen für die radikalische C-C-Knüpfung eingesetzt. Kürzlich publizierte Aufsätze: a) S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219–226; b) S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187–1209.
- [10] A. Winkler, A. Lyskowski, S. Riedl, M. Puhl, T. M. Kutchan, P. Macheroux, K. Gruber, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 739–741.
- [11] S. Paul, N. Naotaka, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2577–2583.
- [12] E. Rink, H. Boehn, *FEBS Lett.* **1975**, *49*, 396–399.
- [13] A. Winkler, F. Hartner, T. M. Kutchan, A. Glieder, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21276–21285.
- [14] A. Winkler, K. Motz, S. Riedl, M. Puhl, P. Macheroux, K. Gruber, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19993–20001.
- [15] A. Winkler, M. Puhl, H. Weber, T. M. Kutchan, K. Gruber, P. Macheroux, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1092–1097.
- [16] J.-M. Oger, A. Fardeau, P. Richomme, H. Guinaudeau, A. Fournet, *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 1128–1135.
- [17] Detaillierte Ergebnisse der Optimierung und der Lösungsmittelstudie werden zu gegebener Zeit veröffentlicht werden.
- [18] E. D. Cox, J. M. Cook, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797–1842.
- [19] Die Umsetzungen wurden im Dunkeln durchgeführt, um sowohl photoinduzierte Abbaureaktionen gering zu halten (a) W. Holzer, J. Shirdel, P. Zirk, A. Penzkofer, P. Hegemann, R. Deutzmann, E. Hochmuth, *Chem. Phys.* **2005**, *308*, 69–78) als auch andere photoinduzierte Nebenreaktionen, wie die Reduktion von Flavin zu vermeiden (b) M. Mifsud Grau, J. C. van der Toorn, L. G. Otten, P. Macheroux, A. Taglieber, F. E. Zilly, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3279–3286).
- [20] J. L. L. Rakels, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1051–1056.
- [21] a) M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 719–721; b) J. Keasling, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 524–525; c) K. W. Bentley, *The Isoquinoline Alkaloids*, Harwood, Amsterdam, **1998**.
- [22] M. L. Martin, M. T. Diaz, M. J. Montero, P. Prieto, L. S. Roman, D. Cortes, *Planta Med.* **1993**, *59*, 63–67.
- [23] S. Chulia, M. D. Ivorra, C. Lugnier, E. Vila, M. A. Noguera, P. D'Ocon, *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *113*, 1377–1385.
- [24] a) J.-M. Gao, W.-T. Liu, M.-L. Li, H.-W. Liu, X.-C. Zhang, Z.-X. Li, *J. Mol. Struct.* **2008**, *892*, 466–469, zit. Lit.; b) W. J. Eisenreich, G. Hofner, F. Bracher, *Nat. Prod. Res.* **2003**, *17*, 437–440; c) Y. Kashiwada, A. Aoshima, Y. Ikeshiro, Y.-P. Chen, H. Furukawa, M. Itoigawa, T. Fujioka, K. Mihashi, L. M. Cosentino, S. L. Morris-Natschke, K.-H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 443–448; d) F. N. Ko, J. H. Guh, S. M. Yu, Y. S. Hou, Y. C. Wu, C. M. Teng, *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112*, 1174–1180.
- [25] J. Li, G. Jin, J. Shen, R. Ji, *Drugs Future* **2006**, *31*, 379–384.
- [26] M. Chrzanowska, M. D. Rozwadowska, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3341–3370.
- [27] a) P.-C. Yan, J.-H. Xie, G.-H. Hou, L.-X. Wang, Q.-L. Zhou, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3243–3250; b) S.-M. Lu, Y.-Q. Wang, X.-W. Han, Y.-G. Zhou, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2318–2321; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2260–2263; c) M. Kitamura, Y. Hsiao, M. Ohta, M. Tsukamoto, T. Ohta, H. Takaya, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 297–310.
- [28] C. Shi, I. Ojima, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8563–8570.
- [29] a) C. Dubs, Y. Hamashima, N. Sasamoto, T. M. Seidel, S. Suzuki, D. Hashizume, M. Sodeoka, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5859–5871; b) N. Sasamoto, C. Dubs, Y. Hamashima, M. Sodeoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14010–14011; c) A. M. Taylor, S. L. Schreiber, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 143–146; d) S. Wang, C. T. Seto, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3979–3982; e) T. Itoh, M. Miyazaki, H. Fukuoka, K. Nagata, A. Ohsawa, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1295–1297.
- [30] a) J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321–327; b) D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66–73; c) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694–1697.