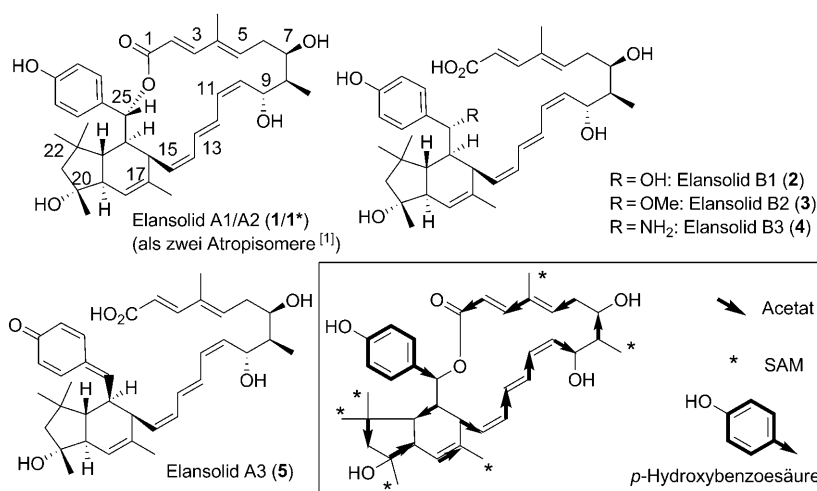


Molekulare Grundlage für die Biosynthese von Elansolid: Beweise für eine einzigartige, durch ein Chinonmethid initiierte intramolekulare Diels-Alder-Cycloaddition/Makrolactonisierung**

Richard Dehn, Yohei Katsuyama, Arne Weber, Klaus Gerth, Rolf Jansen, Heinrich Steinmetz, Gerhard Höfle, Rolf Müller* und Andreas Kirschning*

Die Elansolide A1/A2 (**1/1***),^[1] B1–B3 (**2–4**) und das strukturell ungewöhnliche und hochreaktive Elansolid A3 (**5**; Schema 1)^[2] sind Metaboliten des gleitenden Bakteriums *Chitinophaga sancti* (ehemals *Flexibacter spec.*). Während Elansolid A2 (**1***) antibiotische Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien im Bereich von 0.2 bis 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und auch cytotoxische Eigenschaften gegenüber L929-Mausfibroblasten mit einem IC_{50} -Wert von 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zeigt, ist das Atropisomer Elansolid A1 (**1**) deutlich weniger aktiv.^[2,3] Die Elansolide enthalten einen Bicyclo[4.3.0]nonan-Kern, der im Fall der Elansolide A1/A2 Teil eines 19-gliedrigen Makrolactonrings ist. Elansolid B1 ist die seco-Säure der Elansolide A1/A2. Die Elansolide B2 und B3 sind dagegen Aufarbeitungsartefakte, die aus der nucleophilen



Schema 1. Die Elansolide A1/A2 (**1/1***), A3 (**5**) und B1–B3 (**2–4**) sowie Ergebnisse aus Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -markierten Vorstufen. SAM: S-Adenosylmethionin.

[*] Dr. R. Dehn,^[1] A. Weber, Prof. Dr. A. Kirschning
Institut für Organische Chemie und Biomolekulares Wirkstoff-
zentrum (BMWZ), Leibniz Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
Fax: (+49) 511-762-3011
E-Mail: andreas.kirschning@oci.uni-hannover.de

Dr. Y. Katsuyama,^[1] Prof. Dr. R. Müller
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Helmholtz-Institut für
Pharmazeutische Forschung Saarland und Pharmazeutische Bio-
technologie, Universität des Saarlandes, Postfach 151150, 66041
Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-70201
E-Mail: rom@helmholtz-hzi.de

Dr. K. Gerth, Dr. R. Jansen, H. Steinmetz, Prof. Dr. R. Müller
Mikrobielle Wirkstoffe, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)

Prof. Dr. G. Höfle
Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
Braunschweig (Deutschland)

[*] Diese Autoren trugen in gleichem Umfang zu dieser Arbeit bei.

[**] Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ki 397/16-1) gefördert. R.D. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Doktorandenstipendium und Y.K. der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Postdoktorandenstipendium. Wir danken Shwan Rachid für die Erzeugung einer Cosmid-Genbank und Silke C. Wenzel für wichtige Kommentare bei der Erstellung des Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006880> zu finden.

Addition von Methanol bzw. Ammoniak an das Chinonmethidgerüst in Elansolid A3 resultieren (Schema 1). Zu erwähnen ist, dass das ungewöhnliche Bicyclo[4.3.0]nonan-Gerüst aus einer intramolekularen Diels-Alder(IMDA)-Cycloaddition resultieren könnte.^[4]

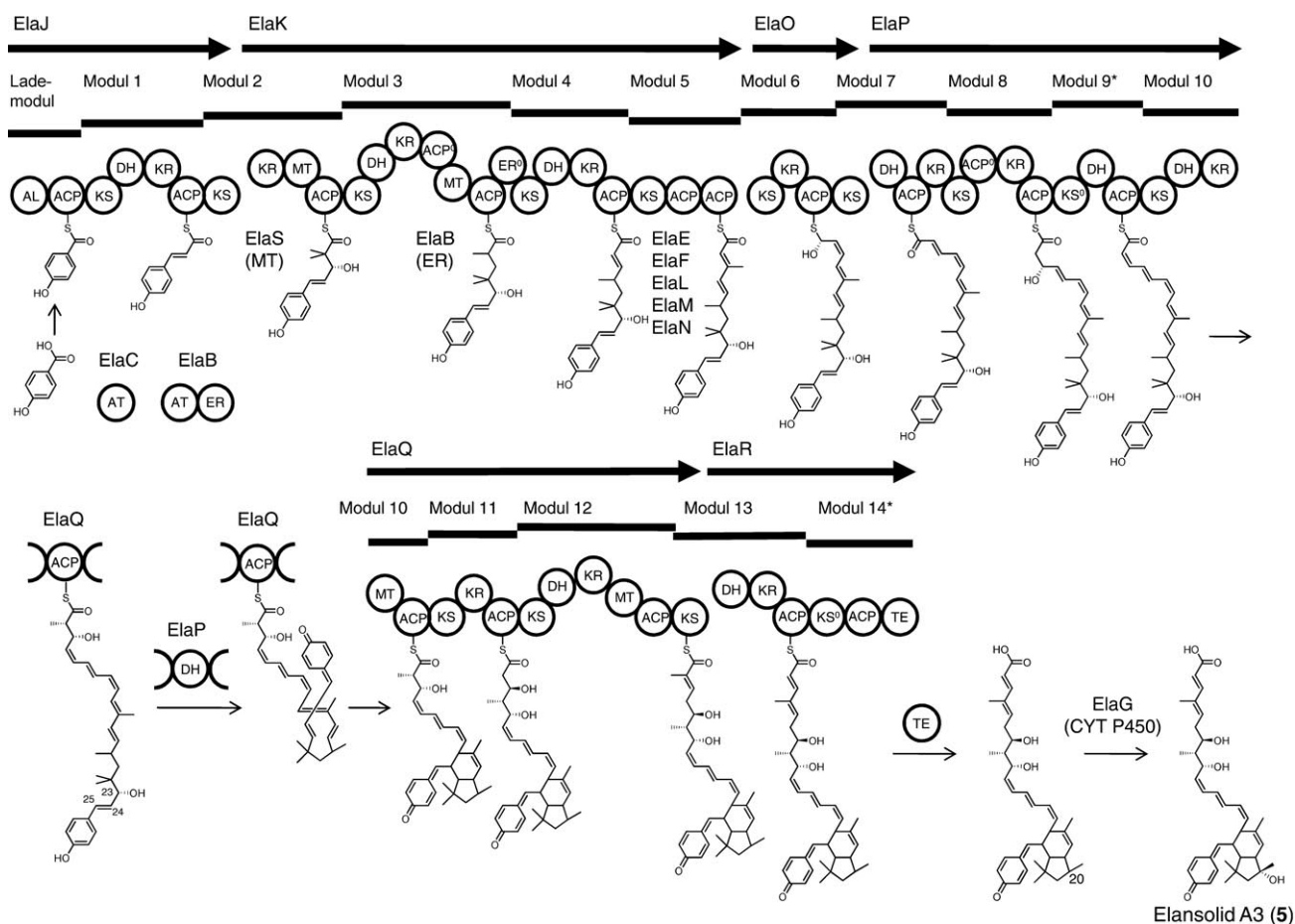
In dieser Arbeit beschreiben wir die Identifizierung des Biosynthese-Genclusters der Elansolide und geben zudem Informationen über die einzigartigen Aspekte der Elansolidbiosynthese. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der vorgeschlagenen IMDA-Cycloaddition und der Makrolactonisierung. Konzeptionell nähern wir uns dieser Thematik auf zwei Wegen: a) Identifizierung und detaillierte Analyse der Biosynthese durch eine Polyketidsynthese inklusive Fütterungsexperimenten und b) Synthese von Modellvorstufen und Synthesestudien zur IMDA-Cycloaddition.

Erste Fütterungsexperimente mit isotoopenmarkierten Vorstufen zeigten, dass sich die Elansolide auf Polyketide zurückführen lassen (Schema 1), die eine von Chorismat abgeleitete *p*-Hydroxybenzoesäure als Starteinheit nutzen (siehe Tabelle S3 und Abbildung S9 in den Hintergrundinformationen).

Als Nächstes wollten wir auf molekularer Ebene Einblicke in die Elansolidbiosynthese erhalten, indem wir den Biosynthese-Gencluster in *Chitinophaga sancti* identifizierten. Da dieser Bakterientyp bisher nicht als Quelle für Polyketidsynthase(PKS)-Gencluster bekannt war, erzeugten wir zunächst eine Cosmid-Genbank. Unser Produzentenstamm

wurde auf die Anwesenheit von Polyketidsynthasen geprüft, und der Elansolidbiosynthese-Gencluster wurde sequenziert (Abbildung S1A, Tabelle S1). Während dieser Studie stellte sich heraus, dass das Genom des über öffentliche Stammsammlungen verfügbaren Stamms *Chitinophaga pinensis* DSM2588 bereits sequenziert war und eine sehr große Genhomologie aufwies (zu 84.6% identische Nucleotidsequenz wie beim Gencluster von *C. sancti*; Tabelle S2). Wir fanden weiterhin, dass auch dieser Stamm Elansolide produziert, allerdings mit einem wesentlich geringeren Produktionstiter (Daten nicht gezeigt). Die gefundene Biosynthesemaschine erwies sich als eine *trans*-AT-PKS, die alle Funktionen für β -Verzweigungen (C32) und Methylierungen enthält (Schema 2).^[5,6] Die detaillierte Genanalyse erlaubte es, ein Biosyntheschema zu formulieren (Schema 2 und Abbildung S1B). Die identifizierte Megasyntetase enthält diverse Charakteristika von *trans*-AT-Systemen, z.B. eine ungewöhnliche Domänenorganisation und Module, die auf zwei Subeinheiten aufgeteilt sind.^[5] Die Produktionslinie besteht aus sechs AT-freien PKS-Untereinheiten (J,K,O,P,Q,R), die mit zwei *trans*-AT-Funktionen (codiert durch *elaB* und *elaC*) wechselwirken.

Basierend auf der abgeleiteten PKS-Domänenarchitektur und der phylogenetischen Analyse der zu erwartenden Substratspezifität der KS-Domänen (Schema 2 und Abbildung S2)^[7] konnte das in Schema 2 gezeigte Biosynthesemodell vorgeschlagen werden. Die Fütterungsexperimente und die Anwesenheit der putativen Chorismat-Lyase (*ElaI*) weisen eindeutig auf *p*-Hydroxybenzoesäure als Starteinheit hin. Diese wird aktiviert und auf die ACP des Lademoduls *ElaJ* geladen und von dort aus über 12 Verlängerungsschritte prozessiert (diese Hypothese korreliert allerdings nicht mit der erwarteten Substratspezifität der KS in Modul 1; siehe Abbildung S2). Innerhalb der 14 identifizierten Verlängerungsmodule enthalten die KS in den Modulen 9 und 14 nicht das hoch konservierte HGTGT-Motiv, das für den decarboxylierenden Verlängerungsschritt essenziell ist (Abbildung S3).^[5] Deshalb kann angenommen werden, dass diese KS nicht aktiv sind. Außer den zusätzlichen ACP-Domänen in den Modulen 3 und 8, die die entscheidenden Serinreste nicht enthalten (Abbildung S7), und der *ElaK*-ER-Domäne, die einige Mutationen in der konservierten Region aufweist (Abbildung S8), sollten alle Domänen der Elansolid-Biosynthesemaschine während der Polyketidbildung funktionsfähig

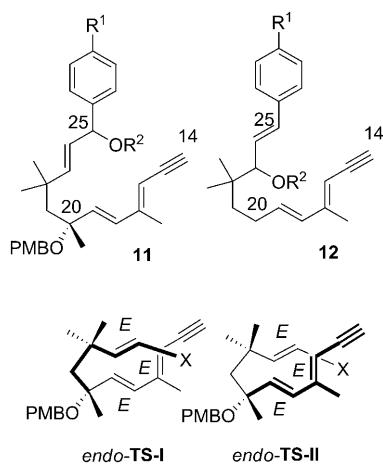


Schema 2. Aus dem Elansolidbiosynthese-Gencluster abgeleiteter Elansolid-A3-Biosyntheseweg. Der Zeitpunkt der IMDA-Reaktion kann nicht mit Sicherheit festgelegt werden, da die Dehydratisierung an C23 und die anschließende IMDA-Reaktion auch zu einem anderen Zeitpunkt der Biosynthese erfolgen könnten (siehe auch Schema 4). Die Module 9 und 14, die keine Verlängerungseinheiten einfügen, sind mit Sternchen markiert. Die TE-katalysierte Lactonisierung (über C23–OH) könnte auch vor der IMDA-Reaktion unter Bildung des hypothetischen Intermediats **9** erfolgen (siehe unten). AL: AMP-Ligase, ACP: Acylcarrierprotein, KS: Ketosynthase, DH: Dehydratase, KR: Ketoreduktase, MT: Methyltransferase, AT: Acyltransferase, ER: Enoylreduktase, TE: Thioesterase, * kennzeichnet inaktive Domänen.

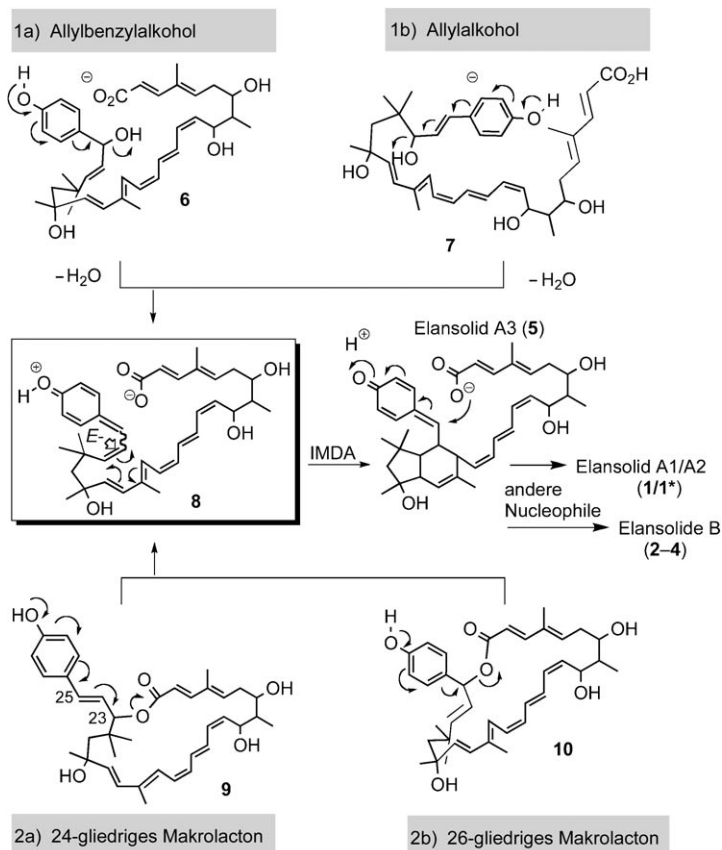
sein. Nach dem zweiten Verlängerungsschritt werden vermutlich die beiden geminalen Methylgruppen über die MT-Domäne und die *trans*-agierende MT ElaS eingefügt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass beide Methylierungen durch die interne MT-Domäne katalysiert werden, was bedeuten würde, dass ElaS für die Elansolidbiosynthese nicht notwendig ist und zu einem späteren Zeitpunkt der Biosynthese agieren könnte.

Die C-terminale ER-Domäne in Modul 3 ist ein typisches Beispiel für eine ungewöhnliche Domänenanordnung einer *trans*-AT-PKS.^[5] Allerdings offenbart die ER-Sequenzanalyse Ähnlichkeiten mit den nicht-funktionalen ER-Domänen im Bryostatin-Biosyntheseweg,^[5] was ein Indiz dafür ist, dass diese Domäne möglicherweise nicht aktiv ist und somit die Reduktion der Doppelbindung durch ElaB katalysiert sein könnte. In Analogie zu anderen Polyketidbiosynthesen^[6] sind fünf Proteine, die im Elansolidbiosynthese-Gencluster kodiert sind (E,F,L,M,N), für die β -Alkylierung an C17 verantwortlich. Diese Modifizierung findet während der Kettenprozessierung statt, solange das Intermediat noch an Modul 5 gebunden ist. Dieser Befund mag auch die Anwesenheit der Tandem-ACP-Domänen erklären. Die Module 6/7 und 8/9 repräsentieren dehydratisierende Bimodule, die man häufig in *trans*-AT-PKS findet.^[5]

Die Konfigurationen der während der Elansolidbiosynthese erzeugten Doppelbindungen wie auch die der Kohlenstoffatome C7 und C9 korrelieren sehr gut mit den für die entsprechenden KR-Domänen vorhergesagten Konfigurationen^[8,9] (Abbildungen S5 und S6). Vor allem die in Schema 2 gezeigten erwarteten Doppelbindungsgeometrien (C16–C19) sind entscheidend für die IMDA-Cycloaddition (siehe unten und Schema 3). Interessanterweise findet sich in Modul 10 eine zusätzliche DH-Domäne, die offensichtlich nicht die Dehydratisierung einer entsprechenden β -Hydroxygruppe katalysiert. Stattdessen vermuten wir, dass diese Domäne die Dehydratisierung der OH-Gruppe an C23 (Elansolid-Numme-



Schema 3. all-E-IMDA-Vorstufe **11** und das Positionsisomer **12** sowie die *endo*-Übergangszustände **TS-I** und **TS-II**.^[12]



Schema 4. Überlegungen zur biosynthetischen IMDA-Cycloaddition beginnend mit offenkettigen (**6** und **7**; Fälle 1a, 1b) und den entsprechenden makrocyclischen Vorstufen (**9** und **10**; Fälle 2a, 2b); zur besseren Übersicht wurde die Konfiguration der Stereozentren nicht dargestellt.

rierung) einleitet und so für die Bildung des Chinonmethids verantwortlich ist (Schema 2 und Schema 4).

Bemerkenswert ist die SAM-abhängige Bildung der geminalen Methylgruppen an C22, die wohl auf der Stufe des β -Keto-Intermediats erfolgt und so die erwartete DH-abhängige Wasserabspaltung von C22/C23 verhindert und die gesamte Reaktionsabfolge ermöglicht. Das Chinonmethid-Intermediat könnte nachfolgend die IMDA-Cycloaddition durchlaufen und so den Bicyclo[4.3.0]nonan-Kern aufbauen (siehe unten). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die PKS-Prozessierung zunächst mit dem linearen Polyketid fortgeführt wird (siehe Schema 4). Im erstgenannten Fall würde das Chinonmethid-Cycloaddukt erweitert und nachfolgend am letzten Modul durch die TE-Domäne unter Bildung von Desoxyelansolid A3 hydrolysiert. Wir nehmen an, dass die Cytochrom(CYT)-P450-abhängige Monooxygenase ElaG die letzte Stufe der Elansolid-A3-Biosynthese (die Oxidation an C20) katalysiert. Eine alternative Möglichkeit ist die vollständige Biosynthese des linearen Kohlenstoffgerüsts, ohne dass währenddessen die IMDA-Cycloaddition stattfindet. Hieraus resultierte der Makrocyclus **9**, der möglicherweise durch TE-katalysierte Lactonisierung gebildet wird. Da auch dieses Makrolacton eine starke Tendenz zur IMDA-Reaktion besäße (siehe Schema 4), implizieren beide Routen, dass hochreaktive Chinonmethid-Intermediate

während mehrerer aufeinanderfolgender Biotransformationen vorhanden sind.

Zusammenfassend liefert die Analyse der PKS ein logisches Szenario für die Biosynthese von Desoxyelansolid A3, das folglich auch das Endprodukt der PKS-Maschinerie darstellt. Die vorgeschlagene ungewöhnliche Dehydratisierung, die die IMDA-Cycloaddition einleitet, erfordert eine tiefergehende Analyse. Wir können derzeit noch nicht ausschließen, dass diese Dehydratisierung von einer anderen Dehydratase ausgeführt wird, die im Gencluster vorhanden ist. Der zeitliche Ablauf der Reaktionen könnte sich zudem von Schema 2 unterscheiden (inklusive der IMDA-Reaktion, die an einem „kürzeren“ Intermediat ablaufen könnte (assoziiert mit ElaO oder ElaP).

Die aus der Analyse des Genclusters erhaltenen Informationen waren für uns Anlass, die Rolle der Chinonmethide und die bis dato beispiellose IMDA-Cycloaddition genauer zu untersuchen und die zeitliche Kopplung zur Makrolactonisierung herzuleiten. Sollte das Chinonmethid im Laufe der PKS-Prozessierung nicht durch Dehydratisierung gebildet werden und die IMDA-Cycloaddition zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden, ist die offenkettige seco-Säure **6** (Allylbenzylalkohol) oder – angesichts der Ergebnisse der Genanalyse wahrscheinlicher – der Allylalkohol **7** eine mögliche offenkettige Vorstufe (Fälle 1a, 1b in Schema 4). Aus ihnen würde das vinyloge Chinonmethid **8** als Schlüsselintermediat der Biosynthesesequenz gebildet, das direkt die IMDA-Cycloaddition zum Tetrahydroindanchinonmethid **5** (Elansolid A3) durchlaufen würde. Diese hochreaktive Spezies würde anschließend in einer Tandemreaktion durch Michael-artigen Angriff des Carboxylat-Ions auf das Chinonmethid-Kation zu Elansolid A1 cyclisieren. Wenn Wasser, Methanol oder Ammoniak als Nucleophile fungieren, entstehen stattdessen die Elansolide B1–B3 (**2–4**).

Prinzipiell kann zwischen den Szenarien, ob die IMDA-Vorstufe **8** aus dem 24-gliedrigen Makrolacton **9** oder aus dem 26-gliedrigen Makrolacton **10** nach entsprechender Aktivierung des Lactonrings gebildet wird (Fälle 2a, 2b in Schema 4), nicht unterschieden werden. Intermediat **9** ist allerdings aufgrund der oben dargestellten hypothetischen Biosynthese gegenüber **10** klar begünstigt. Dieser Fall würde wie in Schema 2 gezeigt eine PKS-assoziierte, cyclisierende Thioesterase (TE) anstelle einer hydrolysierenden TE erfordern. Die Bioinformatikanalyse erlaubt derzeit jedoch keine Differenzierung zwischen TEs, die bevorzugt hydrolysieren oder lactonisieren. Von Bedeutung ist, dass für beide in Schema 4 gezeigten Fälle die Diels-Alder-Cycloaddition zur Bildung von Elansolid A3 führt und sich daran direkt der Michael-artige Angriff des Carboxylats auf das Methidchinon zum Cyclisierungsprodukt Elansolid A anschließt.

Ausgehend von den Befunden der Fütterungsexperimente und den oben geschilderten prinzipiellen Überlegungen untersuchten wir im Folgenden die IMDA-Cycloaddition genauer.^[10] Dazu synthetisierten wir das all-*E*-Trien **11** (analog zu den IMDA-Vorstufen **6** und **10**) und das vereinfachte Positionsisomer **12** (analog zu den Vorstufen **7** und **9**) als Modellsstrate (siehe Schema 3). Zunächst wurde das Trien **11** gewählt, da es dem natürlichen System möglichst nahe ist und mit ihm alle Faktoren der Diastereokontrolle bei

der IMDA-Cycloaddition im Detail untersucht werden können.^[11] Die *E*-Konfiguration aller olefinischen Doppelbindungen sollte über die beiden *endo*-Übergangszustände **TS-I** und **TS-II** die korrekte relative Konfiguration an C16, C19, C23 und C24 liefern. Das Stereozentrum an Position 20 sollte die diastereofaciale Kontrolle ausüben.^[13]

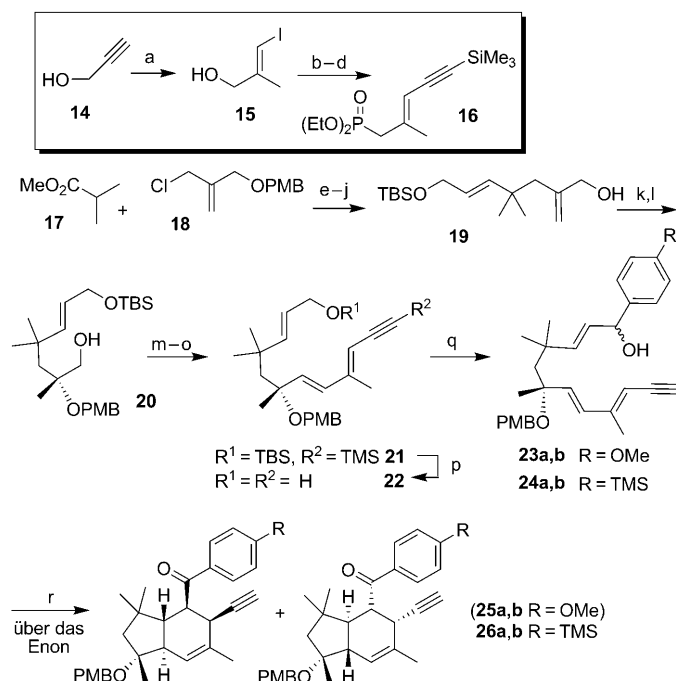
Die Synthese des Allylalkohols **22** begann mit dem Allylchlorid **18**.^[14] Eine Standardsequenz aus α -Allylierung von **17**, Reduktion/Oxidation gefolgt von einer Horner-Wadsworth-Emmons(HWE)-Olefinierung mit dem Phosphonat **13**, Reduktion des Esters, O-Silylierung des Allylalkohol-Intermediats und abschließende PMB-Entschützung lieferte den Allylalkohol **19** (Schema 5). Dessen Oxidation unter Sharpless-Bedingungen gelang mit gutem Enantiomerenüberschuss, und der Epoxyalkohol wurde anschließend reaktiv zum 1,2-Diol geöffnet.^[15] Die Bildung des cyclischen PMP-Acetals und dessen Spaltung unter reduktiven Bedingungen ergaben den Alkohol **20**. Durch Oxidation wurde der entsprechende Aldehyd erhalten, der mit dem Phosphonat **16** über eine HWE-Olefinierung verbunden wurde. (Das Phosphonat **16**^[16] wurde aus dem Vinylidid **15** (aus **14**^[17]) durch Sonogashira-Hagihara-Alkinylierung, Appel-Bromierung und Michaelis-Arbusov-Reaktion hergestellt.) Das resultierende Alkin **21** wurde schließlich zum Allylalkohol **22** desilyliert.

Als Nächstes überführten wir bei -30°C den Allylalkohol **22** mit der Ley-Griffith-Methode in den entsprechenden Aldehyd.^[18] Dieser musste ebenfalls bei niedriger Temperatur direkt mit 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid oder alternativ 4-Trimethylsilylphenylmagnesiumbromid^[19] umgesetzt werden (Schema 5). Die Allylbenzylalkohole **23a,b** und **24a,b** wurden dabei als 1:1-Diastereomerenmische erhalten und dienen als Modellvorstufen für das Chinonmethid (siehe Allylbenzylalkohol **6**, Schema 4). In keinem Fall konnten aber Brønstedt- oder Lewis-Säuren die Bildung der gewünschten IMDA-Produkte auslösen.^[20] Auch alle Versuche, die Allylbenzylalkohole **23a,b** oder **24a,b** in bessere Abgangsgruppen zu überführen (Acetat, Tosylat), schlugen fehl. Nur wenn die Triene **24** zu den entsprechenden Enonen oxidiert wurden, fand die spontane und diastereoselektive, über den bevorzugten Übergangszustand **TS-I** verlaufende Bildung der IMDA-Produkte **26** statt.^[21] Die analogen 4-Methoxyphenyl-substituierten Alkohole **23** zersetzten sich unter diesen Bedingungen, ohne dass die gewünschten IMDA-Produkte **25** entstanden.

Die Konfiguration der Diels-Alder-Produkte **26** wurde mithilfe von ^1H , ^1H -Kopplungskonstanten (*J*) und NOE-Experimenten bestimmt, indem die erhaltenen Daten mit denen der authentischen Elansolide verglichen wurden.^[1,23] Die absoluten Konfigurationen an C16, C19, C23 und C24^[13] erwiesen sich als identisch mit denen der Elansolide.

Im Anschluss synthetisierten wir das Modellssubstrat **12**, in dem die Positionen der Hydroxygruppe und der Doppelbindung an C23–C25 (Elansolid-Nummerierung) gegenüber **11** vertauscht sind. Die Aktivierung der Hydroxyfunktion sollte ebenfalls zum Chinonmethid-Schlüsselintermediat führen (analog zu **10**, Schema 4).

Der Aldehyd **28**^[23] reagierte mit *p*-Methoxyacetophenon selektiv zum *E*-Enon **29** (Schema 6). Die Luche-Reduktion mit nachfolgender Acylierung lieferte das Allylacetat **30**.

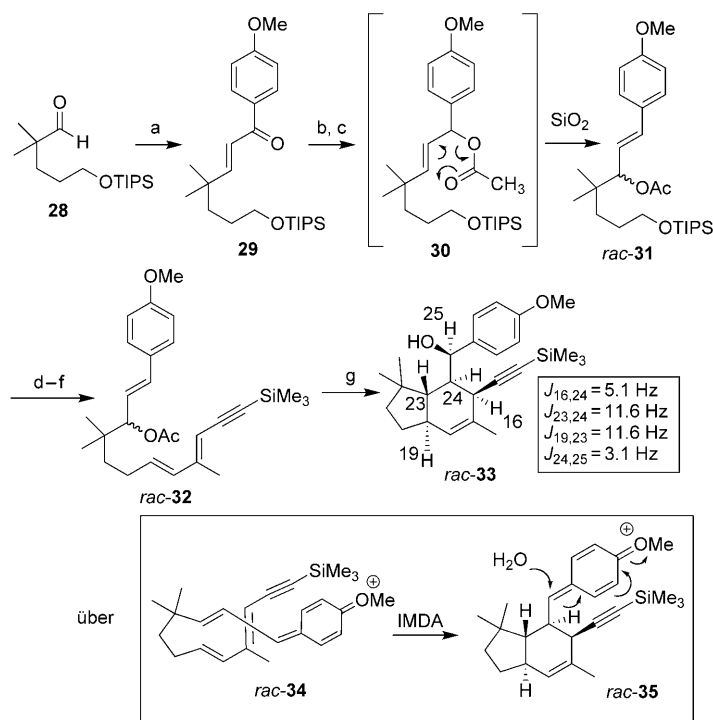


Scheme 5. Synthese des Allylalkohols **22** und Untersuchungen zur IMDA-Cycloaddition. Reagentien und Bedingungen: a) 1. $[\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2]$, AlMe_3 , CH_2Cl_2 , RT, 15 h, 2. I_2 , 50%; b) Me_3SiCCH , $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, CuI , Pyrrolidin, RT, 2 h, 80%; c) CBr_4 , PPh_3 , CH_2Cl_2 , RT, 30 min; d) $\text{P}(\text{OEt})_3$, Mikrowelle, 100°C , 30 min, 70% über zwei Stufen; e) 1. DIPA, $n\text{Buli}$, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, dann Zugabe von **17**, $-78^\circ\text{C} \rightarrow -40^\circ\text{C}$, 2. Zugabe von **18**, TBAI, $-40^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 82%; f) Dibal-H, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 99%; g) PCC, CH_2Cl_2 , RT; h) NaH, $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ (**13**), THF, 50°C , dann Zugabe von Aldehyd (von (g)), 80°C , 91% über zwei Stufen; i) 1. Dibal-H, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2. TBSCl, Imidazol, DMAP, CH_2Cl_2 , RT, 99% über zwei Stufen; j) DDQ, CH_2Cl_2 , pH-7-Phosphatpuffer, RT, 93%; k) $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$, D-(-)-DET, $t\text{BuOOH}$, CH_2Cl_2 , -25°C , 93%, 95% ee (bestimmt durch ^1H -NMR-Spektroskopie nach Bildung des S-Mosher-Esters^[15]); l) LiAlH_4 , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 86%; m) 1. 4-MeO- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}(\text{OMe})_2$, PPTS, CH_2Cl_2 , RT, 2. Dibal-H, Toluol, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 89% über zwei Stufen; n) DMP, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 86%; o) NaHMDS, **16**, THF, -78°C , dann Zugabe von Aldehyd, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 84%, all-E:andere Isomere = 10:1; p) TBAF, THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 99%; q) 1. TPAP, NMO, CH_2Cl_2 , -30°C ; 2. $\text{RC}_6\text{H}_4\text{-MgBr}$, THF, TMEDA, $-78^\circ\text{C} \rightarrow -50^\circ\text{C}$ (R = OMe, 75%; R = TMS, 81% über zwei Stufen); r) **24a,b**, TPAP, NMO, MS 4 Å, CH_2Cl_2 , -30°C (67%; *de* = 5:1). Die Verbindungen **25** wurden nicht erhalten. Abkürzungen: Cp = Cyclopentadienyl, DIPA = Ethyldiisopropylamin, TBAI = Tetra-*n*-butylammoniumiodid, Dibal-H = Diisobutylaluminiumhydrid, PCC = Pyridiniumchlorochromat, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, DDQ = Dichlordicyanobenzochinon, DET = Diethyltartrat, PPTS = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat, DMP = Dess-Martin-Periodinan, NaHMDS = Natriumhexamethyldisilazid, TBAF = Tetra-*n*-butylammoniumfluorid, TPAP = Tetra-*n*-propylammoniumperoxyruthenat, NMO = *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid.

Forciert durch den Elektronendruck der *para*-Methoxygruppe und begünstigt durch die schwach sauren Bedingungen während der säulenchromatographischen Reinigung durchlief **30** eine spontane [3,3]-sigmatrope Umlagerung zum Styrolerivat **rac-31**. Nach

Entschützung und Oxidation wurde der resultierende Aldehyd mit dem Phosphonat **16** zum Trien **rac-32** gekuppelt. Dessen Behandlung mit Trifluoressigsäure in feuchtem Dioxan lieferte das IMDA-Produkt **rac-33** als einziges Diastereomer. Das polare aprotische Lösungsmittel wurde ausgewählt, weil wir annahmen, dass es das intermediäre Chinonmethid-Kation **34** stabilisieren würde; dessen IMDA-Reaktion sollte das zweite Chinonmethid-Kation (**35**) liefern, welches durch Wasser aus dem feuchten Lösungsmittel abgefangen würde.^[24] Die Analyse der relevanten ^1H , ^1H -Kopplungskonstanten (*J*) ergab, dass die Cycloaddition über einen *endo*-Übergangszustand verlief und die korrekte relative Konfiguration von Elansolid A ergab.^[22] Bemerkenswerterweise findet der Angriff von Wasser auf das Intermediat **35** *syn* zum Alkynylsubstituenten an C16 statt und ergibt somit eine relative Konfiguration an C25, wie sie auch in den Elansoliden zu finden ist. Für die Analyse wurde die auch in den Elansoliden anzutreffende kleine vicinale Kopplungskonstante zwischen H24 und H25 herangezogen.^[1,22]

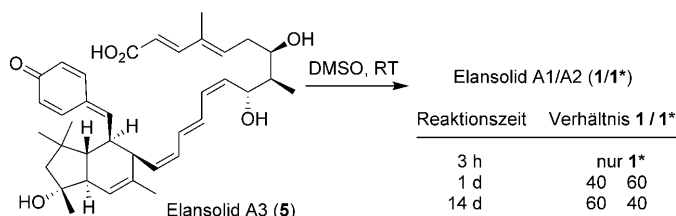
Die Befunde aus der Synthese von Modellverbindungen unterstreichen zusammen mit der Analyse des Gencusters nachdrücklich unsere Hypothese, dass ein Allylalkohol ähnlich **7** (siehe Schema 4) oder, aus unserer Sicht weniger wahrscheinlich, das korrespondierende Lacton **9**, als biosynthetische Vorstufe für die IMDA-Cycloaddition dient.^[25] Verbindung **6** oder das 26-gliedrige Lacton **10**



Scheme 6. Synthese des Triens **rac-32** durch [3,3]-sigmatrope Umlagerung des Allylacetats **rac-31** und Brønstedt-Säure vermittelte IMDA-Cycloaddition zum Bicyclo[4.3.0]nonan-Gerüst **rac-33**. Reagentien: a) *p*-Methoxyacetophenon, NaOMe, MeOH, Δ , 59%; b) NaBH_4 , CeCl_3 , MeOH, 0°C , 99%; c) AcCl , NEt_3 , CH_2Cl_2 , RT, 50%; d) TBAF, THF, RT, 64%; e) DMP, CH_2Cl_2 , RT, 30%; f) NaHMDS, **16**, THF, -78°C , 62% (all-E); g) TFA, feuchtes Dioxan, RT, 15 h (55%). TFA = Trifluoressigsäure.

können mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ohne Frage ähneln die Bedingungen für die Aktivierung von *rac*-**32** stark der biologischen Situation.

Eine Bestätigung unserer Hypothese, dass die Makrocyclisierung über eine einzigartige Lactonisierung auf Basis einer nucleophilen Addition des Carboxylats an das Chinonmethid verläuft (siehe Schema 4), lieferte das Verhalten von Elansolid A3 in DMSO bei Raumtemperatur (Schema 7).^[12] Nach 1 Tag war es in die beiden Elansolide A1 und A2 im Verhältnis 2:3 überführt worden; nach weiteren 13 Tagen hatte sich das Verhältnis nach 3:2 verschoben.



Schema 7. Direkte Umwandlung von Elansolid A3 in die Elansolide A1/A2.

Wir haben hier eine detaillierte Studie zur PKS-basierten Biosynthese der Elansolide vorgestellt und Aufschluss über einzigartige und beispiellose Aspekte gewonnen, die die Vorbereitung der IMDA-Reaktion durch einen ungewöhnlichen Dehydratisierungsmechanismus, die IMDA-Reaktion selbst und die Makrolactonisierung umfassen. Um einen so detaillierten Einblick zu erhalten, nutzten wir Fütterungsexperimente, die Analyse des zugrundeliegenden Biosynthese-Genclusters und die Synthese von komplexen Modellsystemen.

Eingegangen am 2. November 2010,
veränderte Fassung am 6. Januar 2011
Online veröffentlicht am 29. März 2011

Stichwörter: Biosynthese · Chinonmethide · Intramolekulare Diels-Alder-Reaktionen · Makrocyclisierungen · Polyketide

- [1] H. Steinmetz, K. Gerth, R. Jansen, N. Schläger, R. Dehn, S. Reinecke, A. Kirschning, R. Müller, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 553–557; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 532–536.
- [2] R. Jansen, K. Gerth, H. Steinmetz, S. Reinecke, W. Kessler, A. Kirschning, R. Müller, *Chem. Eur. J.*, eingereicht.
- [3] K. Gerth, H. Steinmetz, G. Höfle, EP 2 093 212A1, **2009**.
- [4] E. M. Stocking, R. M. Williams, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3186–3223; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3078–3115.
- [5] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 996–1047.
- [6] C. T. Calderone, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 845–853.
- [7] T. Nguyen, K. Ishida, H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, C. Gurgui, T. Hochmuth, S. Taudien, M. Platzer, C. Hertweck, J. Piel, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 225–233.

- [8] S. Donadio, L. Katz, *Gene* **1992**, *111*, 51–60.
- [9] N. S. Scrutton, A. Berry, R. N. Perham, *Nature* **1990**, *343*, 38–43.
- [10] K.-i. Tadano, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4381–4394.
- [11] Zusätzlich ebnet die Dreifachbindung in **11** den Weg für eine biomimetische Totalsynthese.
- [12] Im gesamten Text bezieht sich die Nummerierung der Atome auf die Nummerierung im Naturstoff Elansolid.
- [13] Wir kennen keine IMDA-Reaktion mit einem tertiären Allylalkohol. In einfacheren Fällen variiert die Stereoinduktion dieses Zentrums von moderat bis exzellent; siehe: a) M. P. Edwards, S. V. Ley, S. G. Lister, P. D. Palmer, D. J. Williams, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3503–3516; b) W. R. Roush, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1390–1404.
- [14] S. L. Boulet, L. A. Paquette, *Synthesis* **2002**, 895–901.
- [15] Der Enantiomerenüberschuss wurde nach Überführung des Epoxyalkohols mit dem *R*-Mosher-Chlorid in den entsprechenden Ester durch Integration der diastereotopen Signale im ¹H-NMR-Spektrum bestimmt: a) J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3732–3738; b) J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17–117.
- [16] T. Motozaki, K. Sawamura, A. Suzuki, K. Yoshida, T. Ueki, A. Ohara, R. Munakata, K. Takao, K. Tadano, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2261–2264.
- [17] Z. Tan, E. Negishi, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2783–2785.
- [18] Wir mussten eine Oxidationsmethode wählen, die schon bei –30 °C gelingt, da der intermediäre Aldehyd bei 0 °C spontan eine IMDA-Reaktion durchlief. Die dabei über die beiden *endo*-Übergangszustände **TS-I** und **TS-II** gebildeten Tetrahydroindane **27a,b** wurden als Diastereomergemisch (1:1) erhalten.
- [19] Der *p*-TMS-Substituent wurde als Alternative gewählt, da er ohne Weiteres in eine phenolische OH-Gruppe umgewandelt werden kann; R. L. Funk, K. P. C. Vollhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5253–5261.
- [20] Stattdessen konnte nur die Entschützung des PMB-Ethers beobachtet werden.
- [21] Diese starke Tendenz zur Cyclisierung kann durch 1) ein niedrigerenergetisches LUMO des Dienophils, 2) ein hochenergetisches HOMO des Diens aufgrund einer Konjugation zum Alkin und 3) einen von der *gem*-Dimethylgruppe und dem tertiären Alkohol ausgeübten doppelten Thorpe-Ingold-Effekt erklärt werden. Allerdings schließt die in Schema 2 gezeigte Genomanalyse eine IMDA-Vorstufe mit einer Ketofunktion an C25 nahezu gänzlich aus.
- [22] Siehe die Hintergrundinformationen für die analytischen Details.
- [23] T. Lampe, H. M. R. Hoffmann, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7695–7698.
- [24] Erwähnenswert ist, dass mit der schwächeren Säure AcOH in Dioxan keine IMDA-Produkte erhalten wurden.
- [25] Während der Begutachtung dieses Manuskript veröffentlichten Piel et al. einen Vorschlag für die Biosynthese der Elansolide, in dem ein anders angeordneter Allylbenzylalkohol (ähnlich wie **6**) als direkte Vorstufe für die IMDA-Cycloaddition vorgeschlagen wird: R. Teta, M. Gurgui, E. J. N. Helfrich, S. Künne, A. Schneider, G. Van Echten-Deckert, A. Mangoni, J. Piel, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2506–2512. Aus unserer Sicht sind die elektronischen Voraussetzungen für die IMDA-Cycloaddition aber nur erfüllt, wenn das Chinonmethid als Schlüsselintermediat in der Biosynthese involviert ist.

