

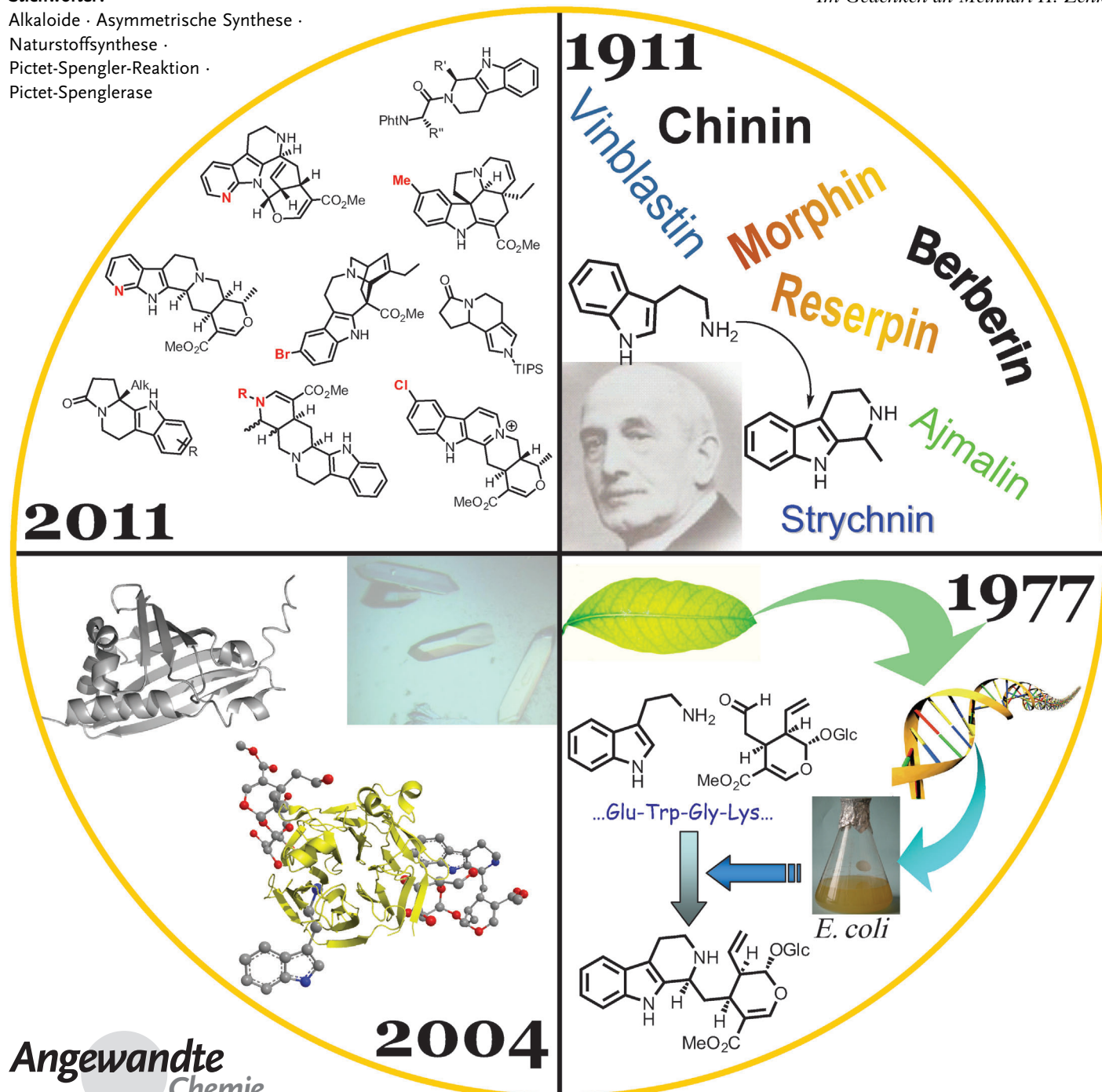
Die Pictet-Spengler-Reaktion in der Natur und der organischen Chemie

Joachim Stöckigt,* Andrey P. Antonchick, Fangrui Wu und Herbert Waldmann*

Stichwörter:

Alkaloide · Asymmetrische Synthese ·
Naturstoffsynthese ·
Pictet-Spengler-Reaktion ·
Pictet-Spenglerase

Im Gedenken an Meinhard H. Zenk

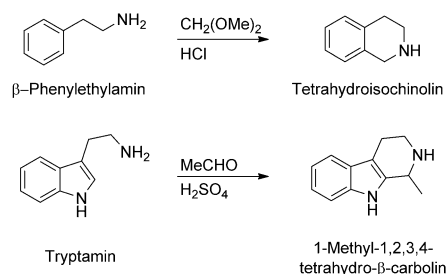


Alkaloiden sind eine bedeutende Klasse von Naturstoffen, die in der Natur weit verbreitet sind und von vielen Organismen gebildet werden. Sie haben ein breites Spektrum an biologischen Wirkungen und wurden viele Jahre in der Volksmedizin angewendet. Auch heutzutage haben Alkaloide zahlreiche Anwendungen als medizinische Therapeutika und verfügen außerdem über einen hohen Stellenwert als Ausgangspunkt für die Wirkstoffsuche, weshalb ihre Synthese von beträchtlichem Interesse ist. Die wichtigste Methode für die Synthese von Alkaloidgerüsten ist die durch Pictet und Spengler entdeckte Kondensationsreaktion, deren Leistungsfähigkeit in der Synthese von stereochemisch und strukturell komplexen Alkaloiden überzeugend bewiesen wurde.

1. Entdeckung der Pictet-Spengler-Reaktion

Als die Chemiker Amé Pictet und Theodor Spengler 1911 in ihren Laboratorien an der Universität Genf Phenylethylamin mit Formaldehyddimethylacetal in Gegenwart von Salzsäure erhitzen, reagierten beide Verbindungen in einer Cycloaddition.^[1] Das gebildete Reaktionsprodukt war das Alkaloid 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (THIQ). War es schon zu jener Zeit Pictets Absicht, eine einfache chemische Synthese von Alkaloiden zu finden? Sein vorher verfasster Artikel „Die chemische Konstitution pflanzlicher Alkaloide“ könnte dies suggerieren. Die entdeckte Reaktion wurde Pictet-Spengler-Reaktion (PSR) genannt und hat sich seither in der Synthese einer großen Vielfalt von heterocyclischen Verbindungen bewährt. Im Jahr 2011 feiert die PSR somit ihr 100-jähriges Bestehen im chemischen Labor. Während dieser recht langen Zeit hat sich die Reaktion zu einer der erfolgreichsten Strategien vor allem für die Synthese von Isochinolin- und Indol-Alkaloidgerüsten entwickelt. Die Reaktion (Schema 1) wurde mit Blick auf ihren Anwendungsbereich permanent modifiziert, z. B. für die Umsetzung von N-alkylierten, N-acylierten und N-sulfonylierten Derivaten des Phenylethylamins.

Nach Entdeckung der PSR dauerte es noch fast 20 Jahre, bevor der japanische Chemiker Tatsui Tryptamin als Aminkomponente einsetzte, und damit den Weg für die erste Synthese des 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin(THBC)-Gerüsts



Schema 1. Die ersten Pictet-Spengler-Reaktionen (PSRs) zur Synthese des Tetrahydroisochinolin(THIQ)- und des Tetrahydro- β -carbolin(THBC)-Gerüsts.^[1,2]

Aus dem Inhalt

1. Entdeckung der Pictet-Spengler-Reaktion	8693
2. Enzymkatalysierte PSR: Strictosidin-Synthasen	8694
3. Erste 3D-Struktur einer Pictet-Spenglerase	8696
4. Neue Ansätze zur Synthese neuartiger Indolalkaloide	8699
5. Norcoclaurin-Synthase	8701
6. Transfer und Umprogrammierung der THIQ-Biosynthese: von der Pflanzenzelle zum mikrobiellen Wirt	8705
7. Schlussfolgerungen und zukünftige Aspekte der Pictet-Spenglerasen	8706
8. Der Mechanismus der nichtenzymatischen Pictet-Spengler-Reaktion	8707
9. Diastereoselektive Pictet-Spengler-Reaktion	8707
10. Brønsted-Säure-katalysierte enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktion	8712
11. Schlussfolgerungen und Ausblick auf die Entwicklung der asymmetrischen Pictet-Spengler-Reaktion	8715

ebnete (Schema 1).^[2] THIQ und THBC sind die entscheidenden Strukturelemente einer breiten Auswahl von strukturell komplexen Syntheseprodukten, ebenso wie von tausenden in der Natur vorkommenden Isochinolin- und Indol-

[*] Prof. Dr. J. Stöckigt, F. Wu
 Institute of Materia Medica
 College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University
 866 Yuhangtang Road, Hangzhou, 310058 (China)
 E-Mail: joesto2000@yahoo.com
 Dr. A. P. Antonchick, Prof. Dr. H. Waldmann
 Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
 Abteilung Chemische Biologie
 Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
 Fax: (+49) 231-133-2499
 und
 Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie
 Chemische Biologie
 Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
 E-Mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

Alkaloiden, von denen einige von enormer physiologischer und therapeutischer Bedeutung sind.^[3] Ebenso wie die Amin-Komponente kann auch die Aldehyd-Komponente variiert werden – einschließlich maskierter Aldehyde (Acetale, Enolether, Halbaminale, Aminonitrile) und Ketone.

Obwohl die Bedeutung der PSR für die Synthese über viele Jahrzehnte bekannt war, stand einer breiten Anwendung der Reaktion das Fehlen asymmetrischer Verfahren im Wege. Während der letzten zwei Jahrzehnte war jedoch ein bemerkenswerter Fortschritt bei der Entwicklung neuer, hoch enantioselektiver Methoden für die Synthese von THIQ- und THBC-Strukturen zu verzeichnen.^[4,5] Diese Entwicklungen folgten der Entdeckung des ersten Enzyms (im Jahr 1977), das eine Pictet-Spengler-Kondensation mit vollständiger Stereoselektivität katalysierte (siehe Abschnitt 2). Enzyme dieses Typs werden Pictet-Spenglerasen genannt.

Das wohl bedeutendste THIQ-Alkaloid ist Morphin, die Hauptkomponente des Opiums. Wahrscheinlich wird Opium seit Anbeginn der menschlichen Zivilisation verwendet. Die Sumerer benutzten es schon vor 6000 Jahren, und 3500 Jahre alte ägyptische Medizinbücher beschreiben es als Stärkungsmittel.^[6a,b]

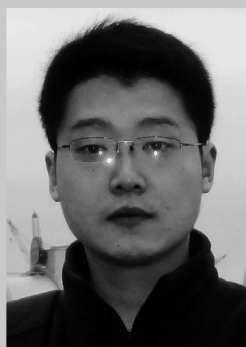
Die Enzym-katalysierte Pictet-Spengler-Kondensation ist der Schlüssel für die Biosynthese des Morphins. Während die Natur diese Reaktion schon vor tausenden von Jahren angewendet hat, nutzen Chemiker sie erst seit verhältnismäßig

kurzer Zeit. Wie in diesem Aufsatz beschrieben wird, erforschen wir derzeit die mechanistischen Einzelheiten der biologischen PSR, was eine Voraussetzung ist, um zu einem rationalen Modulieren der Enzymaktivität zu gelangen.

2. Enzymkatalysierte PSR: Strictosidin-Synthasen

2.1. Entdeckung der ersten Pictet-Spenglerase und Struktur ihres Reaktionsprodukts

Die ersten Enzymexperimente zur Aufklärung der Biosynthese des monoterpenoiden Indol-Alkaloids Ajmalicin (Raubasin) vom Heteroyohimbin-Typ wurden vor 35 Jahren durchgeführt. Hierfür wurden die Vorstufen Tryptamin und Secologanin mit zellfreien Extrakten von Keimlingen, dem Kallus und Zellsuspensionskulturen von *Catharanthus roseus* (Madagaskar-Immergrün, Apocynaceae) umgesetzt.^[7,8] Der Ajmalicin-Biosyntheseweg war das erste Beispiel für eine Alkaloid-Biosynthese, die über die beteiligten Enzyme aufgeklärt wurde.^[9–13] Damals existierten bereits unterschiedliche Vorschläge zur Natur und Beteiligung des ersten Biosyntheseintermediats, das durch die Kondensation zwischen dem Amin und dem Aldehyd Secologanin gebildet wird.^[14,15] Die verwendeten *Catharanthus*-Zellkulturen waren für eine effiziente Alkaloidproduktion optimiert worden^[16,17] und er-



Fangrui Wu studierte Biochemie an der Hefei University of Technology und erwarb den Master-Grad am Biomass Research Center des Ministry of Education (Hefei, China) mit einer Arbeit über die Isolierung und Analyse von Gingkoliden und natürlichen Glucosidase-Inhibitoren aus *Morus albus* (Maulbeerbaum). Er ist zurzeit Doktorand an der Zhejiang University (Hangzhou) und befasst sich mit der Biochemie und Strukturbiologie von Schlüsselenzymen der Biosynthese von monoterpenoiden Indol-Alkaloiden.



Herbert Waldmann studierte Chemie an der Universität Mainz und promovierte dort 1985 in organischer Chemie bei Prof. Horst Kunz. Er war Postdoc bei Prof. George Whitesides an der Harvard University und habilitierte 1991 in Mainz. Nach Professuren in Bonn (1991) und Karlsruhe (1993) wurde er 1999 Direktor am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Professor für Organische Chemie in Dortmund. Seine Forschungen gelten der Synthese von Signaltransduktionsmodulatoren und Naturstoff-abgeleiteten Substanzbibliotheken, lipidierten Peptiden und Proteinen sowie der Protein-Microarray-Technologie. Zu seinen Auszeichnungen gehören der Otto-Bayer-Preis, die Max-Bergmann-Medaille und der GSK Award. Er ist Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina.



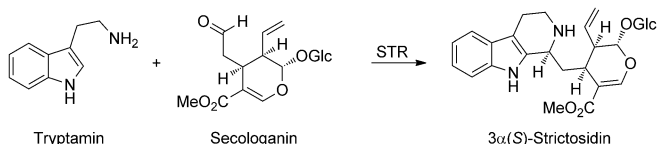
Joachim Stöckigt promovierte in organischer Chemie an der Universität Münster bei Prof. Burchard Franck. Mehrere Forschungsaufenthalte führten ihn an die Fakultät für Biologie der Universität Bochum (Prof. Meinhard H. Zenk), die Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, die Texas A&M University (Prof. A. I. Scott) und die Purdue University (Prof. H. Floss). 1990 erhielt er eine Professur an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, wurde dort 2008 emeritiert und ist zurzeit Professor an der Zhejiang University (Hangzhou, China). Er ist Träger des Tate and Lyle Award der Phytochemical Society of Europe. Sein Forschungsinteresse gilt der Biosynthese von Alkaloiden, der Phytochemie, der Enzymologie, der Molekularbiologie und der Strukturbiologie.



Andrey P. Antonchick studierte Chemie an der Belarussian State University (Minsk) und promovierte am Institute of Bioorganic Chemistry der weißrussischen National Academy of Sciences sowie am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie (Jena) bei Prof. V. A. Khripach und Priv.-Doz. Dr. B. Schneider. Nach einem Postdoktorat bei M. Rueping (Universität Frankfurt) wechselte er zur Arbeitsgruppe von Prof. H. Waldmann am MPI für Molekulare Physiologie (Dortmund), wo er seit 2010 eine Forschungsgruppe leitet.

wiesen sich als ein exzellentes System, um diese Vorschläge zu überprüfen. Wurde die zellfreie Ajmalicin-Synthese nach dem ersten Reaktionsschritt unterbrochen, so führte dies zur Anreicherung des Glucoalkaloids Strictosidin, das durch die enzymkatalysierte Pictet-Spengler-Reaktion entstand.

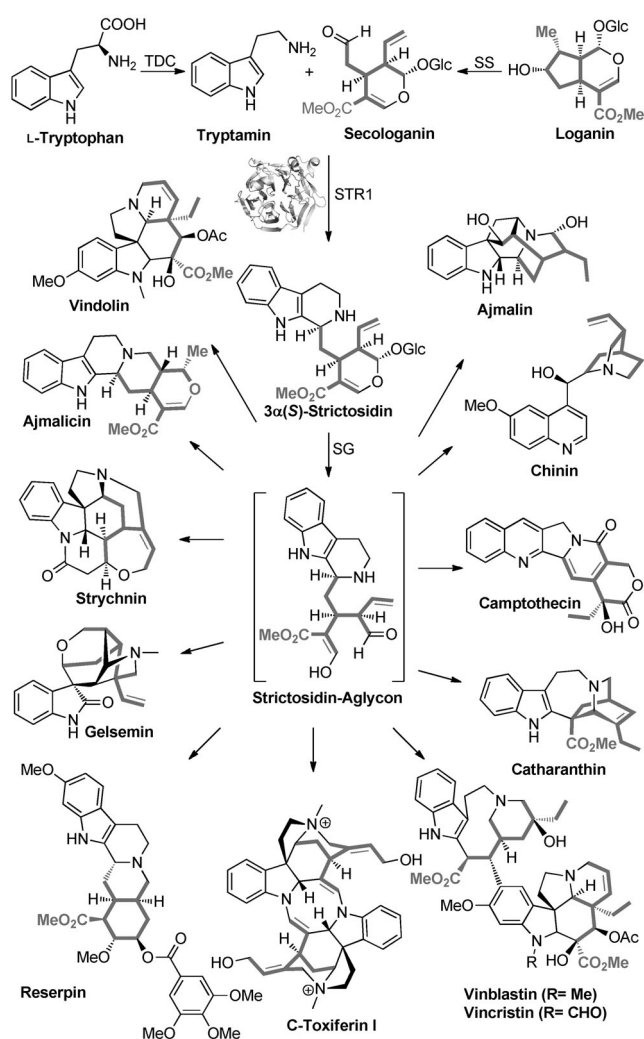
Mehr als sechs Jahrzehnte nach der Entdeckung der chemischen Pictet-Spengler-Reaktion^[1,2] wurde die erste Pictet-Spenglerase, die Strictosidin-Synthase (STR) (EC 4.3.3.2), in der Natur aufgefunden.^[18–20] Wegen der damals unterschiedlichen Meinungen zur C3-Konfiguration des Glucoalkaloids Strictosidin war ein zweifelsfreier Nachweis seiner Struktur notwendig. Der Vergleich einer authentischen Probe von 3 α (S)-Strictosidin mit acetylierten Derivaten mittels Chromatographie, Circular Dichroismus, NMR-Spektroskopie und Isotopenverdünnungsanalyse bewies, dass das Enzym stereoselektiv das 3 α (S)-Strictosidin bildet.^[18–20] Das 3 β -Epimer (Vincosid), das in der chemischen PSR im Verhältnis von ca. 1:1 mit dem 3 α -Epimer gebildet wird, konnte nicht nachgewiesen werden. Detaillierte Informationen von Hutchinson (USA), Brown (England) und Snatzke (Deutschland) halfen, die Struktur des enzymatisch hergestellten Strictosidins zweifelsfrei zu bestimmen (Schema 2).



Schema 2. Enzymatische Kondensation von Tryptamin mit dem monoterpennoiden Aldehyd Secologanin, katalysiert durch die Pictet-Spenglerase Strictosidin-Synthase aus *Catharanthus* (STR) oder *Rauvolfia* (STR1).

2.2. Rolle von Strictosidin und STR in der Biosynthese

In Fütterungsexperimenten mit isotonenmarkiertem Strictosidin an einer Reihe von Pflanzen wurde nachgewiesen, dass Strictosidin die zentrale und alleinige biosynthetische Vorstufe von wahrscheinlich allen monoterpennoiden Indolalkaloiden ist, einschließlich der Corynanth-, Strychnos-, Aspidosperma- und Iboga-Alkaloide sowie von Alkaloiden, die statt der 3 α - eine 3 β -Konfiguration aufweisen (Schema 3).^[21,22] Die Bestätigung, dass Strictosidin das erste Intermediat in der Biosynthese der strukturell diversen monoterpennoiden Indolalkaloide ist, folgte dann sehr schnell.^[23–25] Eine Übersicht über die taxonomische Verteilung der STR wurde erstellt und zeigte, dass das Enzym in Indolalkaloid-produzierenden Pflanzen vorkommt, aber nicht in Pflanzen, die diese Alkaloide nicht synthetisieren.^[26] Neben den In-vivo-Fütterungsexperimenten^[21] war es dieses gemeinsame Vorkommen des Enzyms mit den entsprechenden Alkaloiden, das den entscheidenden Beweis für die biosynthetische Schlüsselrolle der Synthase und seines Produkts lieferte.



Schema 3. Biosynthetische Bedeutung des Strictosidins als zentrale Vorstufe einer diversen Familie monoterpennoider Indolalkaloide in höheren Pflanzen, der rund 2000 strukturell verschiedenartige Verbindungen angehören, einschließlich des Chinolinalkaloids Chinin. Das Kohlenstoffgerüst des Secologanins ist grau dargestellt, um die strukturellen Änderungen durch Gerüstumlagerungen während der Biosynthese hervorzuheben. TDC = Tryptophan-Decarboxylase, SS = Secologanin-Synthase, STR1 = Strictosidin-Synthase, SG = Strictosidin-Glucosidase.

2.3. Biochemische Charakterisierung und Reinigung der STR

Es war beides, die divergente synthetische und später biosynthetische Bedeutung von Strictosidin als Ausgangspunkt vieler Biosynthesewege von therapeutisch etablierten Pharmaka und pharmakologischen Leitstrukturen (Ajmalin, Ajmalin, Camptothecin, Vinblastin, Vincristin, Strychnin oder die Toxiferine), die eine detaillierte Charakterisierung des Enzymmechanismus verlangten.

Das erste Reinigungsprotokoll der STR aus *Catharanthus* wurde 1979 beschrieben – zwei Jahre nach Auffinden der Synthase – und führte zu einer Teilreinigung bzw. nur einer Anreicherung des Enzyms.^[27,28] In einer nachfolgenden Studie wurde eine homogene, reine STR aus *Catharanthus*-Zellsuspensionen erhalten, allerdings bestand die Präparation aus Isoenzymen mit sehr ähnlichen physikalischen und kine-

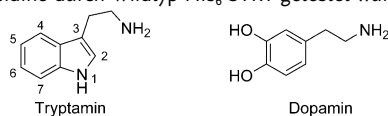
tischen Eigenschaften,^[29] was eine weitere biochemische Bearbeitung unzumutbar machte. Dagegen wurde eine einzelne, reine STR1-Isoform erhalten, wenn das Enzym aus Zellkulturen der indischen Heilpflanze *Rauvolfia serpentina* Benth ex. Kurz isoliert und gereinigt wurde.^[30] Zur Unterscheidung von der *Catharanthus*-STR wird die Bezeichnung STR1 für das *Rauvolfia*-Enzym und *str1* für dessen Gen verwendet. Um das präparativ wertvolle Strictosidin herzustellen – insbesondere zur Entwicklung von biomimetischen Alkaloidsynthesen –, wurde die Synthese an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Dies ist ein einfacher Ansatz, der die Isolierung von reinem Strictosidin in Mengen von mehreren Gramm ermöglicht, zumal das immobilisierte Enzym viel stabiler ist als die gelöste STR.^[31,32]

Trotz der hohen Substratspezifität, die die Verwendung von STR1 zum Aufbau von Alkaloidbibliotheken einschränkt, wurde STR1 das Enzym der Wahl für die Untersuchung von biotechnologischen Anwendungen zur chemoenzymatischen Alkaloidsynthese.

2.4. Substratspezifität der STR1

Um die Verwendung des enzymatischen Pictet-Spengler-Produkts für biomimetische divergente Alkaloidsynthesen zu erforschen, musste eine breite Auswahl von Aminen und Aldehyden als mögliche Enzymsubstrate getestet werden. Solche Studien wurden mehrere Male mit STR-Präparationen unterschiedlicher Reinheit aus *C. roseus*, *R. serpentina* und *Cinchona robusta* sowie auch mit heterolog exprimierter STR und STR1 durchgeführt.^[27,33–36] Etwa 30 Tryptamin-derivate wurden als potenzielle Substrate getestet, von denen ungefähr 1/3 durch die STRs in Gegenwart von Secologanin umgesetzt wurden, wenn auch mit unterschiedlichen Umsetzungsgeschwindigkeiten (meist < 10 % verglichen mit Tryptamin; Tabelle 1).^[27,33–36]

Tabelle 1: Auswahl putativer Tryptamin-derivate mit verschiedenen Substituenten am Indolteil, die für die enzymatische Synthese unterschiedlicher Strictosidine durch Wildtyp-His₆-STR1 getestet wurden.^[a]



Substrat	STR1-Aktivität [%]
Tryptamin	100
5-Fluortryptamin	9.9
5-Hydroxytryptamin	9.5
7-Methyltryptamin	8.9
6-Methyltryptamin	8.9
5,6-Dihydroxytryptamin	7.0
6-Fluortryptamin	6.6
6-Methoxytryptamin	2.1
5-Methyltryptamin	0
5-Methoxytryptamin	0
Dopamin	0

[a] Daten stammen zum Teil aus Lit. [34] (relative Enzymaktivitäten in %; man beachte, dass 5-Methyl- und 5-Methoxytryptamin nicht umgesetzt werden).

Diese Studien haben gezeigt, dass die Indol-Teilstruktur für die Erkennung und Umsetzung durch die STR1 unerlässlich ist. Tryptamine mit kleinen Substituenten (F, OH) am aromatischen Ring werden bereitwillig umgesetzt, während größere Substituenten (CH₃, CH₃O) niedrigere Umsetzungsgeschwindigkeiten ergeben oder die Umsetzung gänzlich verhindern. Auch Änderungen an anderen Stellen der Tryptaminstruktur wurden vom Enzym nicht toleriert. Unter zehn nicht-indolischen Substraten, die jedoch die Ethylamino-Seitenkette des Tryptamins enthielten, setzte die STR nur zwei um, nämlich 3-(2-Aminoethyl)benzofuran und dessen Thiophenderivat.^[35] Die so gewonnenen neuen Strictosidine könnten als exzellente Ausgangsverbindungen für biomimetische Oxo- oder Thio-analoge Indolalkaloide mit deutlich veränderten biologischen und pharmazeutischen Aktivitäten dienen.

In Bezug auf die zweite Pictet-Spengler-Komponente – die Secologaninaldehydderivate – scheint die STR weit weniger tolerant zu sein. Weder Secologaninsäure noch der Aldehyd Iridotrial wurden in die entsprechenden Strictosidin-derivate umgewandelt.^[27,30] Dagegen wurden Derivate, bei denen 1) die Vinylfunktion des Secologanins hydriert war, 2) die 2-OH- und 3-OH-Gruppe der Glucoseeinheit methyliert waren oder 3) die Estergruppe variierte, als Substrate für die enzymatische Kondensation angenommen.^[27,30,36] Des Weiteren berichteten O'Connor und Mitarbeiter über eine bereits bekannte^[37,38] STR aus *Ophiorhiza pumila* (Rubiaceae) mit breiterer Substratazeptanz. Interessanterweise toleriert diese Synthase auch eine Reihe achiraler Aldehyde, die nun für die enzymatische Synthese hoch enantiomerenreiner Tetrahydro- β -carboline (*ee* > 98 %) genutzt werden können.^[39]

Tabelle 1 fasst Amin-Komponenten zusammen, die auf ihre mögliche Umwandlung in Strictosidine in Gegenwart von N-terminaler His₆-markierter STR1 untersucht wurden, und illustriert damit die Vielfalt an Strictosidinen, die mithilfe der Pictet-Spenglerase erhältlich sind. Man darf davon ausgehen, dass diese Strictosidine in weiteren synthetischen oder chemoenzymatischen Ansätzen anwendbar sind. Die Probleme, die im Zusammenhang mit den ineffizienten Umsetzungsgeschwindigkeiten von STR1, dessen selektiver Substratazeptanz und der relativ niedrigen Ausbeute pflanzlicher Quellen auftraten, konnten durch die Einführung von molekular-genetischen Ansätzen durch Kutchan und Mitarbeiter Ende der 1980er Jahre überwunden werden. Diese Arbeiten ebneten außerdem den Weg für die erste Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Enzyms.

3. Erste 3D-Struktur einer Pictet-Spenglerase

3.1. Klonierung, Expression und Kristallisation von STR1

Dank der Verfügbarkeit von homogener und teilsequenzierter STR1 konnte die zugehörige cDNA aus *Rauvolfia*-Zellkulturen isoliert und die aktive Pictet-Spenglerase in *Escherichia coli* exprimiert werden, wobei letzteres auch die Isolierung des korrekten Klangs bestätigte.^[40,41] Die Expression von heterologer und funktioneller cDNA gelang in ver-

schiedenen mikrobiellen Systemen wie Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), *E. coli* und Insektenzellkulturen (*Spodoptera frugiperda*),^[42] sodass das effektivste Expressionssystem ausgewählt werden konnte. Die besten Expressionsbedingungen wurden in *S. frugiperda* erreicht, mit einer Produktion von 10–15 mg L⁻¹ reiner STR1.

Die Pictet-Spenglerase aus *Rauvolfia* sollte das erste Enzym aus sämtlichen Alkaloidbiosynthesewegen sein, deren cDNA kloniert wurde. Zehn Jahre nach der Entdeckung der STR1 stellte somit die Klonierung der STR1-cDNA einen Durchbruch in der STR1-Forschung dar, der einen erheblichen Einfluss auf die gesamte Alkaloidforschung haben sollte.

Bis heute sind insgesamt sechs für die Strictosidin-Synthase codierende cDNAs in Pflanzen der Apocynaceae-Familie entdeckt worden: drei in *Rauvolfia*-Arten (*R. serpentina*,^[40–42] *R. mannii*,^[43] *R. verticillata*^[44]) mit 100 % Sequenzidentität, eine in *C. roseus*^[40,41] und zwei in *Ophiorhiza*-Arten (*O. pumila* und *O. japonica*; Rubiaceae).^[37,38,45] Drei dieser Synthasen (aus *C. roseus* (*Cs-str*), *R. serpentina* (*Rs-str*) und *O. pumila*)^[37] wurden in *E. coli* funktionell exprimiert – am besten untersucht wurde aber die Synthase aus *R. serpentina*, die somit das am besten charakterisierte Enzym im *Rauvolfia*-Alkaloidmetabolismus sowie auch ganz allgemein in der Biosynthese von Alkaloiden ist.

STR1 ist ein exzellentes System, in dessen Struktur und katalytische Wirkungsweise bereits tiefe Einblicke gewonnen werden konnten, insbesondere durch Methoden der Strukturbiochemie. Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur lieferte die notwendigen Informationen für die Aufklärung der vollständigen Architektur des Enzyms, des katalytischen Zentrums und des Enzymmechanismus. Die strukturell und katalytisch wirksamen Aminosäuren konnten identifiziert werden, was als Grundlage für einen gezielten Neuentwurf der eingeschränkten Substrataakzeptanz genutzt werden kann. Eine His₆-tag-STR1 wurde in *E. coli* exprimiert und durch Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie gereinigt, was anschließend eine Kristallisation des nativen STR1 ermöglichte (Abbildung 1a).^[46,47] Ein umfassendes Screening ermittelte die notwendigen Bedingungen für die erfolgreiche Kristallisation der ersten Pictet-Spenglerase.

3.2. Die β -Propeller-Faltung der STR1 und Komplexe mit Substraten und dem Enzymprodukt

Die Röntgenstrukturanalyse hatte ergeben, dass STR1 aufgrund seiner Architektur zur Familie der sechsblättrigen β -Propeller gehört, einer spezifischen Faltung, die damit erstmals im Pflanzenreich gefunden wurde (Abbildung 1b).^[34,46,47] Jedes Propellerblatt besteht aus vier antiparallelen β -Faltblättern A–D. Diese sind um eine Achse angeordnet und bilden so die Bindungstasche des Enzyms, in der die Pictet-Spengler-Kondensation katalysiert wird. Die Struktur des Komplexes, der durch Cokristallisation der STR1 mit dem Substrat Tryptamin erhalten wurde, ließ weitere Einblicke in den Aufbau des Reaktionszentrums zu (Abbildung 1b).^[34] Das Substrat wird tief in der Tasche platziert und koordiniert mit seiner Aminogruppe an Glu309. Der

flache Indolteil ist wie in einem Sandwich zwischen den aromatischen Ringen von Tyr151 und Phe226 angeordnet. Diese Orientierung hilft offensichtlich, das Tryptamin in einer produktiven Anordnung für die Reaktion mit dem zweiten Reaktionspartner Secologanin zu fixieren (Abbildung 1c). Die Struktur des Komplexes mit Secologanin lässt erkennen, dass 1) die hydrophile Glucoseeinheit aus dem katalytischen Zentrum in das umgebende Wasser herausragt und 2) die Aldehydgruppe zur nächsten Aminosäure Glu309 zeigt, die in unmittelbarer Nähe der Aminogruppe des Tryptamins liegt. Dies ist offensichtlich die beste Anordnung für den Beginn der Pictet-Spengler-Kondensation. Die Position der Substrate ist aus der Struktur des Komplexes von STR1 mit dem Enzymprodukt Strictosidin ersichtlich. Wie in Abbildung 1d gezeigt, ist die Position des Enzymprodukts fast identisch mit der der beiden Substrate.

Die Überlagerung aller drei gebundener Liganden im katalytischen Zentrum (Abbildung 1e) ist bis auf relativ kleine Unterschiede (ca. 1.5 Å) identisch. Die Aminosäuren, die an die Zuckerkomponente von Secologanin und Strictosidin koordinieren, sind nicht gezeigt (siehe aber Schema 4), könnten aber indirekten Einfluss auf die Reaktionssequenz haben.

Die gerichtete Mutation von polaren Aminosäuren der Bindungstasche (Tabelle 2) führte zu einem starken Abfall der katalytischen Aktivität – bis auf ca. 0.1 % des Wildtyp-Enzyms, wenn Glu309 gegen Alanin ausgetauscht wurde. Da His307 an den Glucoseteil bindet, nimmt die Enzymaktivität der Mutante His307Ala bis auf ca. 2.3 % ab, und wenn Tyr151 durch Phe ersetzt wird, sinkt die katalytische Effizienz um etwa 26 %. Die 3D-Struktur und die Mutationsstudien legen nahe, dass Glu309 die katalytische Aminosäure ist, die die enzymatische Synthese des Strictosidins durch STR1 bewirkt.

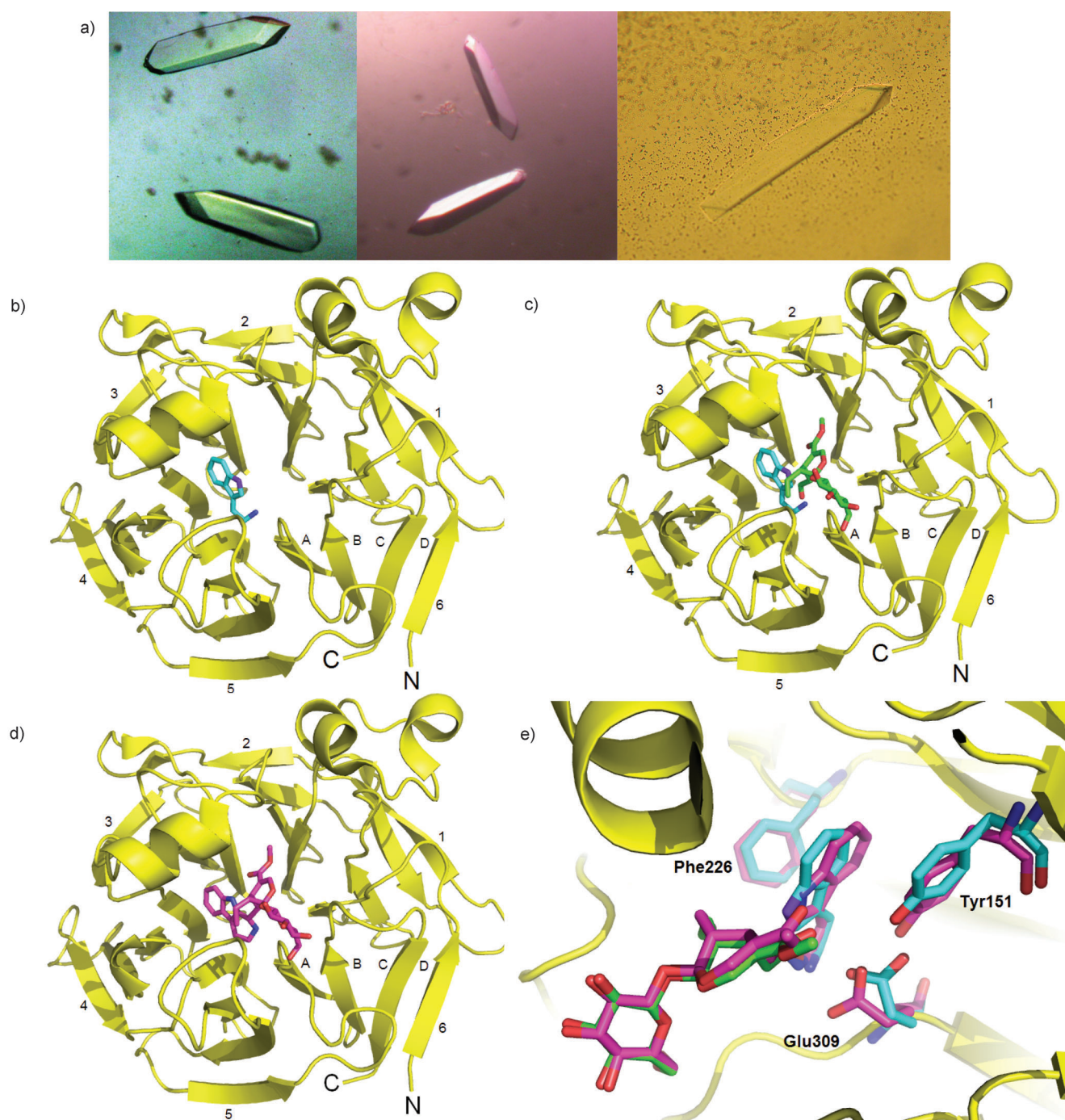
Tabelle 2: Katalytische Effizienz der STR1 und ihrer Mutanten der hydrophilen Reste des aktiven Zentrums.^[34]

Enzyme	k_{cat} [min ⁻¹]	%
Wild-type	78.2	100
Glu309Ala	0.089	0.11
Tyr151Phe	57.7	73.8
His307Ala	1.8	2.3

3.3. Bindungstasche, katalytische Aminosäuren und mechanistische Aspekte der STR1

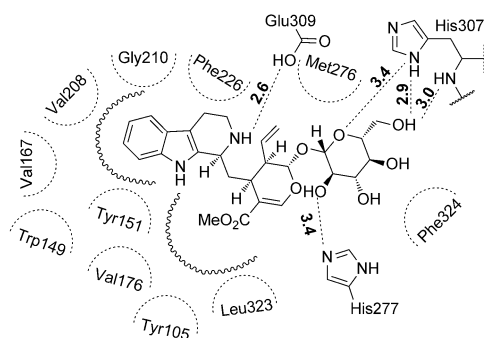
Drei Gruppen von Aminosäuren bilden die Form der Bindungstasche (Schema 4):

- Die hydrophoben Aminosäuren Trp149, Tyr151, Val167, Val208 und Phe226 sowie Gly210; alle sind weniger als 4 Å vom Strictosidin entfernt und interagieren mit dem Tryptaminteil.
- Die vier Aminosäuren Tyr105, Val176, Leu323 und Met276 in der Nähe des Terpengerüsts des Secologanins.
- Die drei Aminosäuren His277, His307 und Phe324 nahe der Glucoseeinheit. Die beiden polaren Histidine findet man am Eingang zur Bindungstasche, sehr wahrscheinlich um das Secologanin – speziell dessen Glucoseteil, der nach



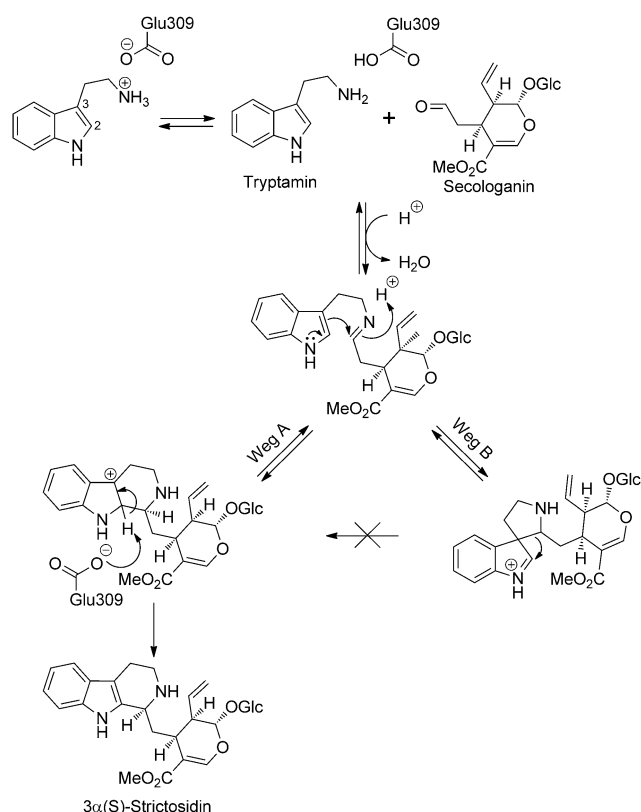
außen gerichtet ist – optimal für die Kondensation mit dem Amin anzuordnen. Die Anordnung beider Histidine geht aus Schema 4 hervor.

Nach der Aufklärung der 3D -Struktur der STR1 – einem wichtigen Meilenstein in der Erforschung der Reaktion – konnten genauere Annahmen zum Mechanismus der enzymkatalysierten Pictet-Spengler-Reaktion und zum mögli-



Schema 4. Vereinfachte Darstellung des STR1-Komplexes mit dem Reaktionsprodukt Strictosidin zur Verdeutlichung der Bindungstasche und der Wechselwirkungen mit Aminosäuren in Distanzen unter 4 Å. Die Bereiche für eine mögliche Modifizierung der Substrate Tryptamin und Secologanin sind durch gewellte Linien gekennzeichnet. Diese Regionen sind geeignet, um durch ortsgerichtete Mutagenese modifizierte STR1-Varianten mit vergrößerter Substratazeptanz zu erzeugen.

chen Neuentwurf des Enzyms gemacht worden. Ähnlich wie bei der chemischen Reaktion folgt der Carbinolbildung – als dem ersten Schritt der PSR – die Bildung einer Schiff-Base (Iminium-Ion) zwischen der Aminogruppe von Tryptamin und der Aldehydgruppe des Secologanins (Schema 5). Basierend auf den 3D-Strukturen der STR1 und ihrer Substrat- und Produktkomplexe wurde vorgeschlagen, dass Glu309 die



Schema 5. Vorgeschlagener Mechanismus der durch Strictosidin-Synthese katalysierten Pictet-Spengler-Reaktion zwischen Tryptamin und Secologanin zur enantioselektiven Bildung der Biosynthesevorstufe 3α(S)-Strictosidin der monoterpenoiden Indolalkaloide.^[50,51]

entscheidende Aminosäure für die enzymatische Pictet-Spengler-Reaktion ist.^[34] Tatsächlich befindet sich Glu309 sehr nahe an der β-Aminofunktion, wodurch sichergestellt ist, dass diese neutral und nucleophil bleibt, um an der PSR-Reaktion und der Bildung des Iminium-Intermediats teilnehmen zu können. Anschließend greift das C2-Atom des Tryptamin-Indolrings die Iminiumspezies in einer elektrophilen Substitution an, unter Bildung eines sechsgliedrigen Ringsystems und eines tertiären Carbokations. Glu309 könnte dann das Kation an C2 deprotonieren, unter Rearomatisierung und der finalen Bildung des 3α(S)-Strictosidins. Ein primärer kinetischer Isotopeneffekt deutet darauf hin, dass die Rearomatisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Dieser Vorschlag wurde auch für die nichtenzymatische PSR in Lösung gemacht. Dieser Isotopeneffekt zeigt auch, dass alle Reaktionsschritte vor der Aromatisierung reversibel sind.^[50,51]

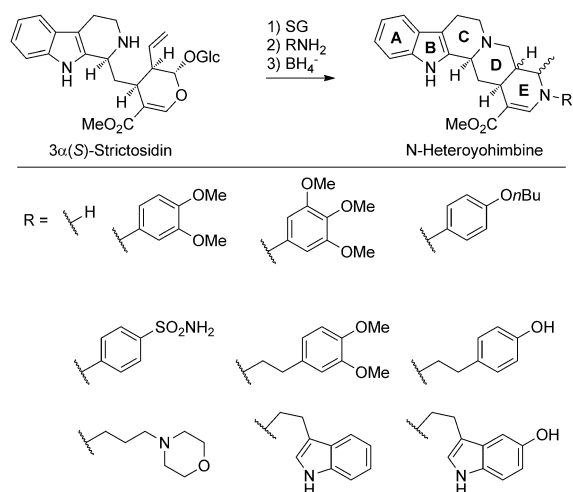
Prinzipiell könnte auch das nucleophile C3 statt des C2 das Iminium-C-Atom für den Ringschluss angreifen. Dies würde jedoch zu einem spirocyclischen Zwischenprodukt führen, das nach Umlagerung einen sechsgliedrigen Ring ergeben würde (Weg B in Schema 5). Laut Ab-initio-Rechnungen sind jedoch der Übergangszustand eines solchen Intermediats sowie die Umlagerung vom fünf- zum sechsgliedrigen Ringsystem energetisch ungünstig. Beide Resultate favorisieren demnach eine Reaktionsfolge über Weg A, und nicht etwa über Weg B.^[49–51]

4. Neue Ansätze zur Synthese neuartiger Indolalkaloide

4.1. Biomimetische Synthese von Heteroyohimbinen mittels STR

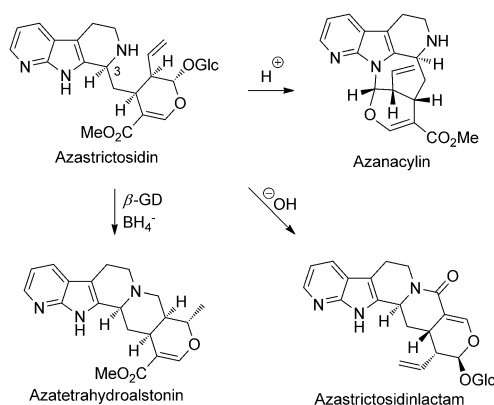
In Anlehnung an den zuerst bekannten enzymkatalysierten Biosyntheseweg zum Ajmalicin^[9–12] wurde ein biomimetischer Zugang zum Heteroyohimbinsystem entwickelt, der einer vorher beschriebenen chemoenzymatischen Synthese ähnelte.^[52,53] Ausgehend vom Strictosidin beginnt die Reaktion mit der Glucosidabsplattung durch die Strictosidin-Glucosidase (SG) – die als Roh- oder teilgereinigter Proteinextrakt aus *C. roseus*- oder *R. serpentina*-Zellkulturen gewonnen wird – oder, falls erforderlich, durch eine bakteriell exprimierte, auf Grundlage der 3D-Struktur mutierte SG (Schema 6).^[54,55] Das hochreaktive Strictosidin-Aglycon (die Vorstufe aller Indolalkaloid-Biosynthesewege, siehe Schema 3) wird gebildet, das anschließend in die bekannten Intermediate Dehydrogeissoschizin und Cathenamin im Biosyntheseweg zum Ajmalicin umgewandelt wird (siehe Details in Lit. [12]). In Gegenwart eines Überschusses eines beliebigen primären Amins (andere Nucleophile wurden noch nicht getestet) schließt sich durch eine Michael-Addition der E-Ring des Heteroyohimbinsystems, und nach Borhydrid-Reduktion wird ein Diastereomergemisch von vier N-analogen Heteroyohimbinen erhalten.^[48,56]

Diese chemoenzymatische „Ein-Topf“-Reaktion wurde kürzlich vereinfacht und, durch die Verwendung rekombinanter His₆-modifizierter, immobilisierter STR1, die durch



Schema 6. Biomimetischer, chemoenzymatischer Zugang zu neuen N-analogen Heteroyohimbinen aus Strictosidin (SG = Strictosidin-Glucosidase).^[48, 56]

Expression ihrer cDNA in *E. coli* hergestellt wurde,^[56] auf die Synthese des neuen Alkaloids Azatetrahydroalstonin ausgedehnt.^[57] STR1 wurde auch für die Synthese von Azastrictosidin aus 7-Azatriptamin genutzt (Schema 7).^[56, 58] Weiterhin



Schema 7. „Einstufige“ chemische und chemoenzymatische Synthese neuer Azaindol-Alkaloide aus Azastrictosidin (β-GD = β-Glucosidase).^[56]

konnte Azastrictosidin auch für einfache „einstufige“ Synthesen der neuen Alkaloide Azastrictosidinlactam und Azanacylin unter basischen bzw. sauren Bedingungen verwendet werden.^[56]

Die Modifizierung der Tryptaminstruktur durch Einführung von Stickstoffatomen in unterschiedlichen Positionen des C-Gerüsts sollte so eine Vielfalt strukturell diverser, neuer Azaindol-Alkaloide zugänglich machen.

In einer weiteren Strategie führte die Expression der STR1- und SG-cDNAs in *E. coli* mithilfe eines neu konstruierten dualen Vektors zur chemoenzymatischen Synthese des Heteroyohimbin-Alkaloids Tetrahydroalstonin.^[59]

4.2. Alkaloid-Bibliotheken durch strukturbasierten Neuentwurf der STR1

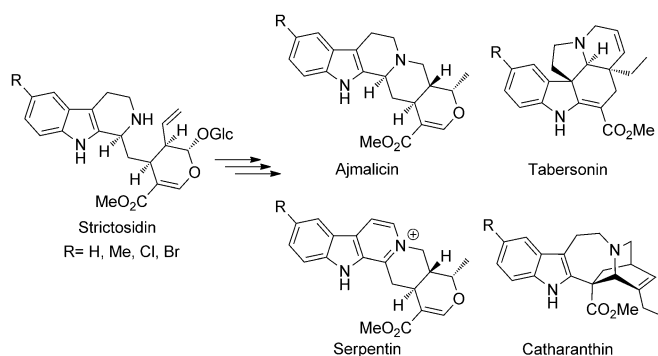
Die 3D-Struktur des STR1-Komplexes mit Strictosidin wurde als Grundlage herangezogen, um nach Möglichkeiten zu suchen, wie die Substratspezifität auf strukturell modifizierte Tryptamine (insbesondere im aromatischen Teil) ausgedehnt werden könnte. Die Substratstudien hatten gezeigt, dass sperrige Gruppen an den Positionen C5 und C6 zu schlechter Substraterkennung oder gar keiner Umsetzung führten (siehe Abschnitt 2.4). Die Analyse der Aminosäuren im aktiven Zentrum von STR1 hatte ergeben, dass Try149, Val167 und besonders Val208 die genannten Positionen C5 und C6 im Tryptamin abschirmen, sodass z. B. 5-Methyl- und 5-Methoxytryptamin wohl gar nicht an die STR1 binden (jedenfalls werden beide Verbindungen von der STR1 nicht umgesetzt).

Die Mutation von Val208 (in einer Entfernung von 4 Å von der C5-Position) zur kleinen Aminosäure Ala ergab die mutierte Val208Ala-Pictet-Spenglerase, die erstmals die 5-Methyl- und 5-Methoxystrictosidine lieferte. Die gleiche Mutante ermöglichte auch die enzymatische Synthese entsprechender 6-Methyl- und 6-Methoxystrictosidine mit weit aus höherer Effizienz als das Wildtypenzym.^[48] Die 3α(S)-Konfiguration blieb bei diesem strukturbasierten Ansatz erhalten.^[48] Die Methylestergruppe und die Vinylseitenkette des Secologanins können in gewissem Ausmaß ebenfalls modifiziert werden, insbesondere durch längere Ketten. Diese analogen Strictosidine können ebenfalls zu neuen Heteroyohimbinen umgesetzt werden, z. B. zu Serpentinderivaten.^[36, 60]

Basierend auf den Erkenntnissen aus der 3D-Struktur scheint es, dass die Substratelektivität der STR und STR1 leicht manipuliert werden kann. Dies könnte letztendlich zu einer signifikant höheren Alkaloiddiversität der hier beschriebenen Syntheseansätze sowie zu einem noch besseren Verständnis der Pictet-Spenglerasen führen. Dass von sieben mutierten STR1 fünf eine erweiterte Substratakzeptanz aufweisen (Stöckigt et al., unveröffentlichte Ergebnisse), verdeutlicht, dass eine strukturbasierte Modulation der STR1-Aktivität anwendbar ist. Dieses Vorgehen könnte künftig auf weitere Mutanten des Enzyms oder der SG aus *R. serpentina* oder anderen Pflanzen ausgedehnt werden. Durch Einbeziehung einer ganzen Bandbreite kommerziell erhältlicher primärer Amine wird es außerdem möglich sein, den biomimetischen Ansatz (siehe Abschnitt 4.1) mit diesem strukturorientierten Ansatz zu kombinieren. Vorher nicht umsetzbare Tryptamin-derivate (siehe Abschnitt 2.4), darunter die Aza-tryptamine, können so zusätzlich angewendet werden.^[48, 56] Eine solche kombinatorische Strategie könnte zu einem chemoenzymatischen Konzept für die Herstellung großer und strukturell diverser Substanzbibliotheken von tausenden von Heteroyohimbin-Alkaloiden mit pharmakologischer Aktivität führen. Das Heteroyohimbin-Alkaloid Ajmalicin zeigt z. B. positive Wirkungen bei postischämischem Sauerstoffmangel und zerebralem Schutz, und es besteht ein weiterer Bedarf an neuen Medikamenten mit verbesserter Wirkung.^[61–63]

4.3. Metabolische Umprogrammierung der Alkaloid-Biosynthese

Ein weiteres Projekt, das abermals die große Bedeutung der 3D-Strukturanalyse aufzeigte, war der Neuentwurf der STR aus *C. roseus*. Hierbei konnten Substratanaloga für die Synthese neuer Strictosidine durch In-vivo-Transformation oder für die Synthese neuer nichtnatürlicher Indolalkaloide genutzt werden.^[64,65] Die 3D-Struktur der STR1 war somit nicht nur für die Herstellung neuer Alkaloide durch chemoenzymatische Strategien hilfreich, sondern auch für die erste dirigierte Umprogrammierung in der Alkaloidbiosynthese in *C. roseus*-Wurzeln. Die transgenen Wurzeln produzierten in vivo verschiedene neue *Catharanthus*-Alkaloide mit Substituenten an C5 (C10 in Strictosidin), wenn die Zellen genetisch so umprogrammiert wurden, dass sie die STR-Mutante Val214Met produzierten (die Val214-Mutante der *Catharanthus*-STR entspricht der *Rauvolfia*-STR1-Mutante Val208Ala). Mutationen dieser Aminosäure führen zur Modifizierung in der C5-Region. Wenn transgene Wurzeln, die die cDNA der nichtnatürlichen STR-Mutante exprimierten, mit C5-substituierten Tryptaminanaloga gefüttert wurden, entstand eine Serie neuer entsprechend substituierter Alkaloidtypen (Schema 8).^[58]



Schema 8. In-vivo-Bildung einer Auswahl neuer monoterpenoider Indolalkaloide mit einem Substituenten an C5 durch Umprogrammierung der Biosynthesewege zum Ajmalicin, Tabersonin, Serpentin und Catharanthin in *C. roseus*. Die Pflanzenzellen waren mit der cDNA der strukturbasiert mutierten Strictosidin-Synthase transformiert worden, sodass sie 5-substituierte Tryptaminanaloga in entsprechend substituierte Alkaloide umwandelten.^[64, 65a,b]

In einem ähnlichen Ansatz wurde die für die Tryptamin-Biosynthese und damit für die Alkaloidproduktion in *C. roseus*-Wurzeln zuständige RNA durch Desaktivierung der Tryptophan-Decarboxylase blockiert. Wenn dann an diese Wurzeln Tryptaminderivate appliziert wurden, erfolgte ihre biosynthetische Umwandlung in nichtnatürliche 5-Fluor-substituierte Alkaloide (5-Fluorajmalicin, 5-Fluorcatharanthin oder 5-Fluortabersonin).^[65a]

Bei einer eleganteren Strategie wurden *C. roseus*-Wurzeln mit dem bakteriellen Gen der Tryptophan-chlorierenden Flavin-Halogenase zusammen mit der cDNA der STR-Mutante transformiert, sodass eine Umwandlung von 5- oder 7-Chlortryptamin in chlorierte Strictosidine erfolgte. Die cDNA der Halogenase führt dabei zur Bildung von 5- und 7-Chlortryptophanen, die in vivo zu den entsprechenden

Tryptaminen decarboxyliert und dann über die STR-Mutante zu einer Auswahl chlorierter Alkaloide wie Chlorajmalicin, Chlortabersonin, Chlorcatharanthin und Chlordihydroajmalicin umgewandelt werden.^[65b] Diese Resultate demonstrieren eindrucksvoll die Möglichkeiten eines gezielten Metabolic-Engineering von Biosynthesewegen, wie es ursprünglich für Prokaryoten gezeigt wurde, nun aber auch auf metabolisch viel komplexere Systeme wie Pflanzen anwendbar ist.^[66]

Mit einer solchen Strategie sind nun modifizierte pflanzliche Naturstoffe mit pharmakologisch interessanten Wirkungen zugänglich, die in komplizierten und langen Biosynthesewegen, wie denen der monoterpenoiden Indolalkaloide, aufgebaut werden. Ein wichtiger Vorteil dieser Strategie ist, dass die industrielle Anwendung von Pflanzenzellen und Organkulturen (Wurzeln) z. B. zur fermentativen Produktion von Berberin^[67] oder Taxol^[68, 69a,b] seit Jahrzehnten etabliert ist, sodass keine zusätzlichen Entwicklungen getätigt werden müssen, falls größere Mengen dieser neuen Alkaloide gebraucht werden.

Die zweite Pictet-Spenglerase, die Norcoclaurin-Synthase (NCS), die an der Biosynthese der Isochinolinalkaloide beteiligt ist und kürzlich ebenfalls eingehend untersucht wurde, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

5. Norcoclaurin-Synthase

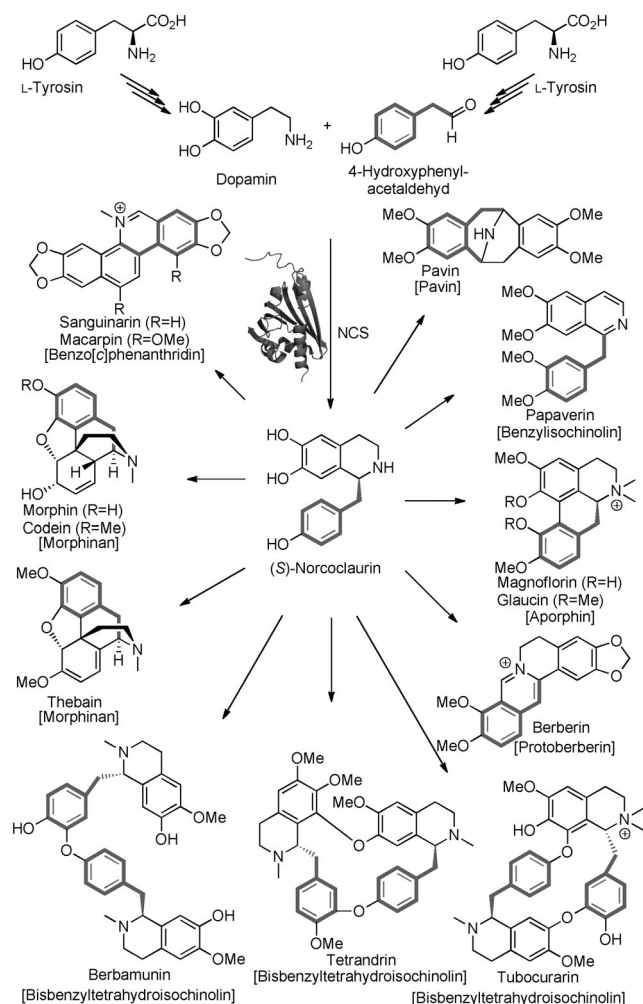
Die Norcoclaurin-Synthase (NCS; EC 4.2.1.78), die mittlerweile ebenfalls als eine Pictet-Spenglerase identifiziert und charakterisiert wurde, wurde ursprünglich vor 30 Jahren entdeckt,^[70] nur zwei Jahre nach Entdeckung der Strictosidin-Synthase.^[18,19] Das Enzym katalysiert die stereospezifische Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd (4-HPAA). Beide Substrate entstehen aus L-Tyrosin.^[70] Durch In-vivo-Fütterungsexperimente wurde damals (*S*)-[1-¹³C]-Norcoclaurin in hohen Ausbeuten (2.5–36 %) in diverse Alkaloide der Aporphin-, Protoberberin-, Benzophenanthridin- und Pavin-Familien eingebaut.^[70] Die NCS liefert das (*S*)-Norcoclaurin, das als zentrale Biosynthesevorstufe vieler, wahrscheinlich gar aller Benzylochinoline gilt.^[70,71]

5.1. Funktionelle Bedeutung der NCS, des NCS-Produkts Norcoclaurin und davon abgeleiteter Alkaloide

Die funktionelle Bedeutung der NCS liegt darin, die biosynthetische Schlüsselverbindung für vermutlich alle Alkaloide der Benzylochinolin-Familie in Pflanzen bereitzustellen. Diese Alkaloidfamilie umfasst die erstaunliche Zahl von schätzungsweise 3000 chemischen Strukturen unterschiedlichster Arten, darunter einfache Benzylochinoline, Bisbenzylochinoline, Protoberberine, Morphinane, Pavine, Benzo[α]phenanthridine und andere mehr. Viele dieser Verbindungen verfügen über eine breite pharmakologische Wirkung und sind zu therapeutisch wichtigen Pharmaka entwickelt worden.

Seit der Entdeckung des ersten Alkaloids der Benzylochinoline, des Morphins, vor über 200 Jahren hat sich die

Alkaloidforschung zu einem enorm vielfältigen Betätigungsfeld für die synthetische, analytische und Naturstoffchemie entwickelt. Ein wesentliches Ziel der Naturstoffforschung ist die Klärung der Frage, wie eine Pflanzenzelle Biosynthesewege zur Synthese strukturell komplexer Alkaloide nutzt. Wie das Schema 9 zeigt, kondensiert die Pictet-Spenglerase NCS stereospezifisch Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd (grau).



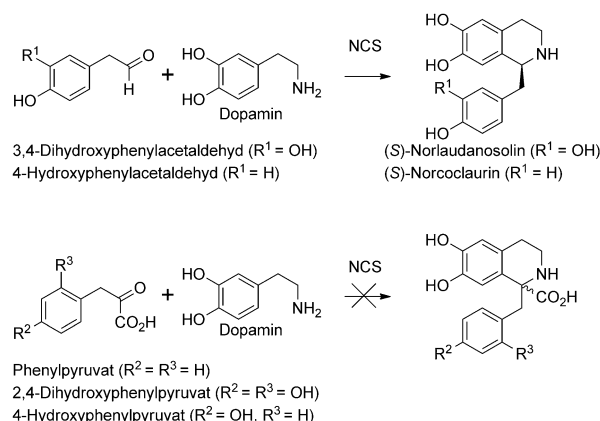
Schema 9. Die Schlüsselfunktion der Norcoclaurin-Synthase und ihres Enzymprodukts (S)-Norcoclaurin in der Biosynthese, inklusive bekannter Beispiele von Alkaloiden der großen Benzylisochinolin-Familie (NCS = Norcoclaurin-Synthase).

Die Biosynthese führt über das zentrale Intermediat (S)-Norcoclaurin und verschiedene Biosynthesewege zu Alkaloidgerüsten mit hoher Diversität. Beispiele bekannter Benzylisochinolin-Alkaloide sind in Schema 9 aufgeführt.

Somit ist die zentrale Biosynthesefunktion des Norcoclaurins mit der vorhergehend diskutierten Bedeutung des Strictosidins in den Indolalkaloid-Biosynthesen vergleichbar (Abschnitt 2.2, Schema 3). Beide Pictet-Spenglerasen, STR1 und NCS, nehmen damit eine Schlüsselstellung am Anfang der enzymkatalysierten Synthesewege zu den Indol- und Isochinolin-Familien mit zusammen etwa 5000 Mitgliedern ein.

5.2. Entdeckung und Charakterisierung der NCS

Die Aktivität der Norcoclaurin-Synthase – mit 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd als Substrat (daher der ursprüngliche Name des Enzyms, (S)-Laudanosolin-Synthase) – wurde erstmals durch Zenk und Mitarbeiter in Zellmaterial von zehn Pflanzengattungen dreier Pflanzenfamilien (Berberidaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae) entdeckt,^[70] die für ihre Synthese von Benzylisochinolin-Alkaloiden bekannt sind. Wichtig ist, dass die Experimente zeigten, dass Phenylbrenztraubensäure sowie ihre 4-Hydroxy- und 2,4-Dihydroxyderivate nicht als Substrate der NCS fungieren (Schema 10).^[70]



Schema 10. Entgegen frühere Vorschläge setzt NCS keine α -Ketosäuren wie Phenylpyruvat und dessen Derivate um. Dagegen fungieren 4-Hydroxyphenylacetaldehyd und dessen 3,4-Dihydroxyderivat als Substrat für die Pictet-Spengler-Reaktion mit Dopamin.^[70]

Diese Resultate bestätigten frühere Vorschläge von Winterstein und Trier (1910),^[72] die nur ein Jahr vor der Entdeckung der Pictet-Spengler-Reaktion^[1] publiziert worden waren. Die In-vivo-Experimente schlossen also die vormals^[73] angenommene Rolle der Norlaudanosolin-1-carbonsäure als Biosynthesezwischenprodukt aus. Ähnlich wie bei den STR-Studien, war auch für die NCS-Experimente die Verfügbarkeit von Pflanzenzellsuspensionskulturen eine Voraussetzung für die Isolierung und Reinigung der NCS sowie anderer Enzyme der Isochinolinalkaloid-Biosynthese, inklusive früherer Biosyntheseschritte auf der Stufe der Aminosäuren.^[70]

Etwa ein Jahrzehnt später begann eine intensive Erforschung der NCS durch Facchini und Mitarbeiter.^[74,75] Die Verwendung von kultivierten Pflanzenzellen (*Thalictrum flavum*, Gelbe Wiesenraute) war abermals entscheidend, um genügend Enzym für die weitere biochemische Charakterisierung zu erhalten.^[75] In diesem Stadium der Untersuchungen wurden vier Isoformen des Enzyms nachgewiesen, und kinetische Analysen wiesen auf eine Reaktion der NCS hin, bei der zuerst der Aldehyd, dann das Dopamin gebunden wird. Die Ergebnisse schufen eine weitere Basis für molekulare Untersuchungen des Enzyms sowie für die heterologe Expression der cDNA der *Thalictrum*-NCS in *E. coli*.^[75]

5.3. Heterologe Expression der NCS-cDNA

Die Isolierung eines für das Enzym codierenden Klons resultierte in einer sehr geringen heterologen Expression, die aber genügte, um ausreichende Enzymmengen zur Wiederholung der kinetischen Analysen zu gewinnen.^[75a] Eine hoch produktive Expression einer verkürzten NCS (der die ersten 19 Aminosäuren am N-Terminus fehlen) in *E. coli* konnte später etabliert werden. Nach erfolgreicher Optimierung wurden so bis zu 15 mg aktives Enzym pro Liter Bakterien-suspension erhalten.^[75b] Das Anfügen eines C-terminalen His₆-tags, kombiniert mit der sehr häufig genutzten Metall-ionenaффinitätschromatographie (Nitrilotriessigsäure) ergab erstmals reine Synthase; das später genutzte NCS-Expressionsprotokoll zur Kristallisation des Enzyms war ähnlich. Eine kinetische Analyse der durch die His₆-NCS katalysierten Reaktion wurde mithilfe eines Circular dichroismus (CD)-Assays durchgeführt. Der Vorteil dieses Assays ist, dass nichtenzymatisch gebildetes, racemisches Norcoclaurin (Hintergrundreaktion) nicht mit den enzymatischen Umsetzungen interferiert.^[75b]

Die kinetischen Profile der His₆-tag-NCS zeigten normale Michaelis-Menten-Kinetiken mit einem hyperbolischen Profil für 4-Hydroxyphenylacetaldehyd und einem sigmoidalen Profil für Dopamin. Die Ergebnisse wurden mit dem Vorliegen eines NCS-Homodimers in Lösung erklärt, sowie damit, dass das erste Dopamin die Affinität der Synthase zum zweiten Dopamin erhöht (was aber durch NMR-Analysen nicht bestätigt werden konnte, siehe Abschnitt 5.4). Weiterhin offenbarten Substratstudien, dass die NCS keine besonders stark ausgeprägte Substratspezifität aufweist. Wenn auch nur eine relativ kleine Zahl möglicher Substrate getestet wurde, ist inzwischen klar ersichtlich, dass die Aminkomponenten 4-Desoxy- und 4-Methoxydopamin sowie 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd enzymatisch umsetzbar sind. Diese Enzymeigenschaften könnten zukünftig für die Erzeugung neuer Benzyloisochinolin-Alkaloide aus entsprechenden Norcoclaurin-Analoga in ähnlicher Weise genutzt werden, wie es für die Strictosidine und deren Verwendung zur Synthese neuer Indolalkaloide beschrieben wurde.^[48,56]

Ähnlich wie für die STR1 berichtet,^[50] wurde auch für die NCS ein primärer Isotopeneffekt beobachtet. Daraufhin schlugen die Autoren vor, dass auch hier die Rearomatisierung der erste irreversible und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der enzymkatalysierten Norcoclaurinbildung ist (Schema 9). Basierend auf den biochemischen Daten wurden ursprünglich zwei Mechanismen für die NCS-Reaktion diskutiert (Abschnitt 5.5).^[75b]

Eine Sequenzanalyse der cDNA der *Thalictrum*-NCS ergab eine moderate Identität (ca. 30 %) und strukturelle Homologie zu den Bet-v1-Proteinen. Bet v1 ist als Birkenpollenallergen gut bekannt und gehört zur Unterfamilie der Pathogenese-verwandten Proteine (PR-10-Proteine) mit noch unbekannter Funktion in Pflanzen.^[76]

Aus einer anderen pflanzlichen Quelle, einer Zellsuspension von *Coptis japonica* (Japanischer Goldfaden), wurden eine zur *Thalictrum*-cDNA deutlich verschiedene cDNA sowie ein weiteres PR-10-homologes Protein erhalten. Beide Enzyme sind völlig verschieden, weisen aber beide

NCS-Aktivität auf. Die *Coptis*-NCS ist Fe²⁺-abhängig und hat ein Fe²⁺-Bindungsmotiv. Das PR-10-Protein ist nicht Fe²⁺-abhängig und zeigt breitere Substrattoleranz. Es akzeptiert neben 4-Hydroxyphenylacetaldehyd offensichtlich auch Phenyl- und 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd sowie Pyruvat und 4-Hydroxyphenylpyruvat.^[77] Aufgrund dieser Resultate, und der gegenwärtig vorhandenen Daten, kann man davon ausgehen, dass vielleicht mehrere, unterschiedliche Proteine die Pictet-Spengler-Reaktion zwischen Dopamin und strukturell verwandten Aldehyden in höheren Pflanzen katalysieren können.

Für ausführlichere Studien zur NCS (z.B. der NMR-spektroskopischen Untersuchung der 3D-Struktur in Lösung) wurde reines, isotoptenmarkiertes Protein in Mengen von mehreren Milligramm benötigt. Solche Enzymmengen aus dem Sekundärstoffwechsel können in der Regel nur über optimierte Expressionsraten entsprechender cDNAs in heterologen Systemen (z.B. *E. coli*) erhalten werden. *E. coli* wird häufig für die Herstellung von His-tag-Enzymen aus pflanzlichen Biosynthesewegen verwendet. Für die NCS wurden zwei ähnliche und effektive *E. coli*-Expressionssysteme vorgestellt, die ausreichende Proteinmengen ergaben.^[78] Ein Ansatz lieferte verkürzte (um die ersten 19 oder 29 Aminosäuren) His₆-tag-NCS, die andere Methode NCS mit einem His₆-tag am C-Terminus sowie einer weiteren Nukleotidsequenz am N-Terminus.

5.4. Struktur der NCS in Lösung und im Kristall

2D- und 3D-NMR- sowie CD-Experimente lieferten erste Einblicke in die 3D-Struktur der NCS in Lösung. Hierbei konnten 86 % der Aminosäuren der Proteinkette von deuterierter ¹⁵N, ¹³C-markierter NCS zugeordnet werden. Dieses Ergebnis zeigte eine hohe Homologie zur Faltung des Bet-v1-Birkenpollenallergens. Mithilfe der bekannten Röntgenstruktur dieses Proteins als Vorlage wurde eine homologe NCS-Struktur konstruiert.^[76] Dieses Modell besteht aus sieben antiparallelen β -Faltblättern. Eine lange α -Helix am C-Terminus befindet sich unterhalb von zwei kurzen α -Helices. Zu beachten ist, dass diese beiden kurzen Helices die einzigen Strukturelemente sind, die nicht in der Bet-v1-Struktur auftreten. Das Modell wies nicht nur auf eine enge strukturelle Verwandtschaft zwischen NCS und Bet v1 hin, sondern zeigte erstmals durch die 3D-Struktur, dass die *Thalictrum*-NCS ein neues Mitglied der Bet-v1-Familie darstellt. Dies wurde später zweifelsfrei durch die Röntgenstruktur der kristallisierten NCS bestätigt (siehe Abschnitt 5.5).

Das Homologie-Modell war auch hilfreich für eine teilweise Beschreibung der Substratbindungsstelle der NCS. Zusammen mit NMR-Titrationsexperimenten mit Dopamin und Substratanaloga (Aldehyden) spricht das Modell für eine Beteiligung von Phe71 und Met155 an der Dopaminbindung. Da jedoch die Aldehydderivate zu Umlagerungen der Enzymseitenketten führten, konnte die Bindungsstelle für diese Substrate nicht eindeutig identifiziert werden. Kinetische Studien, die zuvor an der *Thalictrum*-NCS durchgeführt wurden, sprachen für eine Dopamin-induzierte Dimerisie-

rung des Enzyms mit kooperativer Dopamin-Bindung.^[74, 75a,b] Kooperativität der Substratbindung kann eine wichtige Regulationsfunktion in Biosynthesen einnehmen – in diesem Fall zu Beginn der enzymatischen Bildung der *Thalictrum*-Alkaloide oder möglicherweise für alle NCS-abgeleiteten Alkaloide. NMR-Relaxationsmessungen sowie Größenausschlusschromatographie ergaben jedoch Belege für das Vorliegen monomerer – nicht dimerer – NCS bei relativ geringen Enzymkonzentrationen (10–1000 μM). Diese Daten stimmen mit Ergebnissen einer nicht-kooperativen Dopamin-Bindung überein, die zuvor mit NCS-Präparationen aus mehreren Pflanzenarten, einschließlich *Thalictrum tuberosum*, erhalten wurden.^[70a,b] Es muss berücksichtigt werden, dass in vivo die realen Enzymkonzentrationen am Ort der Biosynthese normalerweise nicht bekannt sind.

Die meisten bis hier diskutierten Eigenschaften der NCS wurden kürzlich durch die eindrucksvolle Kristallisation und erstmals publizierte Röntgenstruktur des Enzyms bestätigt und ergänzt.^[78b, 79a,b] Nach der STR1 ist die NCS nun die zweite Pictet-Spenglerase, die durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert wurde. Obgleich die NCS keine Sequenz- oder Strukturähnlichkeit zum β -Propeller der STR1 aufweist, katalysieren beide Enzyme eine Pictet-Spengler-Reaktion. Die 3D-Strukturdaten des His₆-tag-NCS-Proteins bestätigen wiederum, dass es zur Bet-v1-Familie der PR-10 Proteine gehört. In Abbildung 2 sind zum Vergleich die 3D-Strukturen der NCS und des Bet-v1-Proteins gegenübergestellt.

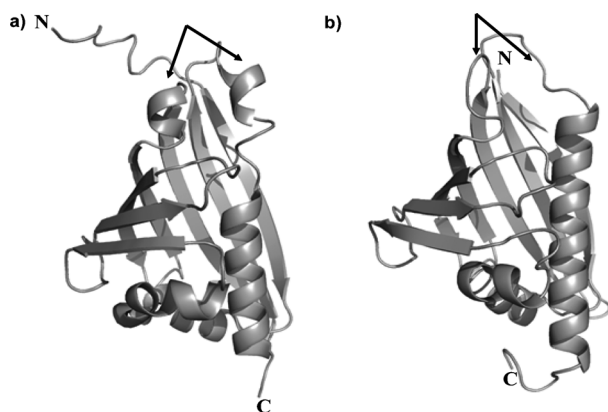


Abbildung 2. Vergleich der 3D-Gesamtstrukturen a) der Pictet-Spenglerase NCS aus *Thalictrum*-Pflanzen mit b) dem Birkenpollenallergen Bet v 1. Die gleiche Faltungsstruktur und die nahe Verwandtschaft beider Proteine sind klar erkennbar (PDB: NCS, 2VNE und Bet v 1, 1BV1; NCS wurde für die Expression in *E. coli* um 19 Aminosäuren am N-Terminus verkürzt).

Die Herstellung des Synthase-Komplexes mit dem Substrat Dopamin und dem nicht-umsetzbaren Aldehydanalogon 4-Hydroxybenzaldehyd (4-HBA) lieferte wichtige und detaillierte Einblicke in die Struktur des katalytischen Tunnels, in dem die beiden Substrate durch die hydrophoben Wechselwirkungen ihrer Arenringe eine Sandwich-artige Orientierung einnehmen. Das aktive Zentrum der NCS besteht aus Tyr108, das Wasserstoffbrücken bildet, und drei stark polaren Aminosäuren Glu110, Lys122 und Asp141, die vermutlich

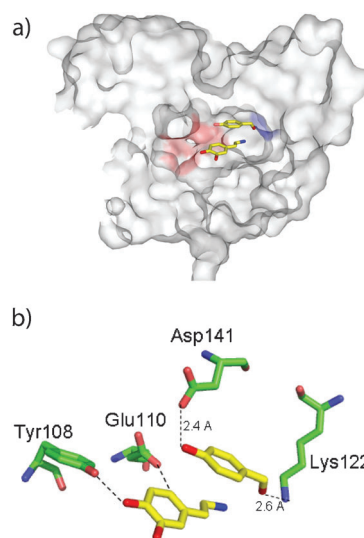


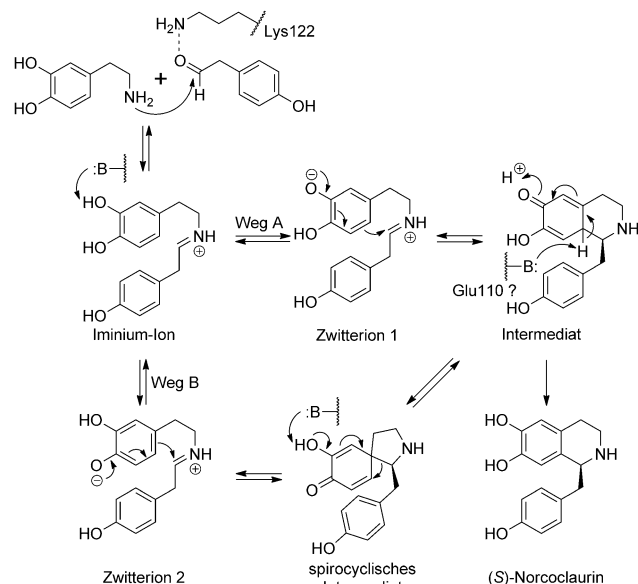
Abbildung 3. a) Transparente Darstellung des Reaktionszentrums der Norcoclaurin-Synthase aus *Thalictrum* mit der inneren Oberfläche des Proteins im Komplex mit seinem Substrat Dopamin und dem nicht-akzeptierten 4-Hydroxybenzaldehyd. b) Vergrößerte Darstellung des katalytischen Zentrums der NCS, einschließlich der mit dem Substrat wechselwirkenden Aminosäuren. PDB: 2VQ5, NCS im Komplex mit Dopamin und 4-HBA.^[79a]

alle an der katalytischen Bildung von Norcoclaurin teilnehmen (Abbildung 3). Von diesen Aminosäuren ist Lys122 wahrscheinlich die katalytisch wirksame, da die Mutante Lys122Ala keine Enzymaktivität mehr aufweist. Ein Austausch von Tyr108 und Glu110 gegen Phe bzw. Ala führte hingegen nur zur Abnahme der Enzymaktivität. Klare Informationen zur Rolle von Asp141, z.B. durch Mutationsexperimente, scheint es noch nicht zu geben, obschon Asp141 sogar näher zur OH-Gruppe von 4-HBA steht (ca. 2,4 Å) als das katalytische Lys122 (ca. 2,6 Å). Die Anordnung der vier Aminosäuren legt einen Reaktionsmechanismus nahe, wie er im nächsten Abschnitt (Sektion 5.5) diskutiert wird. Für Einzelheiten des angenommenen Mechanismus, der sich vom Mechanismus der Strictosidin-Synthase unterscheidet, siehe auch Lit. [51, 79a,b].

5.5. Mechanistische Aspekte der NCS-Reaktion

Auf der Grundlage von Resultaten der letzten fünf Jahre – einschließlich biochemischer und kinetischer Untersuchungen,^[75a,b] NMR-Daten der NCS-Struktur in Lösung^[76] und der ersten Röntgenstrukturanalyse^[78b, 79a,b] – wurden zwei Reaktionssequenzen mit zweistufigem Mechanismus für die Wirkungsweise der NCS vorgeschlagen (Weg A und B in Schema 11).

Der Reaktionsweg B verläuft über vier Zwischenprodukte, einschließlich einem spirocyclischen Intermediat. Höchstwahrscheinlich kann dieser Weg ausgeschlossen werden, so wie bereits vorher für das STR1-Enzym.^[50] Kinetische Daten für die Umsetzung von 4-Methoxydopamin und *m*-Tyramin (4-Deoxydopamin) zeigten, dass beide exzellente Substrate für die NCS sind, vergleichbar mit dem Dopamin



Schema 11. Vorschlag für den Verlauf der NCS-katalysierten Reaktion über einen typischen difunktionellen Säure/Base-Mechanismus, ähnlich dem häufig beschriebenen Mechanismus der chemischen Pictet-Spengler-Reaktion.^[51, 75b, 79a,b]

selbst. Für beide Verbindungen gilt, dass eine Substitution an der 4-Position die intermediäre Bildung einer Spiroverbindung unmöglich macht.

Eine weitere Substratstudie stützt die obige Schlussfolgerung: Anders als die in 4-Stellung substituierten Substrate werden 3-Methoxy- und 3-Desoxydopamin durch NCS nicht umgesetzt, wahrscheinlich weil ihnen die saure OH-Gruppe an C3 fehlt, die für den Ringschluss zum spirocyclischen Intermediat notwendig wäre. Auch dieser Befund spricht für den Reaktionsweg A.

Die Röntgenkristallstruktur der NCS lässt den Schluss zu, dass das positiv geladene Lys122 (die katalytische Aminosäure) die aldehydische Carbonylgruppe für die Bildung der Schiff-Base mit dem Dopamin polarisiert. Zusätzlich könnte Lys122 an der Wasserabspaltung vom intermediären Carbinolamin (Struktur nicht gezeigt) mitwirken. Die Cyclisierung könnte durch Glu110 unterstützt werden, das zusätzlich die Aromatisierung zur finalen Norcoclaurin-Bildung begünstigt. Die genauen Funktionen der Aminosäuren, die an den letzten Reaktionsschritten von Weg A beteiligt sind, müssten jedoch noch bewiesen werden.

Es ist zu erwarten, dass ähnlich zur erfolgreichen Anwendung der STR1 für In-vivo-Transformationen und chemoenzymatische Synthesen von Alkaloid-Bibliotheken auch die Norcoclaurin-Synthase ein großes Potential für die Herstellung von neuen Benzylisochinolininen haben wird, einschließlich Verbindungen mit interessanten therapeutischen Eigenschaften.

6. Transfer und Umprogrammierung der THIQ-Biosynthese: von der Pflanzenzelle zum mikrobiellen Wirt

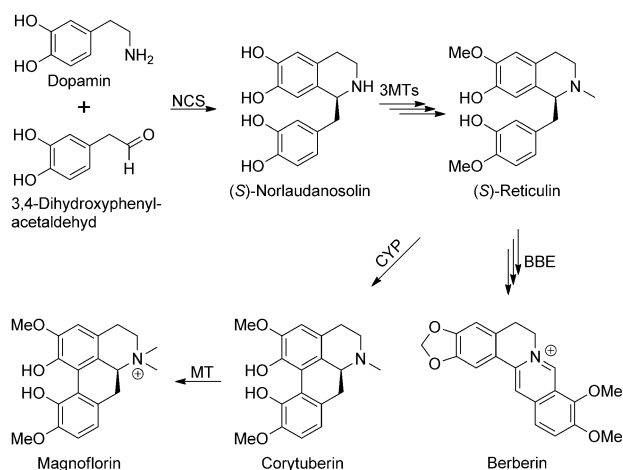
Pflanzenzellen sind im Vergleich zu Mikroben groß und weisen einen langsamen Stoffwechsel auf, speziell bei der Bildung und Umsetzung von Sekundärmetaboliten wie Alkaloiden. Die Anreicherung und Speicherung von Alkaloiden in Pflanzenorganen (Wurzeln, Wurzelrinde, Blätter) läuft im Zeitraum von Jahren ab, und auch in Pflanzenzellkulturen kann die Produktion von Alkaloiden mehrere Wochen dauern. Dagegen können Mikroorganismen z.B. Antibiotika in wenigen Tagen bilden, was einen großen Vorteil mikrobieller Wirtssysteme gegenüber pflanzlichen Systemen aufzeigt.

Erfolgreiche Forschungen über die Antibiotika-Biosynthese und deren Neuentwurf in Bakterien könnten leicht mit jenen auf dem Alkaloidgebiet mit pflanzlichen Zelle verglichen werden. Anders als bei Bakterien, in denen Gencluster die Biosynthese regulieren, sind die Biosynthesegene der Pflanzen gewöhnlich im gesamten Genom verteilt. Die Genome von Pflanzen sind weitaus größer als die von Bakterien, sodass die Isolierung einzelner Enzyme und Gene (cDNAs) eines pflanzlichen Biosyntheseweges sehr schwierig und zeitaufwendig sein kann. Trotzdem könnte die Erforschung und Entwicklung effizienter Produktionsstämme für wertvolle, strukturell diverse Pflanzenstoffe in rekombinanten Mikroorganismen eine neue Möglichkeit für eine zukünftige Bereitstellung pflanzlicher Naturstoffe und deren Analoga darstellen.^[80, 81a,b]

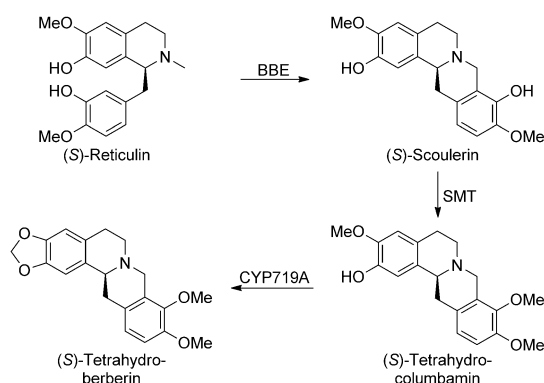
Einer der jüngsten Erfolge auf dem Gebiet der Alkaloide betrifft die erstaunliche Produktionsrate von Taxadien, der ersten Zwischenstufe in der Biosynthese des Krebstherapeutikums Taxol. Bis zu 1 g Taxadien pro Liter konnte mittels rekombinanter *E. coli*-Stämme produziert werden,^[81] was einem 1000-fachen Anstieg gegenüber früheren Verfahren entspricht.^[82, 83] Ergebnisse wie dieses unterstreichen die Auswirkungen rekombinanter Strategien auf die Synthese neuartiger Verbindungen, einschließlich einer Perspektive für industrielle Anwendungen.

Seit 2008 hat es erstaunliche Fortschritte bei der mikrobiellen Synthese pflanzlicher und NCS-abgeleiteter Benzylisochinolin-Alkaloide gegeben, von denen zwei genannt werden sollen: 1) die biologische Synthese des Alkaloids Magnoflorin vom Aporphintyp und des Protoberberin-Alkaloids Berberin durch rekombinante *E. coli*- und Hefestämme^[84, 85] und 2) die erste mikrobielle Synthese der Alkaloide Reticulin und Scoulerin über eine NCS-katalysierte Pictet-Spengler-Reaktion mithilfe eines transgenen *E. coli*-Stamms modifiziert mit fünf Genen (cDNAs) (Schema 12).^[86]

Parallel dazu berichteten Smolke und Mitarbeiter über eine auf rekombinanten Hefen basierende Produktionsplattform, für die eine Reihe von Hefestämmen mit ausgewählten pflanzlichen und menschlichen cDNAs transformiert wurde.^[87] Mit diesen Systemen konnten – ähnlich wie oben – Reticulin, Scoulerin, Salutaridin und Tetrahydroberberin in Ausbeuten von 2 bis 10 % (bis zu 0.15 g L⁻¹) erhalten werden (Schema 13). Die beschriebenen Stämme können nun für einen breiteren Entwurf heterologer Wirte zur Modulation der biologischen Synthese natürlicher und – in der Zukunft –



Schema 12. Genetisch rekonstruierte Biosynthese pflanzlicher Isochinolin-Alkaloide in Mikroben (*E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae*) unter Beteiligung einer NCR-Reaktion (MTs = Methyltransferasen; BBE = Berberin-Brücken-Enzym; CYP = Cytochrom P450).^[88]



Schema 13. Mikrobielle Synthese pflanzlicher Benzyloisochinolin-Alkaloide durch rekombinante Hefestämme, transformiert durch pflanzliche oder menschliche cDNA.^[87]

nichtnatürlicher Alkaloide angewendet werden. Mit der Möglichkeit, die Substratspezifität der NCS durch struktur-basierte Mutationen modifizieren zu können, könnte eine wichtige Voraussetzung für mikrobielle Synthesen schon in naher Zukunft erfüllt sein. Die beschriebenen Strategien und Ergebnisse dieser NCS-Studien sind ein wichtiger Schritt hin zu einer synthetischen Biologie.

Obgleich die Effizienz dieser Stämme für praktische und industrielle Zwecke noch ungenügend ist, können beide vorgestellten Strategien als ein Durchbruch für die Expression von pflanzlichen mehrstufigen Biosynthesen in Mikroorganismen gesehen werden. Die größte Herausforderung ist jetzt die deutliche Erhöhung der Produktionsraten. Auf jeden Fall konnten in den letzten Jahren rapide Entwicklungen beim Metabolic-Engineering und auf dem Gebiet der Isochinolin-alkaloide verzeichnet werden.

Weitere Entwicklungen sind mit der fortschreitenden Verfügbarkeit von cDNAs aus Gensequenzierungsprojekten alkaloidhaltiger Heilpflanzen zu erwarten. Tatsächlich werden zurzeit große Anstrengungen beim Metabolom- und

Transkriptom-Profilung von Heilpflanzen unternommen. Drei hierbei führende Konsortien, die mit einer Vielzahl interdisziplinär ausgerichteter Forschungsinstitutionen zusammenarbeiten, sind NapGen (Natural Products Genomics, Kanada),^[88,89] MPGR (Medicinal Plant Consortium, University of Kentucky, Michigan State University und MIT)^[90] und Medicinal Plant Genomics Resources, Washington State University.^[91] Der Entwurf und die Anwendung neuer Genmodule für effizientere Strategien in der synthetischen Biologie sind Gegenstand aktiver Projekte, wie die Arbeiten zur Taxolvorstufe Taxadien zeigen.^[81a]

7. Schlussfolgerungen und zukünftige Aspekte der Pictet-Spenglerasen

Die Enzymfamilie der Pictet-Spenglerasen wächst langsam. Nur ein Mitglied der STR-Familie, die *Rauvolfia*-STR, konnte bisher mit ihrer 3D-Struktur charakterisiert werden. Andere Mitglieder, z. B. STR aus *Catharanthus* oder aus zwei *Ophiorhiza*-Arten, die an der Biosynthese des Krebsmittels Camptothecin beteiligt sind, wurden ebenfalls in unterschiedlichen Ausmaßen charakterisiert. Ihre cDNAs sind bekannt und wurden – mit Ausnahme der STR aus *O. japonica* – auch heterolog exprimiert. Es ist nur eine Frage der Zeit, bis auch diese STRs kristallisiert und strukturell sowie funktionell aufgeklärt werden, was weitere Erkenntnisse zum Mechanismus der biologischen Reaktion bringen wird.

Es scheint, als gäbe es neben der STR-Familie noch eine ähnliche Genfamilie in Pflanzen, nämlich die STR-like- oder SSL-Gene. Eine Familie von 15 dieser Gene wurde in der Modellpflanze *Arabidopsis* nachgewiesen.^[92,93] Allerdings wiesen weder Enzymextrakte noch heterolog exprimierte Proteine dieser Familie STR-Aktivität auf, was eine andere, bisher unbekannte Funktion dieser Proteine nahelegt.^[93,94]

Zur NCS-katalysierten Pictet-Spengler-Reaktion konnten inzwischen etliche biochemische, mechanistische, vor allem aber auch strukturelle Erkenntnisse aus Röntgenstrukturanalysen gewonnen werden. Die Verwendung der NCS zur Erzeugung neuer Alkaloide – wie es für STRs bereits beschrieben wurde – konnte experimentell noch nicht realisiert werden. Die enge strukturelle Verwandtschaft der NCS mit Birkenpollenallergenen, ebenso wie ihre funktionelle Verwandtschaft mit der Pathogen-verwandten PR-10-Proteinfamilie, ist interessant und verdient weitere Studien. Diesbezüglich wäre eine breitere Suche nach Pictet-Spenglerasen dieses Typs sehr hilfreich.

Möglicherweise gibt es einen dritten Typ von Pictet-Spenglerasen in der Biosynthese pflanzlicher Alkaloide. In der südamerikanischen Pflanze *Psychotria* wird das „NCS-Amin“ Dopamin mit dem „STR-Aldehyd“ Secologanin zu den monoterpenoiden Tetrahydroisochinolin-Alkaloiden kondensiert. Ein Beispiel ist das emetisch wirkende Emetin. Die meisten der Enzyme, die an der Biosynthese der Ipecacuanha-Alkaloide beteiligt sind, wurden vor kurzem beschrieben.^[95,96] Die Erkenntnisse über die relevante Pictet-Spenglerase, die Deacetylpecosid-Synthase (DIS; EC 4.3.3.4), sind bislang limitiert, obgleich das Enzym partiell gereinigt und teilweise charakterisiert werden konnte.^[97,98]

Ein Vergleich mit den NCS- und STR-Enzymen sollte für weitere Erkenntnisse hilfreich sein.

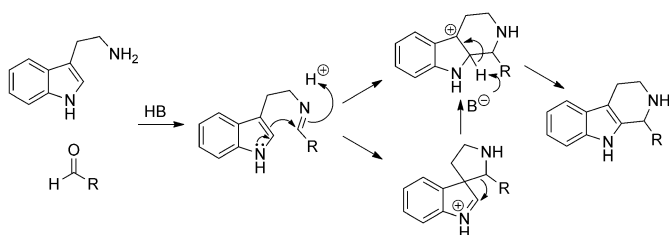
Salsolinol (SAL) (1-Methyl-6,7-dihydro-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin) ist das Pictet-Spengler-Produkt von Dopamin und Acetaldehyd. Es kommt unter anderem in Bananen und Portwein,^[99] aber auch im menschlichen Gehirn^[100,101] vor. Es wurde spekuliert, dass SAL eine Rolle bei der Ätiologie von Alkoholismus spielt, allerdings sind die Daten und Meinungen kontrovers.^[102]

Naoi und Mitarbeiter entdeckten im menschlichen Gehirn ausschließlich das (*R*)-SAL-Enantiomer sowie das entsprechende Enzym, die (*R*)-Salsolinol-Synthase.^[103] Die Synthese wurde teilweise gereinigt und charakterisiert,^[104] jedoch nicht weiter untersucht, was die Frage nach dem Enzym- oder Faltungstyp dieser Pictet-Spenglerase unbeantwortet lässt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auch nach 100 Jahren Forschung die Pictet-Spengler-Reaktion – und nun vor allem auch die Pictet-Spenglerasen – große Herausforderungen und Möglichkeiten bieten, sei es aus chemischer, biochemischer, genetischer oder seit kurzem auch struktureller Sicht.

8. Der Mechanismus der nichtenzymatischen Pictet-Spengler-Reaktion

Die Pictet-Spengler-Reaktion beginnt mit der Bildung eines Iminium-Ions, gefolgt von einem Angriff durch die Arylgruppe und einer Cyclisierung (Schema 14). Der Angriff am Iminium-Ion kann entweder direkt an Position 2 oder an Position 3 des Indolrings unter Bildung eines Spiroindolins erfolgen.^[105] Beweise für die Beteiligung eines spirocyclischen Intermediats wurden durch Isotopenmarkierungsexperimente erhalten.^[106] Die Studie ergab, dass die Bildung des Spiroindolenins schnell und reversibel erfolgt und die Bildung des Pentahydro- β -carbolin-Carboniumions der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Trotzdem ist noch immer unklar, ob das Carboniumion durch Umlagerung des Spiroindolenins oder durch direkten Angriff am C2-Atom des Indolrings entsteht.^[4b,107,108]



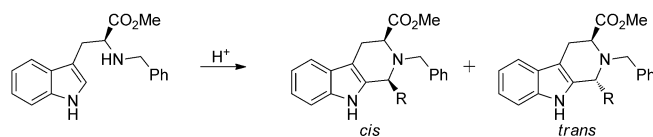
Schema 14. Der Mechanismus der Pictet-Spengler-Reaktion.

9. Diastereoselektive Pictet-Spengler-Reaktion

9.1. Anwendung von Tryptophanderivaten

Die klassische Pictet-Spengler-Reaktion wurde für gewöhnlich in wässriger Lösung mit begrenzter Stereokontrolle

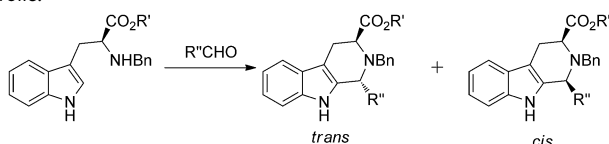
durchgeführt. 1979 führten Cook und Mitarbeiter aprotische Bedingungen ein, um die Reaktionsgeschwindigkeit und Produktausbeute zu erhöhen (Schema 15).^[109] Detaillierte Untersuchungen der Reaktionsbedingungen führten zu einer



Schema 15. Synthese 1,2,3-trisubstituierter Tetrahydro- β -carboline.

thermodynamischen *trans*-Stereokontrolle, wenn *N* β -Benzylalkylester des Tryptophans verwendet wurden.^[108,110–112] Eine Mischung von 1,2,3-trisubstituierten Tetrahydro- β -carbolinen entstand, wenn kleine Aldehyde unter sauren und nichtsauren aprotischen Bedingungen umgesetzt wurden (Tabelle 3).

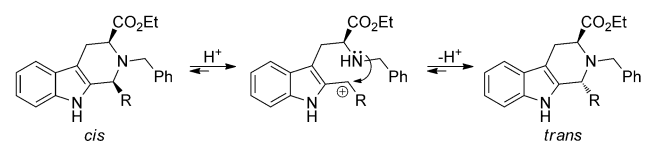
Tabelle 3: *trans/cis*-Verhältnisse bei der Synthese von 1,2,3- trisubstituierten Tetrahydro- β -carbolinen unter thermodynamischer Reaktionskontrolle.



R'	R''	nichtsaure Bed. <i>trans/cis</i>	saure Bed. <i>trans/cis</i>
Me	Me	74:26	88:12
Me	<i>n</i> Pr	77:23	89:11
Me	<i>c</i> -Hexyl	100:0	100:0
<i>i</i> Pr	Me	77:23	87:13
<i>i</i> Pr	<i>n</i> Pr	87:13	88:12
<i>i</i> Pr	<i>c</i> -Hexyl	100:0	100:0

Für Cyclohexancarboxyaldehyd wurde die selektive Bildung des *trans*-Diastereomers beobachtet. Cook und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Raumbedarf der Carbonylverbindung, die Substituenten am *N* β -Stickstoffatom und die Estergruppe wichtige Rollen bei der diastereoselektiven Bildung der *trans*-1,2,3-trisubstituierten Tetrahydro- β -carboline spielen.^[4b,108,111,112]

Die Diastereomere können gewöhnlich durch Flash-Chromatographie getrennt werden. Das thermodynamisch stabilere *trans*-Isomer wird aus dem *cis/trans*-Gemisch durch Epimerisierung des *N* β -substituierten *cis*-Isomers unter sauren Bedingungen (Trifluoressigsäure) gebildet (Schema 16).^[113,114] Die Epimerisierung verläuft durch Pro-

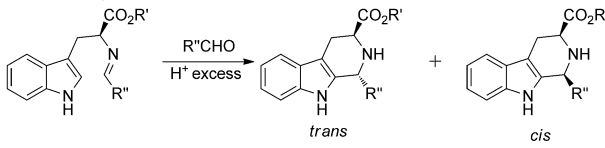


Schema 16. *cis-trans*-Epimerisierung von *N*-Benzyladdukten der Pictet-Spengler-Reaktion.

tonierung am N₅-Stickstoffatom, gefolgt von der Spaltung der C1-N2-Bindung unter Entstehung eines Carbocations, das unter Bildung des thermodynamisch stabilen *trans*-Diastereomers erneut cyclisiert. Diese Epimerisierung bietet eine effiziente Kontrolle zur Bildung des *trans*-Isomers bei sauren Bedingungen. Wichtig ist der Befund, dass kein Einbau von Deuterium in das epimerisierte Produkt nach Zugabe von CF₃CO₂D erfolgte.^[4b,5a,111,114]

trans-konfigurierte Tryptophanderivate fanden breite Anwendung bei der Totalsynthese vieler Alkaloide^[115] sowie bei der biologisch orientierten Synthese^[116] von Produktbibliotheken mit diversen biologischen Eigenschaften. Der Hauptnachteil dieser Strategie ist die mögliche Racemisierung der Produkte unter den Reaktionsbedingungen.^[117] Außerdem erfordert die Synthese dieser Naturstoffe nichtnatürliches D-Tryptophan als Chiralitätsquelle. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelten Bailey et al. eine Pictet-Spengler-Reaktion unter kinetischer Kontrolle.^[118,119] Hierbei wurde eine exzellente *cis*-Stereokontrolle erreicht, wenn das aus Tryptophanallylester und Benzaldehyd gebildete Imin in Gegenwart von Trifluoressigsäure bei niedriger Temperatur umgesetzt wurde (Tabelle 4). Unter diesen Bedingungen wird

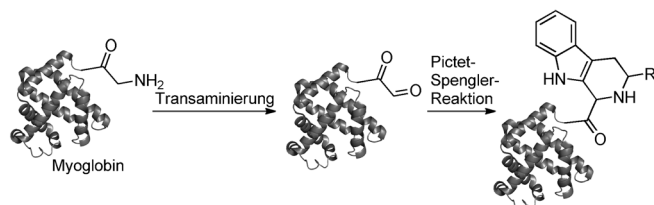
Tabelle 4: *cis/trans*-Verhältnisse bei der Synthese von 1, 2, 3-trisubstituierten Tetrahydro- β -carbolinen unter kinetischer Reaktionskontrolle.



R'	R''	Ausb. [%]	<i>cis/trans</i>
Me	Ph	74	4.6:1
Me	c-Hexyl	71	2.5:1
Me	nPr	75	4.9:1
Allyl	Ph	57	> 20:1
Allyl	c-Hexyl	39	3.0:1
Allyl	nPr	67	3.5:1

eine breite Auswahl von elektronenziehenden und elektronenliefernden Substituenten in *o*-, *m*- und *p*-Position des Benzaldehyds toleriert. Die Produkte werden in hohen Ausbeuten mit hervorragender *cis*-Stereokontrolle erhalten.^[119a] Reaktionen mit aliphatischen Aldehyden lieferten Diastereomerenmischungen mit dominierenden *cis*-Isomeren.^[119a]

Die Pictet-Spengler-Reaktion wurde kürzlich auch zur Markierung von Pferdeherz-Myoglobin genutzt (Schema 17).^[120] Eine terminale Aminogruppe wurde durch Transaminierung in einen Aldehyd überführt, und Trypto-



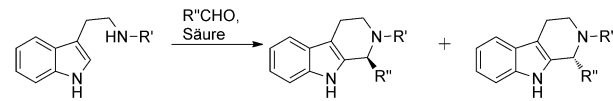
Schema 17. N-terminale Markierung von Myoglobin durch Pictet-Spengler-Reaktion.

phanmethylester und Tryptamin wurden für die Kupplung in Phosphatpuffer eingesetzt. Die Tertiärstruktur des Proteins blieb unter den Bedingungen der Pictet-Spengler-Reaktion unverändert.

9.2. Verwendung von chiralen Hilfsgruppen

Die erfolgreiche Entwicklung von diastereoselektiven Pictet-Spengler-Reaktionen mit Tryptophanderivaten stimulierte Untersuchungen zur stereoselektiven Synthese von Tetrahydro- β -carbolinen mit absaltbaren Hilfsgruppen. Zuerst wurden α -Methylbenzylamin als chirale Gruppe und 5,6-Dimethoxytryptamin verwendet, was ein Stereoisomerenverhältnis von 3:2 lieferte.^[121] Weitere Studien galten dann der Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einer Vielzahl von Brønsted- und Lewis-Säuren. Die besten Ergebnisse wurden mit Trifluoressigsäure in Benzol unter Rückfluss erhalten. Diastereomerenüberschüsse (*de*) bis zu 72 % für aromatische Aldehyde und bis zu 38 % für aliphatische Aldehyde wurden registriert (Tabelle 5).^[122] Der Austausch der Hilfs-

Tabelle 5: Eine Auswahl von Hilfsgruppen für die diastereoselektive Pictet-Spengler-Reaktion.



R'	R''	Ausb. [%]	<i>de</i> [%]
	Ar	39–86	34–72
	Alk	56–93	18–38
	Ar	9–90	60–84
	Me	33	40
	Alk	69–84	44–76

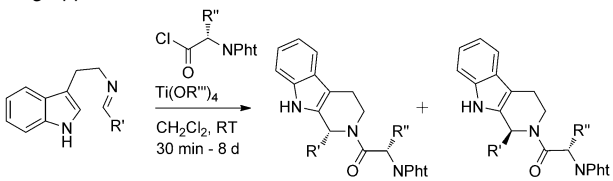
gruppe gegen 1-Naphthyl-1-ethylamin führte zu einer etwas besseren Kontrolle der Diastereoselektivität,^[123] allerdings wurden mit elektronenreichen Aldehyden sinkende Ausbeuten beobachtet.

Die Hilfsgruppen Benzyl- und 1-Naphthyl-1-ethylamin ergaben nur eine geringe Diastereokontrolle für aliphatische Aldehyde, die von größerer Relevanz für die Alkaloid-Synthese sind. In einem Versuch, die selektive Bildung von 1-Alkyltetrahydro- β -carbolinen zu verbessern, wurden kürzlich chirale Sulfoxide eingesetzt (Tabelle 5).^[124] Die Anwendung von *N*-Sulfinyliminium-Ionen in der Pictet-Spengler-Reaktion mit Tryptamin ergab die gewünschten Produkte mit bis zu 76 % *de* in guten Ausbeuten.

Mit *N,N*-Phthaloylaminosäuren als chiralen Hilfsgruppen resultierten hohe Diastereoselektivitäten der Pictet-Spengler-

Reaktionen.^[125] Die zunächst gebildeten Imine wurden mit Aminosäurechloriden in Gegenwart von Titanalkoxiden bei Raumtemperatur versetzt (Tabelle 6). Die gewünschten Produkte wurden in guten Ausbeuten und mit einer Diaste-

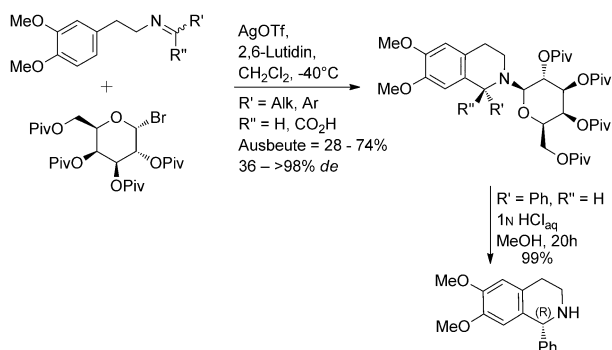
Tabelle 6: Pictet-Spengler-Reaktion mit *N,N*-Phthaloylaminosäuren als Hilfsgruppen.



R'	R''	R'''	Ausb. [%]	de [%]
Ph	<i>t</i> Bu	<i>n</i> Pr	60	> 98
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	<i>t</i> Bu	<i>n</i> Pr	54	86
4-Cl-C ₆ H ₄	<i>t</i> Bu	<i>i</i> Pr	60	92
Me	<i>t</i> Bu	<i>n</i> Pr	66	92
Et	<i>t</i> Bu	<i>n</i> Pr	59	90
<i>i</i> Pr	<i>i</i> Pr	<i>n</i> Pr	99	> 98

reoselektivität von bis zu 98 % *de* gebildet. Die Reaktionsbedingungen sind typisch für Pictet-Spengler-Reaktionen und erweisen sich als geeignet für eine Vielzahl aliphatischer Aldehyde sowie elektronenreicher und elektronenarmer aromatischer Aldehyde.

Kunz et al. verwendeten eine diastereoselektive Pictet-Spengler-Reaktion für die Synthese von 1-substituierten Tetrahydroisochinolin (Schema 18).^[126] Mit Galactosylbromid



Schema 18. Synthese von 1-substituierten Tetrahydroisochinolin-Alkaloiden durch die Pictet-Spengler-Reaktion.

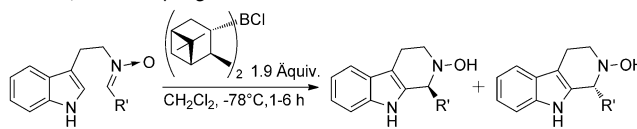
als chiraler Hilfsgruppe ergaben die von 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamin abgeleiteten Imine die entsprechenden Produkte mit bis zu > 98 % *de*. Die chirale Hilfsgruppe kann ohne Racemisierung bei Raumtemperatur mit HCl abgespalten werden.

9.3. Stöchiometrische Anwendung von Lewis-Säuren

Nakagawa et al. untersuchten enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktionen mit chiralen Lewis-Säuren.^[127] Die Säuren wurden dabei als stöchiometrisches Reagens ange-

wendet und reagierten mit Nitronen, die aus *N*_b-Hydroxytryptamin und Aldehyden gewonnen wurden (Tabelle 7). Die entsprechenden 2-Hydroxytetrahydro-β-carboline wurden bei niedriger Temperatur in guten Ausbeuten und mit *ee*-

Tabelle 7: Pictet-Spengler-Reaktion mit chiralen Lewis-Säuren.

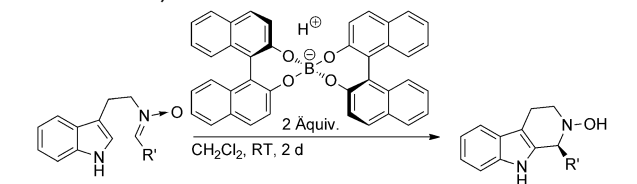


R'	Ausb. [%]	ee [%]
Ph	92	75
4-MeO-C ₆ H ₄	65	90
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	81	<i>rac</i>
1-Naphthyl	94	86
Me	91	43
<i>i</i> Bu	75	35

Werten von bis zu 90 % erhalten. Leider lieferte die Reaktion mit elektronenarmen aromatischen Aldehyden nur racemische Produkte. Nitronen aus aliphatischen Aldehyden ergaben β-Carboline in hohen Ausbeuten, doch nur mit mäßiger Enantioselektivität.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Reaktionen von Nitronen für die Synthese von 2-Hydroxytetrahydro-β-carbolinen durch Brønsted-Säure-unterstützte Lewis-Säure-Katalyse erhalten (Tabelle 8).^[127] Wenn 2 Äquivalente einer von 2,2'-Binaphthol abgeleiteten Brønsted-Säure bei Raumtemperatur eingesetzt wurden, konnten die Produkte in 39–94 % Ausbeute und 15–91 % *ee* isoliert werden.

Tabelle 8: Pictet-Spengler-Reaktion mit Brønsted-Säure-unterstützter Lewis-Säure-Katalyse.

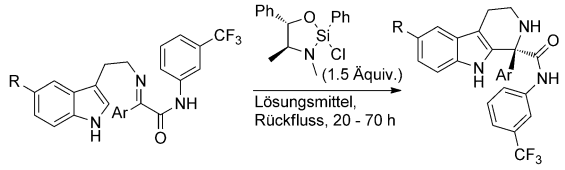


R'	Ausb. [%]	ee [%]
Ph	81	73
4-MeO-C ₆ H ₄	39	91
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	75	74
1-Naphthyl	59	31
Me	94	15
<i>i</i> Bu	68	50

Erst vor kurzem entwickelten Leighton et al. eine Pictet-Spengler-Reaktion mit von α-Ketoamid abgeleiteten Ketiminen, um eine Klasse von quartären α-Aminosäureamiden zugänglich zu machen.^[128] Hierbei bewirkten elektronenziehende Gruppen am *N*-Arylring eine drastisch erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit. Unter den gewählten Arylamiden erzielte *N*-3-(Trifluormethyl)phenylamid die besten Ergebnisse. Eine ganze Serie von Iminen wurde mit 1.5 Äquiva-

lenten chiraler Chlorsilane umgesetzt (Tabelle 9). Substituierte Arylgruppen wurden toleriert, ebenso wie auch die heteroaromatische 3-Pyridylgruppe. Mit *ortho*-Substituenten an der Arylgruppe waren die Reaktionen allerdings träge und

Tabelle 9: Asymmetrische Pictet-Spengler-Reaktion von Ketiminen.

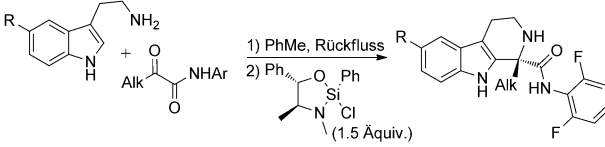


R	Ar	Lsgm.	t [h]	Ausb. [%]	ee [%]
H	Ph	CH ₂ Cl ₂	48	93	93
Br	Ph	CHCl ₃	70	68	89
OMe	Ph	CH ₂ Cl ₂	27	93	82
H	4-CF ₃ -C ₆ H ₄	CH ₂ Cl ₂	48	89	90
H	4-MeO-C ₆ H ₄	CHCl ₃	20	94	87
H	3-Pyridyl	CH ₂ Cl ₂	42	77	87

benötigten mehr chirale Lewis-Säure sowie höhere Reaktionstemperaturen. Dennoch wurde eine Anzahl von Produkten in 50–94 % Ausbeute mit 82–93 % *ee* erhalten.

Um die generelle Anwendbarkeit und den Substratbereich der Transformation zu bestimmen, wurden verschiedene Imine von Alkylketonen untersucht. Tests mit verschiedenen Arylamiden offenbarten dabei, dass die 2,6-Difluorphenylgruppe gute Ergebnisse liefert. Eine Eintopfreaktion wurde entwickelt, in der das Tryptamin und das Keton nach Imin-Bildung in Gegenwart von 1.5 Äquivalenten chiraler Chlorsilane umgesetzt wurde (Tabelle 10). Unter

Tabelle 10: Eintopf-Pictet-Spengler-Reaktion von Tryptaminen und Alkylketoamiden.



R	Alk	T [°C]	t [h]	Ausb. [%]	ee [%]
H	Me	50	36	78	89
Br	Me	75	48	67	86
OMe	Me	50	48	86	81
H	<i>i</i> Pr	50	26	81	94
H	<i>i</i> Bu	55	25	83	90

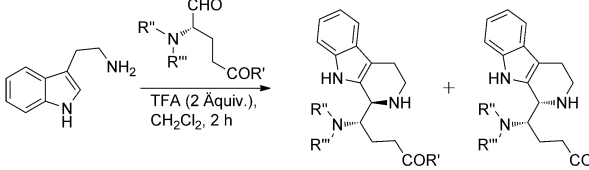
diesen Bedingungen wurde eine Anzahl von Tryptaminen und Ketonen untersucht. Die entsprechenden Reaktionsprodukte erhielt man in 67–86 % Ausbeute und mit 81–94 *ee*. Bemerkenswert ist, dass diese Reaktion leicht im 5-mmol-Maßstab durchführbar ist und das für die Herstellung der chiralen Chlorsilane benutzte Pseudoephedrin quantitativ zurückgewonnen wird.

9.4. Anwendung chiraler Carbonylverbindungen

Der entscheidende Schritt beim Entwurf einer asymmetrischen Pictet-Spengler-Reaktion ist die Bildung des chiralen Iminium-Intermediats. Neben der Verwendung chiraler Tryptaminderivate wie Tryptophan und verschiedener Hilfsgruppen fanden auch diverse Carbonylverbindungen Anwendung bei der asymmetrischen Umsetzung. Verschiedene Strategien wurden für die Anwendung chiraler Carbonylkomponenten bei intermolekularen Pictet-Spengler-Reaktionen sowie für den Chiralitätstransfer zu den neu gebildeten Zentren der Tetrahydro- β -carboline verfolgt. Einige Beispiele der zahlreich publizierten Ansätze werden im Folgenden beschrieben.

Tetrahydro- β -carboline aus Tryptaminen und geschützten, von L-Glutaminsäure abgeleiteten α -Aminoaldehyden wurden untersucht.^[129] Die Aldehyde wurden mit Tryptamin unter verschiedenen Bedingungen diastereoselektiv kondensiert (Tabelle 11). Eine Serie von Carbamat-geschützten Al-

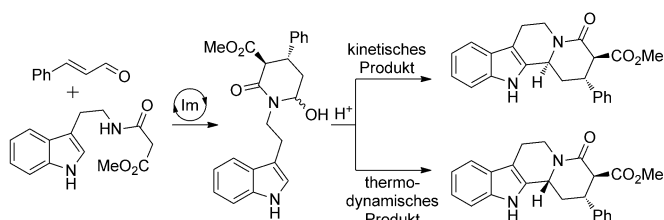
Tabelle 11: Diastereoselektive Pictet-Spengler-Reaktionen mit chiralen α -Aminoaldehyden.



R'	R''	R'''	T [°C]	Ausb. [%]	<i>trans</i> [%]	<i>cis</i> [%]
<i>t</i> BuO	Cbz	H	–40	81	0	100
<i>i</i> BuO	Cbz	H	–40	77	0	100
<i>t</i> BuO	Boc	H	–40	71	10	90
<i>t</i> BuO	CO ₂ Me	H	–40	73	9	91
<i>i</i> BuO	Troc	H	–40	74	14	86
<i>t</i> BuO	Pyrrol		–50	62	100	0
Et ₂ N	Pht		RT	68	93	7

dehyden führte zur bevorzugten Bildung des *cis*-Diastereomers. Die Größe der Schutzgruppe hat nur geringen Einfluss auf die Stereoselektivität der Reaktion, eine selektive Synthese des *cis*-Diastereomers wurde mit Benzylcarbamate (Cbz) beobachtet. Ein Austausch der Schutzgruppe gegen Pyrrol oder Phthalimid führte zur reversen Diastereoselektivität. So wurde bei Pyrrol-geschützten Aminoaldehyden ausschließlich das *trans*-Diastereomer erhalten.

Während der letzten zehn Jahre wurden viele neue Methoden zur Synthese chiraler Carbonylverbindungen durch Organokatalyse entwickelt. Diese Reaktionen wurden auch für den effizienten Aufbau komplexer Strukturen durch Iminium-Katalyse genutzt. Eine organokatalytische konjugierte Addition eines von einem Indolamid abgeleiteten Nucleophils an Zimtaldehyd ergab ein Halbaminal mit zwei stereogenen Zentren (Schema 19).^[130] Anschließend wurde eine Acyliminium-Cyclisierung unter sauren Bedingungen initiiert, wobei eine Pictet-Spengler-Reaktion unter kinetischer oder thermodynamischer Kontrolle erfolgte. Dieser epimere „Schalter“ ergab eine effiziente Möglichkeit für die



Schema 19. Enantioselective Synthese von Indolo[2,3a]chinolizidinen.

diastereo- und enantioselective Synthese eines Alkaloidgerüsts.

Die enantioselective Addition der Indol-substituierten Amide an α,β -ungesättigte Aldehyde wurde durch ein chirales Pyrrolidin katalysiert. Im zweiten Schritt der Eintopfsequenz führte die Zugabe einer katalytischen Menge Salzsäure bei -78°C zur Bildung des kinetisch bevorzugten Diastereomers. Alternativ dazu ergab die Zugabe von Trifluoressigsäure bei 70°C das thermodynamisch kontrollierte Produkt (Tabelle 12). Verschiedene β -Aryl-substituierte Acro-

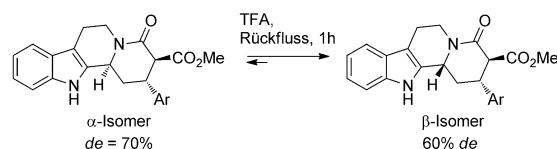
Tabelle 12: Organokatalytische Eintopfsequenz von Indolochinolizidinen.

Ar	t [d]	T [°C]	Säure	Ausb. [%]	ee [%]	α [%]	β [%]
Ph	3	3	HCl	69	94	85	15
Ph	3	3	TFA	64	94	18	82
2-NO ₂ -C ₆ H ₄	5	RT	HCl	53	95	90	10
2-NO ₂ -C ₆ H ₄	5	RT	TFA	36	94	17	83
4-MeO-C ₆ H ₄	1	3	HCl	71	89	83	17
4-MeO-C ₆ H ₄	1	3	TFA	38	88	18	82
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	3	40	HCl	74	96	72	28

leine mit elektronenziehenden oder -liefernden Gruppen wurden gut umgesetzt, ebenso wie auch eine heteroaromatische 2-Furylgruppe. Dagegen ergab die Reaktion mit β -Alkyl-substituiertem Acrolein nicht das gewünschte Produkt. Je nachdem, ob kinetisch oder thermodynamisch kontrollierte Reaktionsbedingungen genutzt wurden, konnten beide Epimere in 38–74% Ausbeute und 89–96% *ee* erhalten werden. Das Epimerenverhältnis lag dabei im Bereich von 90:10 bis 17:83.

Mehrere 2-Arylethylamine wie Phenyl-, 3-Benzofuryl- und 2-Furylethylamin wurden erfolgreich umgesetzt. Durch Variieren von Reaktionszeit und Temperatur wurden unterschiedliche Diastereomerenverhältnisse für die Bildung des β -Epimers gefunden. Diese Beobachtung wurde so interpretiert, dass zuerst das α -Epimer entsteht, das dann durch

Epimerisierung in das thermodynamisch stabilere β -Epimer übergeht. Diese Annahme wurde durch die beobachtete Epimerisierung des kinetischen in das thermodynamische Produkt in siedender Trifluoressigsäure gestützt (Schema 20).



Schema 20. Epimerisierung von Indolo[2,3a]chinolizidinen.

Vor kurzem wurde auch eine enantioselective Eintopfsequenz aus Michael-Addition und Pictet-Spengler-Reaktion entwickelt.^[131] Diese Methode basierte auf der Synthese eines Halbacetals aus α,β -ungesättigten Aldehyden und β -Ketoestern, gefolgt von der Addition von Tryptamin in Gegenwart von Säure. Auf die organokatalytische konjugierte Addition des β -Ketoesters an Zimtaldehyd in Gegenwart von chiralem Pyrrolidin und Benzoesäure in Toluol folgte die Zugabe von Tryptamin und stöchiometrischen Mengen an Benzoesäure. Nach eintägiger Inkubation der Mischung bei 50°C wurde die selektive Bildung eines diastereomeren Indolochinolizidins in moderater Ausbeute und guter Enantioselectivität beobachtet. Eine nähere Untersuchung dieser Eintopfsequenz (Tabelle 13) ergab, dass β -Aryl- und β -Alkyl-substituierte α,β -

Tabelle 13: Organokatalytische Eintopfsequenz aus Michael-Addition und Pictet-Spengler-Reaktion.

R	Ar	Ausb. [%]	ee [%]
Ph	Ph	81	92
4-Br-C ₆ H ₄	Ph	76	93
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	3,5-(CF ₃) ₂ C ₆ H ₃	91	93
3-Furyl	3,5-(CF ₃) ₂ C ₆ H ₃	93	88
Me	3,5-(CF ₃) ₂ C ₆ H ₃	56	81
nPr	3,5-(CF ₃) ₂ C ₆ H ₃	68	85

ungesättigte Aldehyde eingesetzt werden können. Aldehyde mit aromatischen oder heteroaromatischen Resten ergaben Produktausbeuten von 76–93% mit 88–95% *ee*. Indolochinolizidine wurden über β -Alkylacroleine in moderater Ausbeute und 81–85% *ee* erhalten. Die Stereochemie der Produkte wurde dabei in der Michael-Addition und die Diastereoselektivität in der Pictet-Spengler-Reaktion unter kinetisch kontrollierten Reaktionsbedingungen festgelegt.

10. Brønsted-Säure-katalysierte enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktion

10.1. Thioharnstoff-katalysierte Transformationen

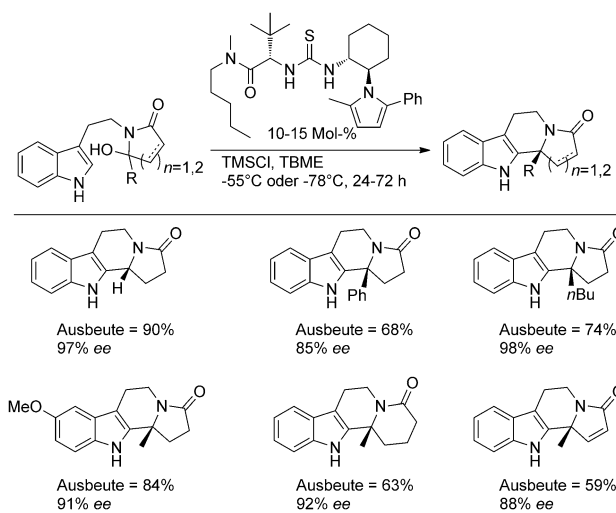
Die erste enantioselektive katalytische Pictet-Spengler-Reaktion wurde von Jacobsen et al. 2004 beschrieben.^[132] Die Herausforderung in der Entwicklung einer asymmetrisch-katalytischen Pictet-Spengler-Reaktion war die Überwindung der niedrigen Reaktivität des Imin-Substrats. Die erste Suche nach potenziellen Katalysatoren für diese Cyclisierung führte zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Aus diesem Grund wurde eine generelle Strategie für eine bessere Reaktivität über die Bildung von *N*-Acyliminium-Ionen versucht. Erste Untersuchungen für eine Acyl-Pictet-Spengler-Reaktion resultierten in der Bildung von *N*_β-Acetyltetrahydro-β-carboline in 59 % *ee* mit 2-Ethylbutanal und einem chiralen Thioharnstoff-Katalysator. Die Enantioselektivität der Cyclisierung hing von der Struktur des Acylierungsreagens, dem Lösungsmittel und der Temperatur ab. Wegen seiner modularen Natur kann der Katalysator durch Variieren seiner einzelnen „Teilstrukturen“ optimiert werden. Diese Studien führten zur Entwicklung eines neuen chiralen Thioharnstoff-Katalysators und lieferten optimale Bedingungen für eine breite Auswahl von Substraten (Tabelle 14). Aus aliphatischen Aldehyden

Tabelle 14: Asymmetrische Acyl-Pictet-Spengler-Reaktion mit einem chiralen Thioharnstoff-Katalysator.

Alkyl	Katalysator-beladung [%]	Ausb. [%]	<i>ee</i> [%]
CH(CH ₂ CH ₃) ₂	5	65	93
<i>i</i> Pr	10	67	85
<i>n</i> -Pentyl	10	65	95
<i>i</i> Bu	10	75	93
CH ₂ CH ₂ OTBDPS	10	77	90

und Tryptamin hergestellte Imine konnten ohne weitere Reinigung eingesetzt werden. Nach dieser Methode entstanden *N*_β-Acetyltetrahydro-β-carboline in 65–81 % Ausbeute mit 85–93 % *ee*. Es wurden 5-Methoxy- und 6-Methoxy-tryptamine toleriert. Imine aus aromatischen Aldehyden und Pivalinaldehyd werden allerdings nicht umgesetzt.

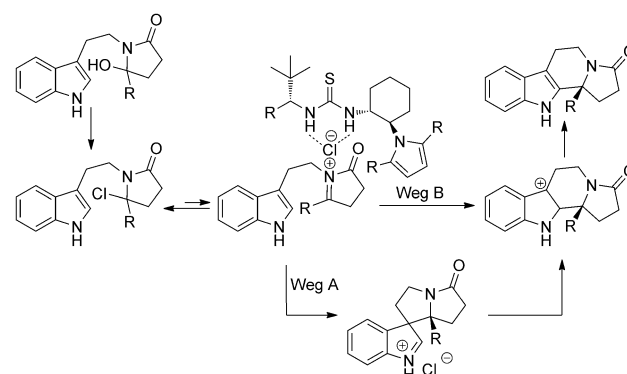
Die Möglichkeit, schwach Lewis-basische *N*-Acyliminium-Ionen in enantioselektiven Acyl-Pictet-Spengler-Reaktionen zu aktivieren, wurde für die Cyclisierung von Hydroxyalkyllactamen genutzt (Schema 21).^[133] Die Lactame wurden entweder durch Imin-Reduktion mit NaBH₄ oder durch Imidalkylierung mit einem Organolithiumreagens synthetisiert. In einer Modellreaktion wurden Katalysatorstruktur, Lösungsmittel, Temperatur, Konzentration und Additive untersucht. Die besten Säureadditive, die entschei-



Schema 21. Asymmetrische Cyclisierung mit chiralem Thioharnstoff-Katalysator.

dend für die Bildung von *N*-Acyliminium-Ionen sind, waren Chlortrimethylsilan oder eine Kombination von HCl und Molekularsieb. Wasser ist schädlich für die katalytische Aktivität, in geringen Konzentrationen erhöhte es aber die Ausbeute. Unter optimalen Reaktionsbedingungen erreichte die Cyclisierung von Hydroxyalkyllactamen, die aus Succinimiden und Glutarimiden erzeugt wurden, Ausbeuten von 51–94 % mit 81–99 % *ee* (Schema 21).

¹H-NMR-Studien bei variablen Temperaturen zeigten eine schnelle und reversible Bildung von Chlorlactamen aus Hydroxylactamen auf (Schema 22). Da der enantioselektive

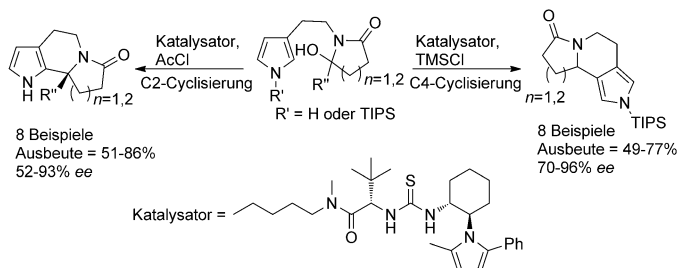


Schema 22. Vorgeschlagener Mechanismus für die Cyclisierung von Hydroxylactamen.

Schritt die Cyclisierung des *N*-Acyliminium-Ions ist, muss es mit dem Katalysator interagieren. Das Intermediat enthält aber kein Lewis-basisches Zentrum, um den Katalysator zu binden. Die Autoren nehmen deshalb an, dass der Thioharnstoff-Katalysator die Cyclisierung unterstützt, indem er die Dissoziation des Chlorid-Gegenions und die Bildung eines chiralen Komplexes induziert. Die Katalyse und Enantioinduktion könnte aus der anfänglichen Abspaltung des Chloridions vom Chlorlactam und der anschließenden

Cyclisierung durch den Ionen-gebundenen Thioharnstoff resultieren. Die Enantioselektivität des erhaltenen Produkts hängt dabei stark von der Größe des Halogenions ab.

Jacobsen et al. entdeckten eine enantioselektive katalytische Acyl-Pictet-Spengler-Reaktion mit Hydroxylactamen aus 2-Pyrrol-3-yl-ethanaminen (Schema 23).^[134] Eine erfolg-



Schema 23. Regio- und enantioselektive katalytische Cyclisierung von Pyrrolen.

reiche Regiokontrolle für die C4-Cyclisierung anstatt einer C2-Cyclisierung, wurde durch sterisch anspruchsvolle Schutzgruppen wie die *N*-Triisopropylgruppe erreicht. Pyrroloindolizinone und Pyrrolochinolizinone wurden mit moderaten bis exzellenten *ee*-Werten und Ausbeuten erhalten.

Erst kürzlich wurde über enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktionen mit breitem Substratbereich bezüglich der Tryptaminderivate berichtet, die ungeschützte Tetrahydro- β -carboline ergaben.^[135] Bei den ersten Experimenten wurde ein von 6-Methoxytryptamin und 4-Chlorbenzaldehyd abgeleitetes Imin mit einer Reihe von Thioharnstoff-Katalysatoren und achiralen Brønsted-Säuren umgesetzt. Unter besten Reaktionsbedingungen wurde Tetrahydro- β -carbolin bei Raumtemperatur und mit Essigsäure als Cokatalysator in 85% Ausbeute (87% *ee*) gebildet. Ohne den Cokatalysator wurde keine Produktbildung beobachtet. In weiteren Optimierungen wurde ein neuer Thioharnstoff-Katalysator entdeckt, der in nur drei Stufen und einem einzelnen Chromatographieschritt aus kommerziell erhältlichen Chemikalien in 69% Ausbeute hergestellt werden kann. Es wurde gefunden, dass Benzoesäure die Reaktionsgeschwindigkeit und die Enantioselektivität erhöht. Unter den optimierten Bedingungen wurde eine Serie von substituierten Benzaldehyden (Tabelle 15) in freie Tetrahydro- β -carboline in guten Ausbeuten mit exzellenten *ee*-Werten überführt. Höhere Reaktionsgeschwindigkeiten wurden für *ortho*- und *meta*-substituierte Benzaldehyde beobachtet. Wichtig war die Beobachtung, dass die Reaktion von Tryptamin mit *ortho*-Brombenzaldehyd längere Reaktionszeiten (10 Tage) als mit 6-Methoxytryptamin (11 h) benötigte, bei zudem geringerer Ausbeute, aber ähnlichem *ee*.

Um eine breitere Anwendung der Cyclisierungsreaktion zu prüfen, wurde die Reaktion von aliphatischen Aldehyden mit 6-Methoxytryptamin untersucht. Anders als bei der Umsetzung von Benzaldehyden erfolgte die Reaktion auch in Abwesenheit von Benzoesäure – mit besseren Enantioselektivitäten, aber längeren Reaktionszeiten. Sowohl lineare als

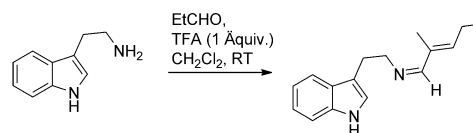
Tabelle 15: Pictet-Spengler-Reaktion mit einem Katalysatorsystem aus einem Thioharnstoff und Benzoesäure.

R	PhCO ₂ H (%)	t [h]	Ausb. [%]	ee [%]
Ph	20	70	94	86
4-F-C ₆ H ₄	20	78	81	92
4-MeO-C ₆ H ₄	20	91	78	85
2-Br-C ₆ H ₄	20	11	74	95
<i>i</i> Pr	0	88	90	94
<i>n</i> -Pentyl	0	18	74	86

auch verzweigte Aldehyde wurden umgesetzt (Tabelle 15). Die Produkte entstanden in 74–90% Ausbeute und mit 86–94% *ee*. Reaktionen mit weniger nucleophilen Tryptaminen waren unter neutralen Reaktionsbedingung jedoch erfolglos, sodass saure Additive notwendig waren.

10.2. Durch starke Brønsted-Säuren katalysierte Transformationen

Vor dem Hintergrund, dass die Pictet-Spengler-Reaktion eine säurekatalysierte Reaktion ist und starke chirale Brønsted-Säuren erfolgreich in Iminium-dirigierten Transformationen eingesetzt wurden, untersuchten List et al. die direkte enantioselektive katalytische Pictet-Spengler-Reaktion von Arylethylaminen mit Aldehyden.^[136] Versuche mit unsubstituierten Substraten waren wegen der Bildung unerwünschter Nebenprodukte erfolglos (Schema 24).



Schema 24. Tryptamin-gesteuerte Homoaldolkondensation.

Dagegen führte die Anwendung von geminal disubstituierten Tryptaminen zur Synthese der gewünschten Cyclisierungsprodukte. Um optimale Reaktionsbedingungen zu finden, wurden chirale Phosphorsäurediester, Lösungsmittel und unterschiedliche Reaktionstemperaturen getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit sperrigen chiralen Phosphorsäurediestern in Toluol bei niedriger Temperatur gefunden. Eine Vorschrift wurde ausgearbeitet, um geminal disubstituierte Tryptamine mit aliphatischen Aldehyden umzusetzen. Die Produktausbeuten lagen zwischen 50 und 98% (72–94% *ee*) in Gegenwart von 20 Mol-% des Katalysators (Tabelle 16). Elektronenarme aromatische Aldehyde führten zu hervorragenden Ergebnissen. Die Notwendigkeit, geminal

Tabelle 16: Brønsted-Säure-katalysierte enantioselective Pictet-Spengler-Reaktion.

R'	R''	Ausb. [%]	ee [%]
H	Et	76	88
MeO	Et	96	90
H	<i>n</i> Bu	91	87
H	Bn	58	76
H	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	60	88
OMe	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	98	96
OMe	Ph	82	62

substituierte Tryptamine einsetzen zu müssen, limitiert die Methode.

Hiemstra et al. schlugen die Verwendung von *N*-Sulfonyl-Intermediaten für die katalytische Pictet-Spengler-Kondensation vor.^[137] Solche *N*-Sulfonyltryptamine entstehen unter basischen Bedingungen aus Tryptamin und kommerziell erhältlichem Sulfonylchlorid. Ein erstes Screening mit *N*-2-Nitrophenyl-sulfonyltryptamin als Substrat resultierte in exzellenten Ausbeuten (92–98 %) von Tetrahydro-β-carbolenen, bei allerdings geringer Enantioselectivität (maximal 31 % *ee*). Nachfolgende Experimente mit sperrigem *N*-Tritylsulfonyltryptamin führten zu substanziell höheren Enantioselectivitäten, das erhaltene Produkt war aber instabil, wahrscheinlich aufgrund der Spaltung der Trityl-Schwefel-Bindung. Ein Zusatz des Radikalfängers 3,5-Di(*tert*-butyl)-4-hydroxytoluol zur Reaktionsmischung verhinderte dann die Zersetzung des Produkts. In weiterführenden Studien wurde Toluol als Lösungsmittel eingeführt, die Reaktionstemperatur gesenkt und Molekularsieb zur Entfernung von Wasser verwendet, das negative Auswirkungen auf Ausbeute und Enantioselectivität hat. Eine zweistufige Synthese zur Herstellung der ungeschützten Tetrahydro-β-carboline wurde entwickelt, um die Isolierung des instabilen Cyclisierungsprodukts zu vermeiden (Tabelle 17). Unter optimierten Bedingungen wurde eine Serie von linearen und verzweigten aliphatischen und aromatischen Aldehyden untersucht, die die gewünschten Reaktionsprodukte in 77–90 % Ausbeute (72–87 *ee*) lieferten. Eine Ausnahme bildete das aus Acetaldehyd gewonnene Tetrahydro-β-carboline, das (bei 88 % Ausbeute) nur 30 % *ee* ergab – möglicherweise aufgrund einer zu geringen sterischen Diskriminierung durch den Brønsted-Säure-Katalysator. Eine einfache Abspaltung der Schutzgruppen aus den Tetrahydro-β-carbolenen und die Skalierbarkeit der Reaktion macht die Methode attraktiv.

Weitere Arbeiten wurden mit chiralen Phosphorsäureestern durchgeführt. Als Ausgangsverbindung wurde *N*₆-Benzyltryptamin als ein Molekül der Wahl für pharmazeutisch relevante Verbindungen gewählt.^[138] Optimale Reaktionsbedingungen umfassten die Verwendung eines sperrigen Brønsted-Säure-Katalysators in Toluol bei hohen Temperaturen in

Tabelle 17: Katalytische Pictet-Spengler-Reaktion mit *N*-Sulfonyltryptamin.

R	<i>t</i> [h]	Ausb. [%]	ee [%]
Me	1	88	30
<i>i</i> Pr	24	77	78
<i>n</i> -Pentyl	2	87	84
Bn	4	90	87
Ph	24	77	82
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	24	78	82

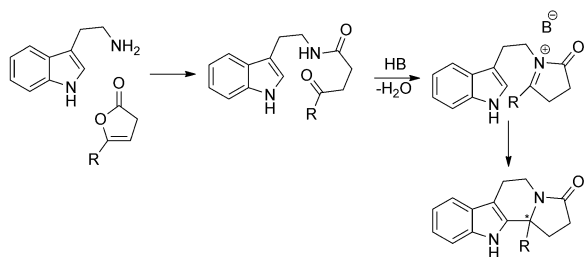
Gegenwart von Molekularsieb. Aliphatische und aromatische Aldehyde wurden untersucht (Tabelle 18), und alle Reaktionen verliefen problemlos und ergaben die entsprechenden *N*₆-Benzyltetrahydro-β-carboline in 77–97 % Ausbeute mit

Tabelle 18: Katalytische Pictet-Spengler-Reaktion mit *N*-Alkyltryptamin.

R	Ausb. [%]	ee [%]
<i>i</i> Pr	90	81
<i>n</i> -Pentyl	77	68
Ph	95	72
4-MeO-C ₆ H ₄	84	80
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	95	87
3-Cl-C ₆ H ₄	92	20

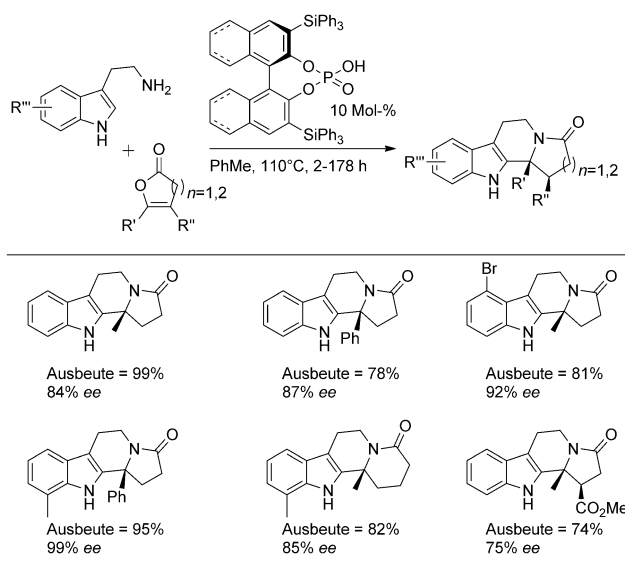
moderater bis guter Enantioselectivität (61–87 %). Mit *meta*-substituierten Benzaldehyden und 3-Phenyl-propanal wurden nur niedrige *ee*-Werte gefunden, und mit Phenylacetaldehyd wurde keine Produktbildung beobachtet.

Vor kurzem entwickelten Dixon et al. eine enantioselective Brønsted-Säure-katalysierte Cyclisierungskaskade^[139] mit einer Pictet-Spengler-Reaktion, die zur Eintopfsynthese polycyclischer Verbindungen genutzt wurde. Die Ringöffnung von Enollactonen mit anschließender Bildung von *N*-Acyliminium-Intermediaten und Cyclisierung führte zur Synthese tetracyclischer Produkte (Schema 25). Die Brønsted-Säure lieferte die Enantiokontrolle während der Ringbildung durch eine Ionenpaarbildung mit dem chiralen Gegenion. Anhand einer Modellreaktion wurden chirale Brønsted-Säure-Katalysatoren, Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration für die Suche nach den optimalsten Bedingungen variiert. Die besten Ergebnisse wurden mit 10 Mol-% chiraalem Phosphorsäurediester in siedendem Toluol bei



Schema 25. Konzept einer Brønsted-Säure-katalysierten Cyclisierungskaskade.

hoher Verdünnung (7 mM) erhalten. Mit diesen verfügbaren Bedingungen wurden verschiedene Enollactone und Tryptamin-derivate für die Cyclisierungskaskade untersucht (Schema 26).

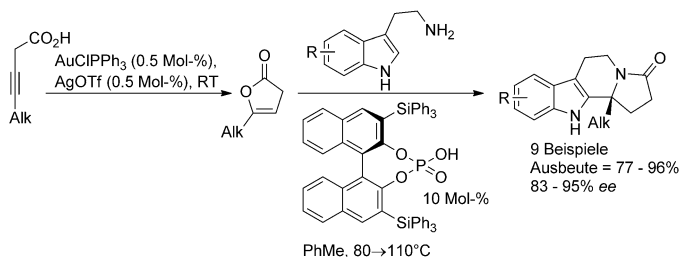


Schema 26. Eine Brønsted-Säure-katalysierte enantioselective Cyclisierungskaskade.

Eine Vielzahl substituierter Tryptamine mit elektronenziehenden und -liefernden Gruppen an den Positionen 4, 5, 6 und 7 wurden in guten Ausbeuten und 83–99% ee umgesetzt. Neben monosubstituierten Enollactonen, die Aryl- oder Alkylgruppen tragen, können auch disubstituierte Enollactone eingesetzt werden, die zur selektiven Bildung einzelner Diastereomere führen.

Eine Gold(III)-katalysierte Pictet-Spengler-Reaktion wurde durch Youn beschrieben.^[140]

Interessanterweise war die Brønsted-Säure-katalysierte Cyclisierungskaskade kompatibel mit einer Gold(I)-katalysierten Cycloisomerisierung von Alkensäuren (Schema 27). Eine Alkensäure wurde mit einem Gold(I)-Katalysator versetzt, und nach Bildung des Enollactontryptamins wurde die chirale Brønsted-Säure hinzugefügt. Die Produkte der dual-katalysierten Kaskadenreaktion entstanden in guten Ausbeuten mit hohen ee-Werten. Mechanistisch verläuft die Kaskadenreaktion über eine Gold(I)-katalysierte Bildung



Schema 27. Cyclisierungskaskade aus einer Au^I-katalysierten und einer über eine chirale Brønsted-Säure katalysierten Reaktion.

von Enollactonen, die durch Tryptamin unter Bildung des Amids einer Ketosäure geöffnet werden. Die dann folgende Cyclisierung zu einem Acylenamin ergibt ein *N*-Acylium-Intermediat. Eine durch das Gegenion kontrollierte Pictet-Spengler-Cyclisierung führt zur diastereo- und enantioselectiven Bildung des Reaktionsprodukts. Erst kürzlich wurde diese Strategie in einer Kaskadenreaktion mit Tryptaminen und Ketosäuren angewendet, die im Vergleich zu Enollactonen leicht zugänglich sind.^[141]

11. Schlussfolgerungen und Ausblick auf die Entwicklung der asymmetrischen Pictet-Spengler-Reaktion

Die Entdeckung der Pictet-Spengler-Reaktion lieferte eine beeindruckend leistungsfähige Methode für die Synthese biologisch aktiver Naturstoffe. Seit 100 Jahren wurden mit ihr hervorragende Resultate erhalten, und die Anwendungsbreite der Reaktion wurde erheblich ausgedehnt. Bemerkenswerte Ergebnisse wurden in der asymmetrischen Synthese von Naturstoffen erzielt, z.B. von Norsuaveolin, Ajmalin, Alkaloid G, Suaveolin, Affinisin, Vellosoimin, Talpinin, Talcarpin, Alstonerin, Anhydromacrosalhin-methin, Rau-maclin, 9-Methoxygeissoschizol, 9-Methoxy-*N*₆-methylgeissoschizol, Phalarin, Jorumycin, Renieramycin G und Corynantheidin.^[115] Die Pictet-Spengler-Reaktion wurde außerdem erfolgreich für den Aufbau von Substanzbibliotheken an festen Trägern und für Mehrkomponentenreaktionen genutzt.^[142]

Die erste hoch enantioselective katalytische Pictet-Spengler-Reaktion mit chiralen Thioharnstoffen als Katalysator wurde erst vor kurzer Zeit entwickelt. In den letzten fünf Jahren wurde eine Vielzahl von chiralen Thioharnstoffen und sperrigen chiralen Phosphorsäurediestern in die enantioselective katalytische Cyclisierung von Tryptaminen eingeführt. Trotzdem besteht immer noch ein hoher Bedarf für die Entwicklung neuer effizienter katalytischer Systeme mit breiter Substratazeptanz, die nicht auf Tryptamine begrenzt ist.

J.S. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Fonds der Chemischen Industrie (FCI) und der Zhejiang University K. P. Chao's High-Tech Foundation (Hangzhou, China) für Unterstützung seiner Forschungen. Wir danken Dr. S. Panjikar (EMBL Hamburg) und Dr. M. Wang (Paul-

Scherrer-Institut, Villigen) für das Anfertigen von Röntgenkristallstrukturen sowie Prof. Dr. H. Michel (MPI für Biophysik, Frankfurt) für eine Einführung in die Strukturbio-logie. Nicht zuletzt danken wir unseren im Literaturteil genannten Mitarbeitern für ihren Einsatz.

Eingegangen am 21. Dezember 2010

Online veröffentlicht am 9. August 2011

- [1] A. Pictet, T. Spengler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, 44, 2030–2036.
- [2] G. J. Tatsui, *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1928**, 48, 92 [*Chem. Abs.* **1928**, 22, 3415].
- [3] *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*, Vol. XX (Hrsg.: R. H. F. Manske), Academic Press, New York, **1981**.
- [4] Übersichtsartikel: a) M. D. Rozwadowska, *Heterocycles* **1994**, 39, 903–931; b) E. D. Cox, J. M. Cook, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1797–1842; c) J. D. Scott, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1669–1730; d) M. Chrzanowska, M. D. Rozwadowska, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3341–3370; e) E. L. Larghi, M. Amon-gera, A. B. J. Bracca, T. S. Kaufman, *Arkivok* **2005**, 98–153.
- [5] a) M. Lorenz, M. L. Van Linn, J. M. Cook, *Curr. Org. Synth.* **2010**, 7, 189–223; b) S. W. Youn, *Org. Prep. Proced. Int.* **2006**, 38, 505–591; c) T. E. Nielsen, F. Diness, M. Meldal, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2003**, 6, 801–814; d) E. L. Larghi, T. S. Kaufman, *Synthesis* **2006**, 187–220; e) C. R. Edwankar, R. V. Edwankar, O. A. Namjoshi, S. K. Rallapalli, J. Yang, J. M. Cook, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, 12, 752–771.
- [6] a) K. C. Nicolaou, T. Montagnon, *Molecules that Changed the World*, Wiley, Weinheim, **2008**, S. 68–78; b) M. H. Zenk, M. Juenger, *Phytochemistry* **2007**, 68, 2757–2772.
- [7] A. I. Scott, S. L. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 6906–6908.
- [8] J. Stöckigt, J. Treimer, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* **1976**, 70, 267–270.
- [9] J. Stöckigt, H. P. Husson, C. Kan-Fan, M. H. Zenk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 164–166.
- [10] J. F. Treimer, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1978**, 17, 227–261.
- [11] M. H. Zenk, *J. Nat. Prod.* **1980**, 43, 438–451.
- [12] J. Stöckigt, T. Hemscheidt, G. Höfle, P. Heinsteint, V. Formacek, *Biochemistry* **1983**, 22, 3448–3452.
- [13] J. Stöckigt, Z. Chen, M. Ruppert, *Top. Curr. Chem.* **2010**, 297, 67–103.
- [14] G. N. Smith, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 912–914.
- [15] A. R. Battersby, A. R. Burnett, P. G. Parsons, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 1280–1391.
- [16] M. H. Zenk, H. El-Shagi, H. Arens, J. Stöckigt, E. W. Weiler, B. Deus in *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Applications* (Hrsg.: W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk), Springer, Berlin, **1977**, S. 27–43.
- [17] J. Stöckigt, H. J. Soll, *Plant Med.* **1980**, 40, 22–30.
- [18] J. Stöckigt, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* **1977**, 79, 233–237.
- [19] J. Stöckigt, M. H. Zenk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 646–648.
- [20] J. Stöckigt, *Phytochemistry* **1979**, 18, 965–966. Übersichtsarti-kel: a) T. M. Kutchan, *Phytochemistry* **1993**, 32, 493–506; b) M. Ruppert, J. Stöckigt in *Comprehensive Natural Products Chem-istry*, Vol. 4 (Hrsg.: Sir D. Barton, K. Nakanishi) Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 109; c) M. Ruppert, X. Ma, J. Stöckigt, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 1431–1444; d) J. Stöckigt, S. Pan-jikar, M. Ruppert, L. Barleben, X. Ma, E. Loris, M. Hill, *Phy-tochem. Rev.* **2007**, 6, 15–34; e) J. Stöckigt, L. Barleben, S. Panjikar, E. A. Loris, *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, 46, 340–355; f) Lit. [13].
- [21] M. Rueffer, N. Nagakura, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1593–1596.
- [22] N. Nagakura, M. Rüffer, M. H. Zenk, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 2308–2312.
- [23] A. I. Scott, S. L. Lee, P. DeCapite, M. G. Culver, C. R. Hut-chinson, *Heterocycles* **1977**, 7, 979–984.
- [24] A. H. Heckendorf, C. R. Hutchinson, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 4153–4154.
- [25] R. T. Brown, J. Leonard, S. K. Sleight, *Phytochemistry* **1978**, 17, 899–900.
- [26] J. F. Treimer, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* **1979**, 97, 159–162.
- [27] J. F. Treimer, M. H. Zenk, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 101, 225–233.
- [28] H. Mizukami, H. Nordlöv, S. L. Lee, A. I. Scott, *Biochemistry* **1979**, 18, 3760–3763.
- [29] a) U. Pfitzner, M. H. Zenk, *Planta Med.* **1989**, 55, 525–530; b) A. de Waal, A. Meijer, R. Verpoorte, *Biochem. J.* **1995**, 306, 571–580.
- [30] N. Hampp, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1988**, 27, 3811–3815.
- [31] U. Pfitzner, M. H. Zenk, *Planta Med.* **1982**, 46, 10–14.
- [32] U. Pfitzner, M. H. Zenk, *Methods Enzymol.* **1987**, 136, 342–350.
- [33] L. H. Stevens, C. Giroud, E. J. M. Pennings, R. Verpoorte, *Phytochemistry* **1993**, 33, 99–106.
- [34] X. Y. Ma, S. Panjikar, J. Koepke, E. Loris, J. Stöckigt, *Plant Cell* **2006**, 18, 907–920.
- [35] E. McCoy, M. C. Galan, S. E. O'Connor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2475–2478.
- [36] S. Chen, M. C. Galan, C. Coltharp, S. E. O'Connor, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 1137–1141.
- [37] Y. Yamazaki, H. Sudo, M. Yamazaki, N. Aimi, K. Saito, *Plant Cell Physiol.* **2003**, 44, 395–403.
- [38] Y. Yamazaki, A. Urano, H. Sudo, M. Kitajima, H. Takayama, M. Yamazaki, N. Aimi, K. Saito, *Phytochemistry* **2003**, 62, 461–470.
- [39] P. Bernhardt, A. R. Usera, S. E. O'Connor, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 4400–4402.
- [40] T. M. Kutchan, N. Hampp, F. Lottspeich, K. Beyreuther, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* **1988**, 237, 40–44.
- [41] T. M. Kutchan, *FEBS Lett.* **1989**, 257, 127–130.
- [42] T. M. Kutchan, H. Dittrich, D. Bracher, M. H. Zenk, *Tetrahe-dron* **1991**, 47, 5945–5954.
- [43] D. Bracher, T. M. Kutchan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 294, 717–723.
- [44] H. Wang, R. Chen, M. Chen, M. Sun, Z. H. Liao, *Xibei Zhiwu Xuebao* **2006**, 26, 900–905.
- [45] Y. Lu, W. Wang, Z. Qian, L. Li, J. Wang, G. Zhou, G. Kai, *Mol. Biol. Rep.* **2009**, 36, 1845–1852.
- [46] X. Y. Ma, J. Koepke, G. Frittsch, R. Diem, T. M. Kutchan, H. Michel, J. Stöckigt, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2004**, 1702, 121–124.
- [47] J. Koepke, X. Y. Ma, G. Frittsch, H. Michel, J. Stöckigt, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2005**, 61, 690–693.
- [48] E. A. Loris, S. Panjikar, M. Ruppert, L. Barleben, M. Unger, H. Schübel, J. Stöckigt, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 979–985.
- [49] J. Stöckigt, L. Barleben, S. Panjikar, E. Loris, *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, 46, 340–355.
- [50] J. J. Maresh, L. A. Giddings, A. Friedrich, E. A. Loris, S. Panjikar, B. L. Trout, J. Stöckigt, B. Peters, S. E. O'Connor, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 710–723.
- [51] A. R. Usera, S. E. O'Connor, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 492–498.
- [52] R. T. Brown, J. Leonard, S. K. Sleight, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 636–638.
- [53] R. T. Brown, J. Leonard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 877–879.
- [54] I. Gerasimenko, Y. Sheludko, X. Y. Ma, J. Stöckigt, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 2204–2213.
- [55] L. Barleben, S. Panjikar, M. Ruppert, J. Koepke, J. Stöckigt, *Plant Cell* **2007**, 19, 2886–2897.

- [56] L. Q. Yang, H. B. Zou, H. J. Zhu, M. Ruppert, J. X. Gong, J. Stöckigt, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 860–870.
- [57] H. B. Zou, H. J. Zhu, L. Zhang, L. Q. Yang, Y. P. Yu, J. Stöckigt, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 2400–2404.
- [58] H. Y. Lee, N. Yerkes, S. E. O'Connor, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1225–1229.
- [59] a) J. Stöckigt, B. Hammes, M. Ruppert, *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 759–766; b) A. Geerlings, F. J. Redondo, A. Contin, J. Memelink, R. Van der Heijden, R. Verpoorte, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 420–424.
- [60] M. C. Galan, E. McCoy, S. E. O'Connor, *Chem. Commun.* **2007**, 3249–3251.
- [61] P. Chan, *Eur. Neurol.* **1995**, *35* (Suppl. I), 23–27.
- [62] S. Li, J. Long, Z. Ma, Z. Xu, J. Li, Z. Zhang, *Curr. Med. Res. Opin.* **2004**, *20*, 409–415.
- [63] S. W. Li, *Eur. Neurol.* **1998**, *39*, 26–30.
- [64] W. Runguphan, S. E. O'Connor, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 151–153.
- [65] a) W. Runguphan, J. J. Maresh, S. E. O'Connor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13673–13678; b) W. Runguphan, Q. Xudong, S. E. O'Connor, *Nature* **2010**, *468*, 461–464. Übersichtsartikel: T. M. Kutchan, *Plant Cell* **1995**, *7*, 1059; C. B. Taylor, *Plant Cell* **1998**, *10*, 641–644; E. H. Hughes, J. V. Shanks, *Metabol. Engen.* **2002**, *4*, 41; K. S. Ryan, B. S. Moore, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 140–141.
- [66] J. J. Zhong, J. T. Yu, T. Yoshida, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *11*, 461–467.
- [67] Mitsui Petrochem, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1989**, *46*, 61–69.
- [68] M. E. Curtin, *Biotechnology* **1983**, *1*, 649–657.
- [69] a) K. Saito, H. Ohashi, H. Tahara, M. Hibi, T. Sakamoto, M. Takami, XV International Botanical Congress, Japan, **1993**; b) H. Tabata, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2004**, *87*, 1–23.
- [70] a) M. Rueffer, H. El-Shagi, N. Nagakura, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* **1981**, *129*, 5–9; b) H. M. Schumacher, M. Rüffer, N. Nagakura, M. H. Zenk, *Planta Med.* **1983**, *48*, 212–220; c) R. Stadler, T. M. Kutchan, S. Loeffler, N. Nagakura, B. Cassels, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1251–1254; d) M. Rueffer, M. H. Zenk, *Z. Naturforsch.* **1987**, *42*, 319–332; e) R. Stadler, M. H. Zenk, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 555–562.
- [71] R. Stadler, T. M. Kutchan, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1083–1086.
- [72] E. Winterstein, G. Trier, *Die Alkaloide*, Gebrüder Bornträger, Berlin, **1910**, S. 307.
- [73] a) A. R. Battersby, R. Binks, R. J. Francis, D. J. McCaldin, H. Ramuz, *J. Chem. Soc.* **1964**, 3600–3603; b) A. R. Battersby, R. C. F. Jones, R. Kazlauskas, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1873; c) A. I. Scott, S.-L. Lee, T. Hirata, M. G. Culver, *Rev. Latinoam. Quim.* **1978**, *9*, 131.
- [74] N. Samanani, P. J. Facchini, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33878–33883.
- [75] a) N. Samanani, D. K. Liscombe, P. J. Facchini, *Plant J.* **2004**, *40*, 302–313; b) L. Y. P. Luk, S. Bunn, D. K. Liscombe, P. J. Facchini, M. E. Tanner, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10153–10161.
- [76] H. Berkner, K. Schweimer, I. Matecko, P. Rösch, *Biochem. J.* **2008**, *413*, 281–290.
- [77] H. Minami, E. Dubouzet, K. Iwasa, F. Sato, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 6274–6282.
- [78] a) H. Berkner, J. Engelhorn, D. K. Liscombe, K. Schweimer, B. M. Wöhrle, P. J. Facchini, P. Rösch, I. Matečko, *Protein Expression Purif.* **2007**, *56*, 197–204; b) A. Pasquo, A. Bonamore, S. Franceschini, A. Macone, A. Boffi, A. Ilari, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2008**, *64*, 281–283.
- [79] a) A. Ilari, S. Franceschini, A. Bonamore, F. Arengi, B. Botta, A. Macone, A. Pasquo, L. Bellucci, A. Boffi, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 897–904; b) A. Bonamore, M. Barba, B. Botta, A. Boffi, A. Macone, *Molecules* **2010**, *15*, 2070–2078.
- [80] J. A. Chemler, M. A. G. Koffas, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 597–605.
- [81] a) P. K. Ajikumar, W. H. Xiao, K. E. J. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T. H. Phon, B. Pfeifer, G. Stephanopoulos, *Science* **2010**, *330*, 70–74; b) L. Yang, J. Stöckigt, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1469–1479.
- [82] O. Huang, C. A. Roessner, R. Croteau, A. I. Scott, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2237–2242.
- [83] B. Engels, P. Dahm, S. Jennewein, *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 201–206.
- [84] F. Sato, T. Hashimoto, A. Hachiya, K. Tamura, K. B. Choi, T. Morishige, H. Fujimoto, Y. Yamada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 367–372.
- [85] F. Sato, T. Ilui, T. Takemura, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, *8*, 211–218.
- [86] H. Minami, J. S. Kim, N. Ikezawa, T. Takemura, T. Katayama, H. Kumagai, F. Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7393–7398.
- [87] K. M. Hawkins, C. D. Smolke, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 564–573.
- [88] www.nrc-cnrc.gc.ca.
- [89] D. K. Liscombe, J. Ziegler, J. Schmidt, C. Ammer, P. J. Facchini, *Plant J.* **2009**, *60*, 729–743.
- [90] http://medicinalplantgenomics.msu.edu/.
- [91] Washington State University, USA, **2009**, NIH-(GO) ARRA-Transcription Characterization of Medicinal Plants relevant to Human Health.
- [92] M. Morita, Y. Hara, Y. Tamai, H. Arakawa, S. Nishimura, *Genomics* **2000**, *67*, 87–91.
- [93] M. M. Sohani, P. M. Schenk, C. J. Schultz, O. Schmidt, *Plant Biol.* **2009**, *11*, 105–117.
- [94] A. Natalie, J. Kibble, M. M. Sohani, N. Shirley, C. Byrt, U. Roessner, A. Bacic, O. Schmidt, C. J. Schultz, *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 1098–1109.
- [95] T. Nomura, A. L. Quesada, T. M. Kutchan, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34650–34659.
- [96] T. Nomura, T. M. Kutchan, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7722–7738.
- [97] W. De-Eknamkul, A. Ounaroorn, T. Tanahashi, T. M. Kutchan, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 477–484.
- [98] W. De-Eknamkul, N. Suttipanta, T. M. Kutchan, *Phytochemistry* **2000**, *55*, 177–181.
- [99] M. Strolin Benedetti, V. Bellotti, E. Pianezzola, E. Moro, P. Carminati, P. Dostert, *J. Neural Transm.* **1989**, *77*, 47–53.
- [100] M. Sandler, S. B. Carter, K. R. Hunter, G. M. Stern, *Nature* **1973**, *241*, 439–443.
- [101] B. Sjöquist, A. Eriksson, B. Winblad, *Prog. Clin. Biol. Res.* **1982**, *90*, 57–67.
- [102] J. Lee, V. A. Ramchandani, K. Hamazaki, E. A. Engleman, W. J. McBride, T. K. Li, H. Y. Kim, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2010**, *34*, 242–250.
- [103] M. Naoi, W. Maruyama, P. Dostert, K. Kohda, T. Kaiya, *Neurosci. Lett.* **1996**, *212*, 183–186.
- [104] M. Naoi, W. Maruyama, G. M. Nagy, *NeuroToxicology* **2004**, *25*, 193–204.
- [105] a) A. H. Jackson, A. E. Smith, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 403; b) F. Ungemach, J. M. Cook, *Heterocycles* **1978**, *9*, 1089–1119.
- [106] P. D. Bailey, *J. Chem. Res.* **1987**, 202–203.
- [107] J. J. Liu, M. Nakagawa, K. Ogata, T. Hino, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1672–1676.
- [108] K. M. Czerwinski, L. Deng, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4721–4724.
- [109] D. Soerens, J. Sandrin, F. Ungemach, P. Mokry, G. S. Wu, E. Yamanaka, L. Hutchins, M. Dipierro, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 535–545.
- [110] a) L. H. Zhang, J. M. Cook, *Heterocycles* **1988**, *27*, 1357–1363; b) F. Ungemach, M. Dipierro, R. Weber, J. M. Cook, *J. Org.*

- Chem.* **1981**, *46*, 164–168; c) F. Ungemach, M. Dipierro, R. Weber, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3225–3228; d) M. Behforouz, S. J. West, C. Chakrabarty, D. A. Rusk, H. Zarrinmayeh, *Heterocycles* **1992**, *34*, 483–495.
- [111] E. D. Cox, L. K. Hamaker, J. Li, P. Yu, K. M. Czerwinski, L. Deng, D. W. Bennett, J. M. Cook, W. H. Watson, M. Krawiec, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 44–61.
- [112] a) L. Deng, K. Czerwinski, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 175–178; b) D. Li, K. Czerwinski, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 175–178.
- [113] a) H. J. Kumpaty, M. L. Van Linn, M. S. Kabir, F. H. Forsterling, J. R. Deschamps, J. A. Cook, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2771–2779; b) D. M. Han, F. H. Foersterling, J. R. Deschamps, D. Parrish, X. X. Liu, W. Y. Yin, S. M. Huang, J. M. Cook, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 75–82.
- [114] M. L. Van Linn, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3587–3599.
- [115] a) P. D. Bailey, K. M. Morgan, *Chem. Commun.* **1996**, 1479–1480; b) T. Gan, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1478–1483; c) T. Wang, P. Yu, J. Li, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8009–8012; d) J. Li, T. Wang, P. Yu, A. Peterson, R. Weber, D. Soerens, D. Grubisha, D. Bennett, J. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6998–7010; e) P. D. Bailey, K. M. Morgan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 3578–3583; f) X. X. Liu, T. Wang, Q. G. Xu, C. R. Ma, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6299–6303; g) T. Wang, J. M. Cook, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2057–2059; h) P. Yu, T. Wang, J. Li, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3173–3191; i) P. D. Bailey, P. D. Clingan, T. J. Mills, R. A. Price, R. G. Pritchard, *Chem. Commun.* **2003**, 2800–2801; j) A. Deiters, K. Chen, C. T. Eary, S. F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4541–4550; k) J. M. Yu, X. Z. Wearing, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 543–547; l) S. Zhao, X. B. Liao, T. Wang, J. Flippen-Anderson, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6279–6295; m) M. Ohba, I. Natsutani, T. Sakuma, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6471–6474; n) H. Zhou, X. B. Liao, J. M. Cook, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 249–252; o) J. M. Yu, X. Y. Z. Wearing, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3963–3979; p) H. Zhou, D. M. Han, X. B. Liao, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4219–4224; q) J. Ma, W. Y. Yin, H. Zhou, J. M. Cook, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3491–3494; r) J. Ma, W. Y. Yin, H. Zhou, X. B. Liao, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 264–273; s) J. D. Trzupke, D. Lee, B. M. Crowley, V. M. Marathias, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8506–8512; t) W. Y. Yin, M. S. Kabir, Z. J. Wang, S. K. Rallapalli, J. Ma, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3339–3349; u) X. X. Liu, J. R. Deschamps, J. M. Cook, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3339–3342; v) J. W. Lane, Y. Y. Chen, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12684–12690; w) H. Zhou, X. B. Liao, W. Y. Yin, J. Ma, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 251–259; x) S. Yu, O. M. Berner, J. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7827–7828; y) J. M. Yu, T. Wang, X. X. Liu, J. Deschamps, J. Flippen-Anderson, X. B. Liao, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7565–7581.
- [116] a) A. Nören-Müller, I. Reis-Correa, H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10606–10611; b) A. Nören-Müller, W. Wilk, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6061–6066; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5973–5977; c) W. Wilk, A. Nören-Müller, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11976–11984.
- [117] P. D. Bailey, S. P. Hollinshead, N. R. McLay, K. Morgan, S. J. Palmer, S. N. Prince, C. D. Reynolds, S. D. Wood, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 431–439.
- [118] a) P. D. Bailey, N. R. McLay, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 441–449; b) P. D. Bailey, M. H. Moore, K. M. Morgan, D. I. Smith, J. M. Vernon, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3587–3588.
- [119] a) L. Alberch, P. D. Bailey, P. D. Clingan, T. J. Mills, R. A. Price, R. G. Pritchard, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1887–1890; b) P. D. Bailey, M. A. Beard, T. R. Phillips, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3645–3647.
- [120] T. Sasaki, K. Kodama, H. Suzuki, S. Fukuzawa, K. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4550–4553.
- [121] M. S. Reddy, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5413–5416.
- [122] a) T. Soe, T. Kawate, N. Fukui, M. Nakagawa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1857–1860; b) T. Soe, T. Kawate, N. Fukui, T. Hino, M. Nakagawa, *Heterocycles* **1996**, *42*, 347–358.
- [123] a) T. Kawate, M. Yamanaka, M. Nakagawa, *Heterocycles* **1999**, *50*, 1033–1039; b) H. Yamada, T. Kawate, A. Nishida, M. Nakagawa, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8821–8828.
- [124] C. Gremmen, B. Willemse, M. J. Wanner, G. J. Koomen, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1955–1958.
- [125] a) H. Waldmann, G. Schmidt, H. Henke, M. Burkard, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2608–2610; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2402–2403; b) G. Schmidt, H. Waldmann, H. Henke, M. Burkard, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1566–1571; c) H. Waldmann, G. Schmidt, M. Jansen, J. Geb, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5867–5870; d) H. Waldmann, G. Schmidt, M. Jansen, J. Geb, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11865–11884; e) H. Waldmann, G. Schmidt, M. Jansen, J. Geb, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11865–11884; f) H. Waldmann, *Synlett* **1995**, 133–141.
- [126] P. Allef, H. Kunz, *Heterocycles* **2007**, *74*, 421–436.
- [127] a) H. Yamada, T. Kawate, M. Matsumizu, A. Nishida, K. Yamaguchi, M. Nakagawa, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6348–6354; b) T. Kawate, H. Yamada, M. Matsumizu, A. Nishida, M. Nakagawa, *Synlett* **1997**, 761–762.
- [128] F. R. Bou-Hamdan, J. L. Leighton, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2439–2442; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2403–2406.
- [129] P. Ducrot, C. Rabhi, C. Thal, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2683–2692.
- [130] a) W. Zhang, J. Franzen, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 499–518; b) J. Franzén, A. Fisher, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 801–805; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 787–791.
- [131] X. Y. Wu, X. Y. Dai, L. L. Nie, H. H. Fang, J. Chen, Z. J. Ren, W. G. Cao, G. Zhao, *Chem. Commun.* **2010**, 2733–2735.
- [132] M. S. Taylor, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10558–10559.
- [133] I. T. Raheem, P. S. Thiara, E. A. Peterson, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13404–13405.
- [134] I. T. Raheem, P. S. Thiara, E. N. Jacobsen, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1577–1580.
- [135] R. S. Klausen, E. N. Jacobsen, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 887–890.
- [136] J. Seayad, A. M. Seayad, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1086–1087.
- [137] M. J. Wanner, R. N. S. van der Haas, K. R. de Cuba, J. H. van Maarseveen, H. Hiemstra, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7629–7631; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7485–7487.
- [138] N. V. Sewgobind, M. J. Wanner, S. Ingemann, R. de Gelder, J. H. van Maarseveen, H. Hiemstra, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6405–6408.
- [139] M. E. Muratore, C. A. Holloway, A. W. Pilling, R. I. Storer, G. Trevitt, D. J. Dixon, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10796–10797.
- [140] S. W. Youn, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2521–2523.
- [141] C. A. Holloway, M. E. Muratore, R. L. Storer, D. J. Dixon, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4720–4723.
- [142] a) S. T. Le Quement, T. E. Nielsen, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 447–455; b) W. L. Scott, J. G. Martynow, J. C. Huffman, M. J. O'Donnell, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7077–7088; c) S. T. Le Quement, T. E. Nielsen, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 1060–1072; d) S. C. Lee, S. B. Park, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 50–57; e) T. E. Nielsen, S. Le Quement, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7959–7962; f) T. E. Nielsen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3765–3773; g) H. A. Dondas, R. Grigg, W. S. MacLachlan, D. T. MacPherson, J.

Markandu, V. Sridharan, S. Suganthan, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 967–970; h) H. S. Wang, A. Ganesan, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1647–1649; i) E. Dardennes, A. Kovacs-Kulyassa, M. Boisson, C. Petermann, J. Y. Laronze, J. Sapi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1329–1339; j) J. R. Dunetz, R. P. Cicco-

lini, M. Froling, S. M. Paap, A. J. Allen, A. B. Holmes, J. W. Tester, R. L. Danheiser, *Chem. Commun.* **2005**, 4465–4467; k) L. El Kaim, M. Gageat, L. Gaultier, L. Grimaud, *Synlett* **2007**, 500–502; l) J. J. Lai, D. B. Salunke, C. M. Sun, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2174–2177.
