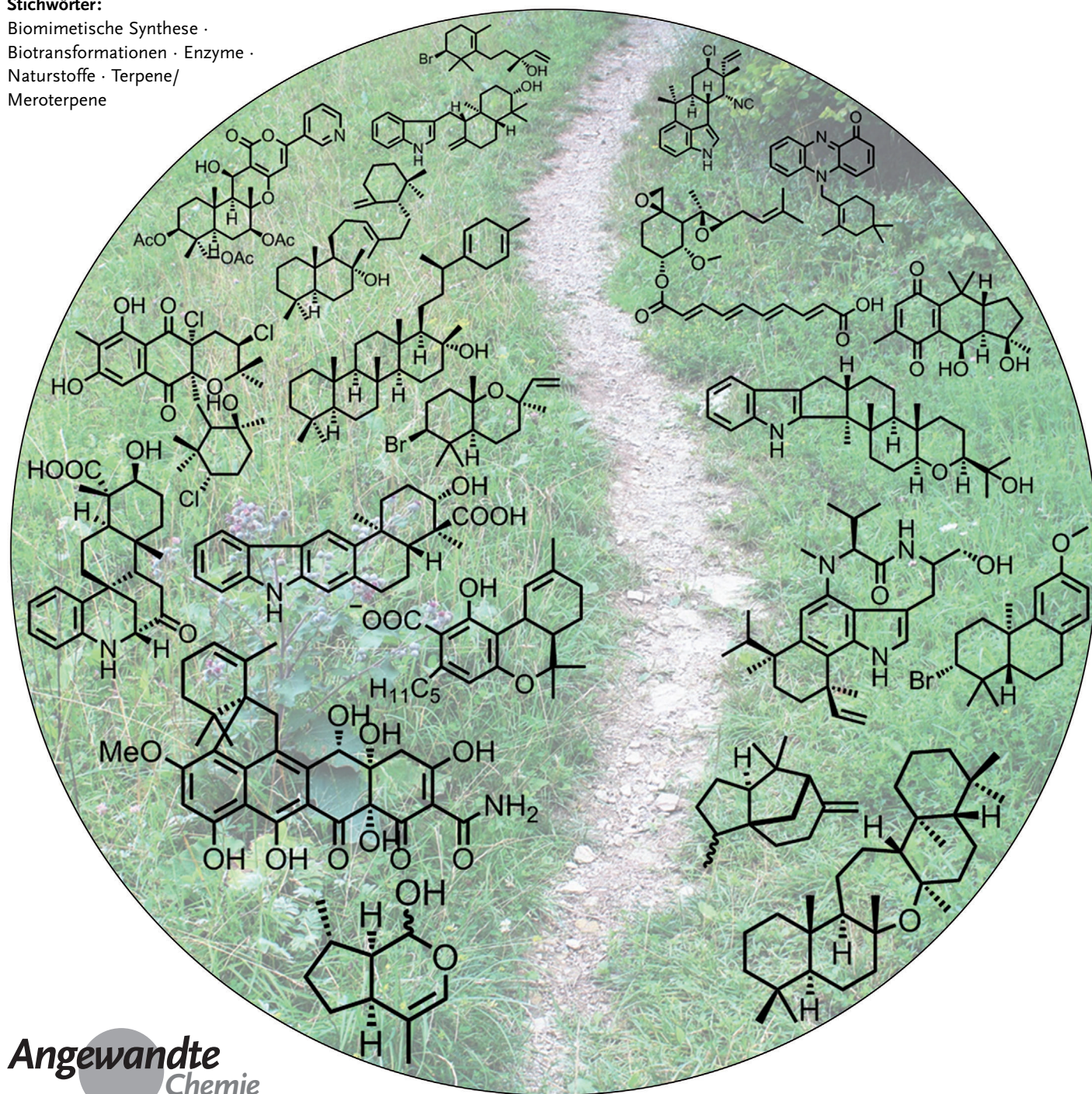


Terpenoid-Biosynthese abseits bekannter Wege: unkonventionelle Cyclasen und ihre Bedeutung für die biomimetische Synthese

Martin Baunach, Jakob Franke und Christian Hertweck*

Stichwörter:

Biomimetische Synthese ·
Biotransformationen · Enzyme ·
Naturstoffe · Terpene/
Meroterpene



Cyclisierungsreaktionen von Terpenen und Terpenoiden zählen zu den komplexesten chemischen Reaktionen in der Natur und tragen maßgeblich zur enormen Strukturvielfalt dieser größten Naturstofffamilie bei. Zahlreiche Studien auf chemischer, genetischer und biochemischer Ebene wurden durchgeführt, um mechanistische Einblicke in diese faszinierenden Reaktionen zu erlangen, die von Terpen- und Terpenoid-Cyclasen katalysiert werden. Eine Vielzahl dieser Enzyme konnte seither charakterisiert werden. Nach klassischer Lehrbuchmeinung werden Terpen-/Terpenoid-Cyclasen gemäß ihrer Struktur und ihrem Reaktionsmechanismus in zwei große Klassen eingeteilt. Jüngste Entdeckungen neuartiger Terpenoid-Cyclasen zeigen jedoch, dass das natürliche enzymatische Repertoire deutlich vielseitiger ist, als zunächst gedacht. Dieser Aufsatz stellt eben diese Terpenoid-Cyclasen in den Fokus, die aus dem Rahmen fallen.

Aus dem Inhalt

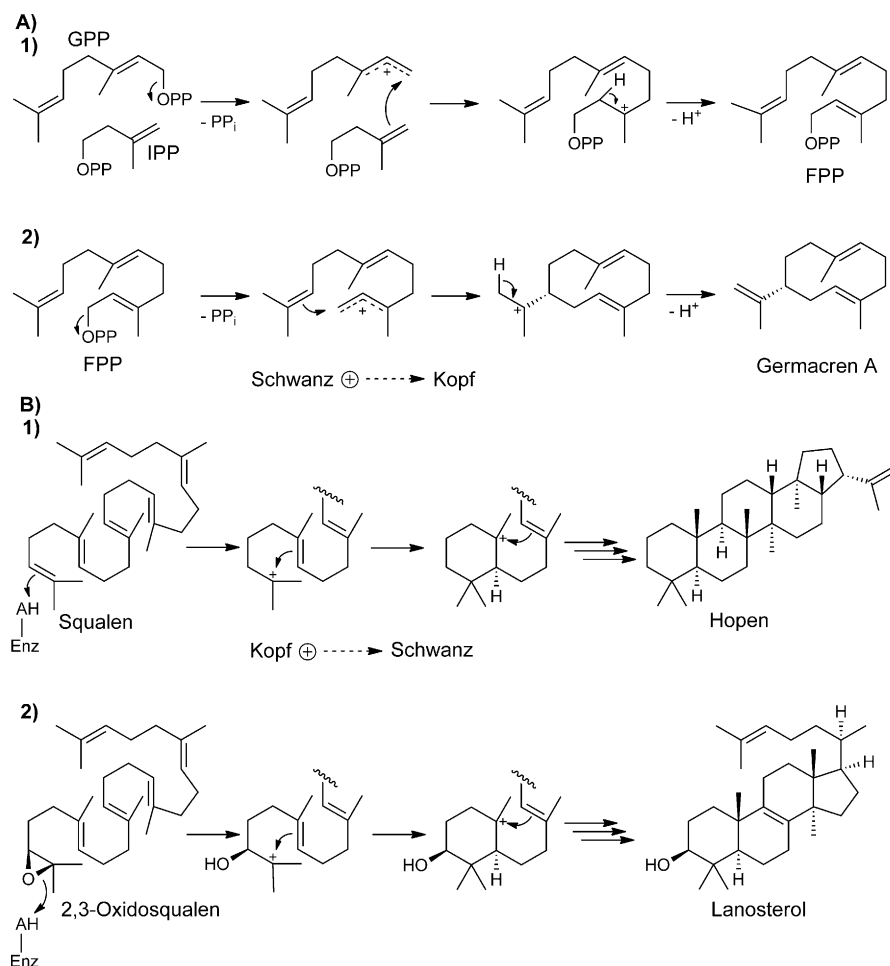
1. Einleitung	2641
2. Neuartige Terpen-Cyclasen von Bakterien, Pilzen und Pflanzen	2643
3. Neue biomimetische Synthesansätze	2656
4. Zusammenfassung und Ausblick	2662

1. Einleitung

Die Komplexität von Terpenen ist faszinierend, besonders wenn man bedenkt, dass die Zehntausende bereits bekannter Vertreter dieser größten Naturstofffamilie von den gleichen einfachen C₅-Bausteinen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) abstammen.^[1] Diese einzelnen C₅-Einheiten können in unterschiedlicher Art und Weise miteinander verknüpft und anschließend cyclisiert und/oder strukturell umgeordnet werden, was zu einer enormen Diversität führt.^[2] Besonders die hoch variablen Cyclisierungsmuster der Terpene tragen zu dieser Vielfalt bei und regen bereits zu aufwendigen Studien an, da die zugrunde liegenden Cyclisierungsreaktionen teilweise außerordentlich komplex sind.^[3] So werden z.B. bei der Umwandlung des linearen Kohlenwasserstoffs Squalen zum pentacyclischen Grundgerüst von Hopan 13 kovalente Bindungen geknüpft und neun Stereozentren gebildet.^[3c] Wegen dieser Komplexität wurden Ausdrücke wie „chemische Zauberei“ verwendet, um Terpen- und Terpenoidcyclisierungen zu beschreiben.^[4] Tatsächlich verlässt sich die Natur weniger auf Zauberei als vielmehr auf spezialisierte Enzyme, die als Terpen-/Terpenoid-Cyclasen (TCs) (oder Terpen-/Terpenoid-Synthasen) bezeichnet werden, um diese komplexen Cyclisierungen zu bewirken. Klassische TCs werden in zwei Gruppen unterteilt, deren Vertreter sich sowohl hinsichtlich des Mechanismus der Substrataktivierung als auch in ihrer Proteinfaltung unterscheiden.^[2,3,5] TCs der Klasse I leiten die Bildung eines Allylkations ein, indem sie eine terminale Pyrophosphatgruppe unter Zuhilfenahme dreikerniger Metallcluster abspalten, die von konservierten sauren und polaren Aminosäuren koordiniert werden (Schema 1A2).^[6] Im Unterschied dazu bilden TCs der Klasse II ein Carbokation durch Säurekatalyse, bei der ein konservierter Aspartatrest als Brønsted-Säure fungiert und eine Isopren-/Isoprenoid-Doppelbindung (Schema 1B1) oder einen Oxiranring (Schema 1B2) protoniert, um ein reaktives Intermediat zu erzeugen.^[2] In der Folge breitet sich die positive Ladung in der sich anschließenden Cyclisierungsreaktion in verschiedene Richtungen entlang der Polyisoprenkette aus. Bei TCs der Klas-

se II kommt es nach einer elektrophilen Aktivierung einer terminalen Prenyleinheit (Kopf) zu einer Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung, wohingegen es bei TCs der Klasse I zu einer Schwanz-zu-Kopf-Cyclisierung nach Ionisierung der allylischen Pyrophosphat-Esterbindung (Schwanz) kommt.^[7] Bemerkenswerterweise ähnelt der Reaktionsmechanismus von TCs der Klasse I dem von Enzymen, die an der Verlängerung von Isoprenoidketten beteiligt sind. Diese Enzyme werden Prenyltransferasen (PTs) genannt, obwohl Prenylprenyltransferasen, Isoprenylpyrophosphat-Synthasen oder Prenyl-elongasen besser passen würden, um sie von Enzymen zu unterscheiden, die (Poly)isoprengruppen auf andere Arten von Substraten übertragen, z.B. Arene.^[2] Sie katalysieren die metallvermittelte Ionisierung von DMAPP oder einem analogen Polyprenylpyrophosphat zu einem Allyl-Carbokation, das von einer π -Bindung des IPP angegriffen werden kann, gefolgt von einer Eliminierung eines Protons, was zu einem verlängerten linearen Terpenoid führt (Schema 1A1).^[3a] Entsprechend der Konfiguration ihrer Produkte können PTs in *cis*- und *trans*-Polyprenylpyrophosphat-Synthasen unterteilt werden.^[8] Im Vergleich dazu reagiert das Carbokation im Reaktionszyklus der TCs der Klasse I mit einer π -Bindung desselben Moleküls; somit können Cyclisierungen, die von TCs der Klasse I katalysiert werden, als intramolekulares Äquivalent der intermolekularen Kupplungsreaktionen der PTs angesehen werden (Schema 1A2).^[1] Es wird vermutet, dass es eine enge evolutionäre Verwandtschaft zwischen TCs der Klasse I und PTs gibt. Diese Annahme wird durch die Entdeckung gestützt, dass eine PT des Huhns dazu befähigt ist, cyclische Olefine als Nebenprodukte zu bilden, sobald sie mit Farnesylpyrophosphat (FPP) inkubiert wird, auch wenn

[*] M. Baunach, J. Franke, Prof. Dr. C. Hertweck
Department Biomolekulare Chemie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (HKI)
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)
E-Mail: Christian.Hertweck@hki-jena.de
Prof. Dr. C. Hertweck
Lehrstuhl Naturstoffchemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena (Deutschland)



Schema 1. Reaktionen, die von Terpen-/Terpenoid-Cyclasen katalysiert werden. A) Reaktionen, die von Enzymen katalysiert werden, die Klasse-I-Terpenoid-Synthase-Struktur aufweisen: 1) Farnesylpyrophosphat-Synthase als Beispiel für eine *trans*-Isoprenyldiphosphat-Synthase^[11] und 2) Germacren-A-Synthase als Beispiel für eine Terpen-Cyclase der Klasse I.^[12] B) Reaktionen, die von Enzymen katalysiert werden, die Klasse-II-Terpenoid-Synthase-Struktur aufweisen: 1) Squalen-Hopen-Cyclase als Beispiel für eine Terpen-Cyclase der Klasse II, die Cyclisierung nach Protonierung einer Isopren-doppelbindung katalysiert,^[13] und 2) Lanosterol-Synthase als Beispiel für eine Terpen-Cyclase der Klasse II, die Cyclisierung nach Protonierung einer Oxirangruppe katalysiert.^[14] GPP = Geranylpyrophosphat; IPP = Isopentenylpyrophosphat; FPP = Farnesylpyrophosphat; PP_i = anorganisches Pyrophosphat.

diese Reaktion tausende Male langsamer abläuft als die Kondensation mit IPP.^[9] Da sich darüber hinaus auch die Gesamtproteinfaltungen der *trans*-Polyprenylpyrophosphat-Synthasen und der TCs der Klasse I mit ihrem als „Klasse-I-Terpenoid-Synthase-Struktur“ bezeichneten Aufbau aus Bündeln von α -Helices stark ähneln und hoch konserviert sind,^[5] findet die Theorie einer divergenten Evolution ausgehend von einem gemeinsamen Synthase-Vorfahren breite Zustimmung.^[10] Im Gegensatz dazu haben TCs der Klasse II eine nicht verwandte α -Fass-Struktur, die als „Klasse-II-Terpenoid-Synthase-Struktur“ bezeichnet wird und sich deutlich von den α -helikalen TCs der Klasse I unterscheidet.^[3b,5] Trotz ihrer unterschiedlichen Proteinstruktur und einem unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus sind beide Enzymklassen dazu in der Lage, die Bildung eines hochreaktiven kationischen Intermediats anzuregen und dabei als Passform zu fungieren, um das flexible Rückgrad des Substrats korrekt im aktiven Zentrum zu platzieren und das Carbokation-Intermediat während der sequenziellen Cyclisierung zu schützen.^[3a,b]

Obwohl die meisten TCs in dieses Schema passen, wäre es denkbar, dass es weitere strukturell nicht verwandte Enzyme gibt, die gleiche mechanistische Konzepte nutzen. Und in der Tat zeigen neueste Untersuchungen, dass genau das der Fall ist. Zur großen Überraschung scheint es, dass das gesamte mechanistische Repertoire der TCs der Klassen I und II von strukturell sehr verschiedenen Enzy-



Martin Baunach wurde 1986 in Würzburg (Deutschland) geboren. 2012 machte er einen Diplomabschluss in Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Seitdem arbeitet er an seiner Doktorarbeit in der Gruppe von Christian Hertweck in Jena (Deutschland). Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Aufklärung der Biosynthese von Indolesquiterpenen und Ansamycinen, die von Mangrovenendophyten gebildet werden.



Jakob Franke wurde 1987 in München (Deutschland) geboren, wo er auch einen B.Sc. in Biochemie von der Technischen Universität München sowie einen M.Sc. in Chemie von der Ludwig-Maximilians-Universität München erhielt. Seit 2011 arbeitet er in der Gruppe von Christian Hertweck in Jena (Deutschland) an seiner Doktorarbeit. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf dem Genom-Mining von Gram-negativen Bakterien.

men initiiert wird. Darüber hinaus zeigen neueste Studien, dass die Natur weitere Cyclisierungsstrategien entwickelt hat, um der Gesamtheit an Terpenen strukturelle Vielfalt hinzuzufügen. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene neuartige TCs exemplarisch vorgestellt. Am Ende werden neue biomimetische Synthesestrategien hervorgehoben, die es Synthesechemikern ermöglichen, enzymkatalysierte Cyclisierungen nachzuahmen.

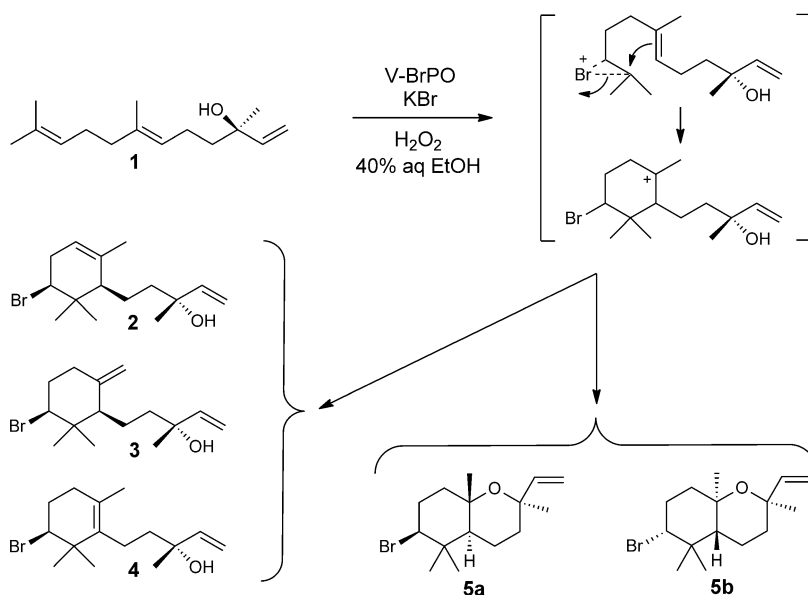
2. Neuartige Terpen-Cyclasen von Bakterien, Pilzen und Pflanzen

2.1. Terpenoidcyclisierungen, die dem Mechanismus von Terpen-Cyclasen der Klassen I und II ähneln

2.1.1. Durch Vanadium-abhängige Haloperoxidasen katalysierte Terpenoidcyclisierungen

Marine Makroalgen sind eine reichhaltige Quelle für halogenierte cyclische Terpene, beispielsweise die Snyderole oder (+)-3 β -Brom-8-epicaparrapioxid, das aus der Rotalge *Laurencia obtusa* isoliert wurde.^[15] Untersuchungen der Biosynthese bromierter cyclischer Sesquiterpene lassen darauf schließen, dass diese ausgehend von linearen Vorstufen über eine Cyclisierung gebildet werden, die von einem Bromoniumion initiiert wird.^[16] Die Entdeckung von Haloperoxidasen in vielen marinen Organismen lieferte erstmals potenzielle Katalysatoren, und in der Tat stellte sich heraus, dass Vanadium-abhängige Bromoperoxidasen (V-BrPOs) aus marinen Algen In-vitro-Cyclisierungen von Terpenen und Ethern katalysieren, für deren Entstehung ein Bromoniumion verantwortlich ist.^[17] In einem chemoenzymatischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass V-BrPOs, die aus den marinen Rotalgen *Corallina officinalis*, *Plocamium cartilagineum* und *Laurencia pacifica* isoliert wurden, Cyclisierungen von Monoterpenen wie Geraniol zu cyclischen

Produkten katalysieren können, die strukturelle Ähnlichkeit zu größeren bromierten cyclischen Terpenen aufweisen, wie die Sesquiterpene α - und β -Snyderol.^[17a] Zwar sind die aus dieser Reaktion resultierenden cyclischen Terpene nicht als marine Naturstoffe bekannt, jedoch legt diese Studie nahe, dass V-BrPOs grundsätzlich an der Biosynthese bromierter cyclischer Terpene beteiligt sind. Schließlich konnte die Beteiligung der V-BrPOs an der Biosynthese bromierter cyclischer Sesquiterpene in vitro durch die Umwandlung des Sesquiterpens (*E*)-(+)-Nerolidol (**1**) zu α -, β - und γ -Snyderol (**2**, **3**, **4**) sowie (+)-3 β -Brom-8-epicaparrapioxid (**5a**) und dessen entsprechendem Diastereomer **5b** gezeigt werden.^[17b] Der vorgeschlagene Mechanismus geht von einer selektiven Bromierung der terminalen Doppelbindung aus, was zu einem Bromcarbeniumion als Zwischenprodukt führt. Nach anschließendem Angriff der elektronenreichen mittleren Doppelbindung führen drei verschiedene Eliminierungsreaktionen zu **2**, **3** und **4**, wohingegen der nukleophile Angriff



Schema 2. Vorgeschlagener Mechanismus für die Biosynthese von α -, β - und γ -Snyderol (**2**, **3**, **4**) sowie (+)-3 β -Brom-8-epicaparrapioxid (**5a**) und dessen Diastereomer **5b**, die von Vanadium-abhängigen Bromoperoxidasen katalysiert wird.^[17b]

der Hydroxygruppe auf das postulierte Bromcarbeniumion in der Bildung von **5a** und **5b** resultiert (Schema 2).^[17b]

Die dreidimensionale Struktur der V-BrPO aus *Corallina officinalis* (CVBPO), die die oben angeführten Reaktionen katalysieren kann, wurde mit einer Auflösung von 2.3 Å aufgeklärt.^[18] Zwei Enzymuntereinheiten mit jeweils 595 Aminosäuren bilden ein Dimer (Abbildung 1 A). Sechs dieser Homodimere ergeben daraufhin ein Dodecamer. Das aktive Zentrum jeder CVBPO befindet sich am Boden einer tiefen, trichterförmigen Höhle, die mit mehreren hydrophoben Partien und geladenen Resten ausgekleidet ist. Darüber hinaus haben die Enzymuntereinheiten eine Bindestelle für zweiwertige Kationen, die zum Aufrechterhalten der Struktur des aktiven Zentrums und für die Dimerinteraktion nötig zu sein scheinen. Allerdings scheinen sie nicht an der Reaktion der



Christian Hertweck (geboren 1969) studierte Chemie und promovierte an der Universität Bonn und am MPI für chemische Ökologie (W. Boland). Anschließend ging er als Stipendiat der Humboldt-Stiftung an die University of Washington, Seattle (H. G. Floss, B.S. Moore). Nach unabhängiger Forschung am HKI Jena wurde er 2006 Lehrstuhlinhaber an der Universität Jena und Abteilungsleiter am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (HKI). Zu seinen Forschungsthemen zählen mikrobielle Naturstoffe, die Untersuchung und Manipulation von Biosynthesewegen sowie mikrobielle Interaktionen.

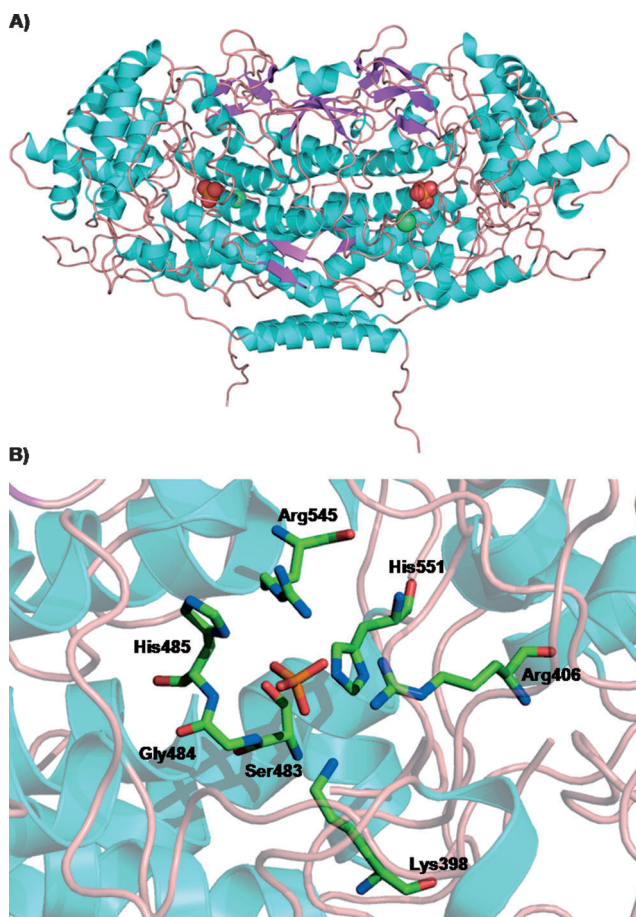
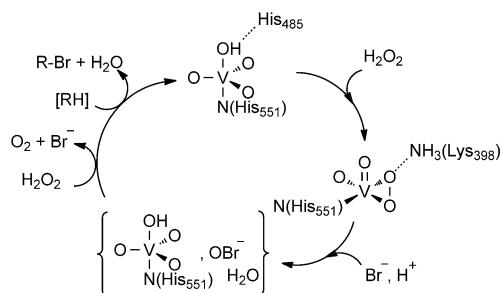


Abbildung 1. Struktur der Vanadium-abhängigen Bromoperoxidase von *Corallina officinalis* (CVBPO; PDB-Code: 1QHB).^[18] A) Bändermodell der Gesamtstruktur eines CVBPO-Homodimers; α -Helices sind türkis eingefärbt, β -Faltblätter violett und Schleifen rosa. Phosphatgruppen (P orange, O rot) und zweiwertige Kationen (Ca grün) sind als Kalottenmodell abgebildet. B) Reste des aktiven Zentrums der CVBPO mit einer gebundenen Phosphatgruppe als Stäbchenmodell (C grün, N blau, P orange, O rot). Die Darstellung wurde mit PyMol erzeugt.^[22]

CVBPO teilzunehmen. Die Kristallisation wurde in Gegenwart von anorganischem Phosphat als Ersatz für Vanadat durchgeführt, das mit letzterem um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert. Im Unterschied zur Vanadatgruppe ist die Phosphatgruppe nicht kovalent an den Histidinrest (His551) des aktiven Zentrums gebunden. Die Phosphatgruppe wird stabilisiert durch Wasserstoffbrücken zu Ser483, dem Rückgrat des Gly484-Amids und His485. Zusätzlich bildet die Phosphatgruppe Salzbrücken zu Lys398, Arg406 und Arg545 (Abbildung 1 <Bxfigr1 >).^[19] Vanadium, das vermutlich kovalent an His551 gebunden ist, wird vom Protein wahrscheinlich in einer trigonal-bipyramidalen Geometrie koordiniert, wie es in anderen Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen (V-HPOs) beobachtet wurde.^[19] Auf der Grundlage von Proteinstrukturen^[18] und Untersuchungen zu mechanistischen Details anderer V-HPOs^[19,20] wurde ein Katalysezyklus vorgeschlagen, der durch die Koordination eines Äquivalents H_2O_2 an das Vanadat-Zentrum eingeleitet wird. Die Bildung einer Wasserstoffbrücke zur Seitenkette

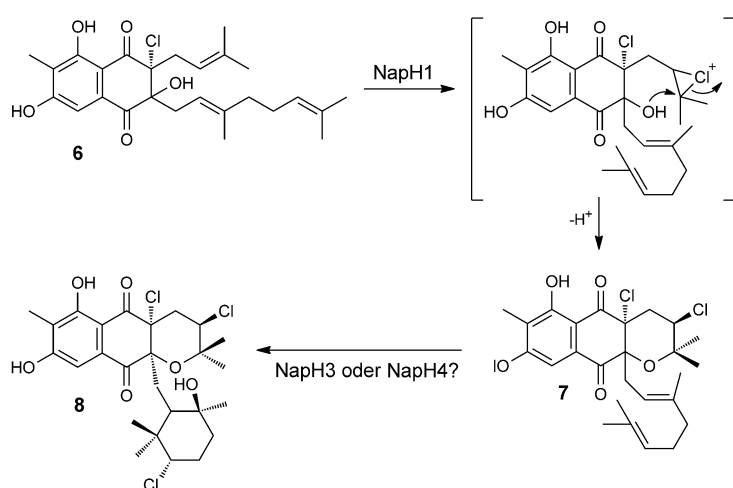
von Lys398 aktiviert das Vanadium-koordinierte Peroxid durch Ladungstrennung und hilft mit bei der Bromoxidation. Das oxidierte Brom-Intermediat verlässt die Koordinationsumgebung wahrscheinlich als hypobromige Säure nach Protonierung durch ein eintretendes Wassermolekül,^[20a] wenn gleich auch andere Bromierungsspezies denkbar wären.^[19] Dieses Intermediat reagiert weiter mit einem Nukleophil zur bromierten Verbindung oder mit einem weiteren Äquivalent Wasserstoffperoxid unter Bildung von Sauerstoff und Bromid, wenn es an geeigneten Substraten mangelt (Schema 3).^[19,20b]



Schema 3. Vorgeschlagener Katalysezyklus von CVBPO. Details siehe Text. Das Schema wurde aus Lit. [18–20] angepasst.

Dieser vorgeschlagene Mechanismus ähnelt dem der TCs der Klasse II wie der Squalen-Hopen-Cyclase, die die stereospezifische Cyclisierung von Squalen durch Protonierung der terminalen Doppelbindung einleitet, gefolgt von einer stufenweise ablaufenden Cyclisierungskaskade in der Enzymtasche.^[3c,13] Das aktive Zentrum der Squalen-Hopen-Cyclase ist überwiegend hydrophob wegen der zahlreichen aromatischen Reste, für die angenommen wird, dass sie die Carbokation-Intermediate und deren Übergangszustände durch Quadrupol-Ladungs-Wechselwirkungen stabilisieren.^[21] Analog zu diesem Schema wurde von Carter-Franklin und Butler vorgeschlagen, dass die Cyclisierung bei V-BrPOs entlang des hydrophoben Substratkanals abläuft, nachdem die terminale Doppelbindung asymmetrisch bromiert wurde.^[17b]

Interessanterweise sind im Biosynthesegencluster von Napyradiomycin (*nap*) von *Streptomyces aculeolatus* NRRL 18422 und vom marinen Bodenbakterium *Streptomyces* sp. CNQ-525 drei mutmaßliche Vanadium-abhängige Chloroperoxidasen (V-CIPOs), NapH1, NapH3 und NapH4, codiert. Es wurde angenommen, dass diese Enzyme an Chloronium-ion-vermittelten Cyclisierungen in der Biosynthese von chlorierten Dihydrochinonen wie **8**, die zur Napyradiomycin-familie gehören, beteiligt sind (Schema 4).^[23] Diese Verbindungen werden als Meroterpe bezeichnet, da sie nur zu einem Teil von Terpenen abstammen. Im Falle der Dihydrochinone stammt der andere Teil von einem Polyketid. Ein erster experimenteller Beleg für die Beteiligung einer der V-CIPOs an der Cyclisierung des Terpenoidteils von **8** stammt aus der biochemischen Charakterisierung des Enzyms NapH1, für das in vitro gezeigt werden konnte, dass es die stereoselektive Umwandlung von SF2415B1 (**6**) zu SF2415B3



Schema 4. Vorgeschlagener Biosyntheseweg des chlorierten Dihydrochinons A80915A-D (**8**) ausgehend von dessen Vorstufe SF2415B1 (**6**)^[23] über Intermediat SF2415B3 (**7**), das ausgehend von **6** von der Vanadium-abhängigen Chlorperoxidase NapH1 biosynthetisiert wird.^[24]

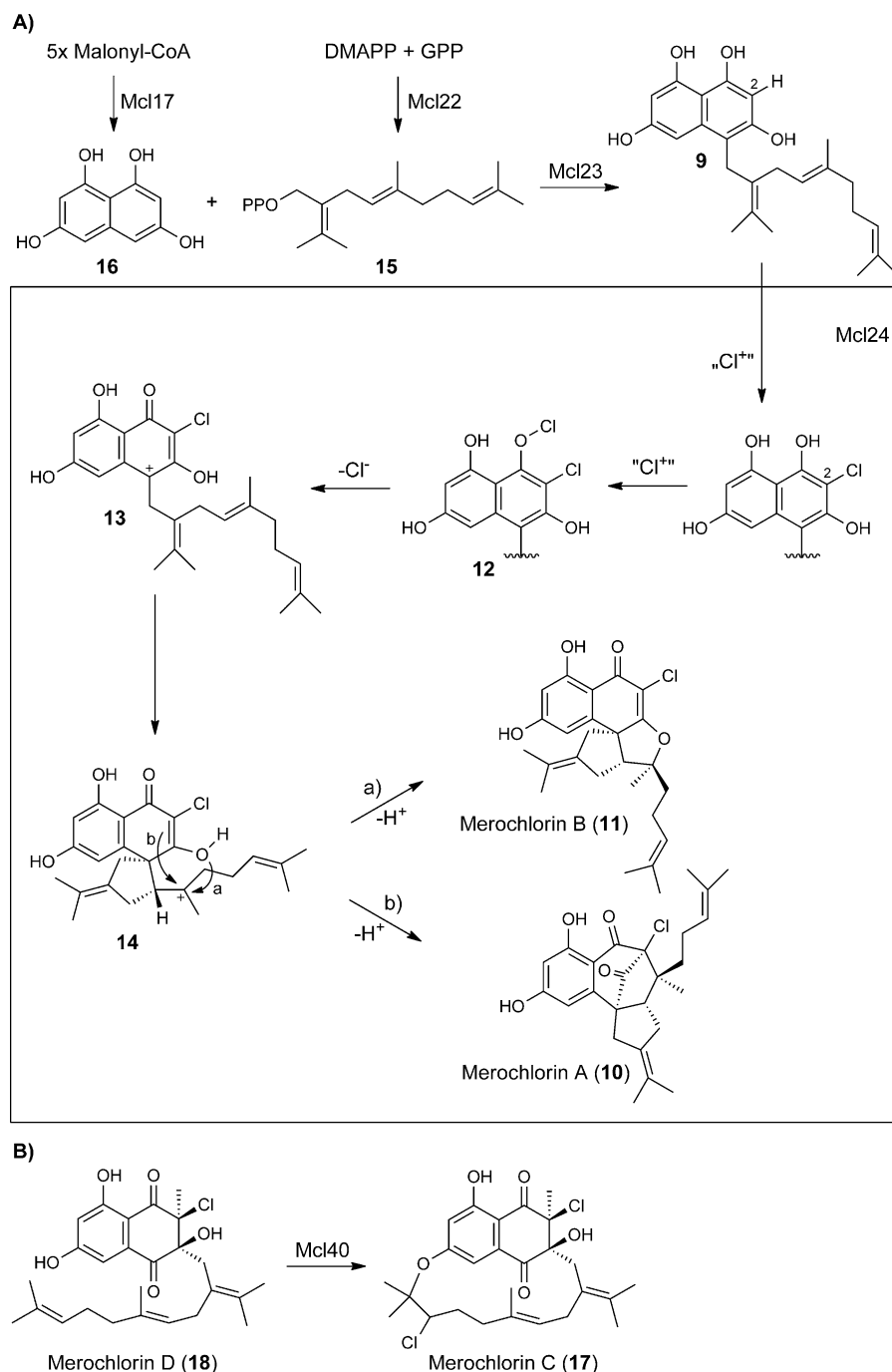
(**7**) über eine Chloronium-ion-induzierte Veretherung katalysiert.^[24]

Noch mehr experimentelle Belege für eine Beteiligung von bakteriellen V-CIPOs an der Cyclisierung von komplexen Meroterpenoiden kommen von Studien zur Biosynthese der Merochlorine.^[25] Kürzlich konnten Diethelm et al. zeigen, dass Mcl24, eine der beiden V-CIPOs, die im Merochlorin-Biosynthesegencluster (*mcl*) von *Streptomyces* sp. CNH-189 codiert sind, das Trien Premerochlorin (**9**) auf direktem Wege zu Merochlorin A (**10**) und B (**11**) umwandeln kann.^[25a] Allerdings wird ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, der sich stark von dem anderer V-HPOs, die an Cyclisierungen von Terpenoiden beteiligt sind, unterscheidet. Diese Umwandlung verläuft wahrscheinlich über eine neuartige Reaktionsfolge, bestehend aus einer Chlorierung und einer Desaromatisierung/Terpencyclisierung. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus geht von einer selektiven C2-Chlorierung von **9** aus, gefolgt von einer zweiten Chlorierung, was zur Bildung der aromatischen Hypochlorit-Spezies **12** führt. Der Verlust von Chlorid liefert das Benzyl-Carbokation **13**, das eine Kation-vermittelte Terpencyclisierung über Intermediat **14** begünstigt (Schema 5A). Die Autoren konnten mithilfe von Chlorierungsmitteln eine chemische Synthese entwickeln, die die oxidative Desaromatisierung/Cyclisierung des Enzyms nachahmt. Die Verwendung von *N*-Chlorsuccinimid in Gegenwart von zwei Äquivalenten *i*Pr₂NH schien die beste der getesteten Bedingungen zu sein, wobei die Inkubation mit **9** zur Bildung von verschiedenen Merochlorin-Derivaten neben **10** und **11** in einer Gesamtausbeute von 30 % führte. Diese Beobachtung brachte die Autoren dazu zu mutmaßen, dass ein in situ gebildetes Chloramin-Intermediat das aktive Oxidationsmittel sein könnte, wie es in der Biosynthese von Rebeccamycin für die Flavin-abhängige Chlorinase RebH vorgeschlagen wurde.^[25a] Mit diesem Schlüsselenzym in Händen gelang Teufel et al. die enzymatische Eintopfsynthese von **10** und **11**.^[25c] In einer In-vitro-Rekonstruktion des Biosynthesewegs von Merochlorin A und B konnten die Au-

toren zeigen, dass Mcl24, die Isosesquilavandulyldi-phosphat(**15**)-Synthase Mcl22, die Typ-III-Polyketid-Synthase Mcl17, die 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN, **16**) bildet, sowie die aromatische Prenyltransferase Mcl23 ausreichen, um **10** und **11** ausgehend von DMAPP, GPP und Malonyl-CoA zu bilden (Schema 5A).^[25c] In-vivo-Experimente sprachen dafür, dass auch die zweite V-CIPO, die im *mcl*-Biosynthesegencluster codiert ist, an einem Terpen-cyclisierungsschritt in der Biosynthese von Merochlorin C (**17**) beteiligt ist.^[25b] Eine Mutante, die heterolog ein Fragment des *mcl*-Biosynthesegenclusters exprimiert, dem *mcl40* fehlte, häufte **10**, **11** und den zuvor unentdeckten Metaboliten Merochlorin D (**18**) an, war jedoch nicht mehr in der Lage, **17** zu bilden, wohingegen ein Klon, der ein Fragment mit *mcl40* exprimiert, alle natürlichen Merochlorine bildete. Aus diesem Grund ist es gut denkbar, dass Mcl40 die Makrocyclisierung von **18** oder einem weniger substituierten Derivat zu **17** oder dem entsprechenden Analogon katalysiert, ähnlich der Veretherung, die von NapH1 katalysiert wird (Schema 5B).^[25b]

2.1.2. Prenyltransferasen, die auch als Cyclasen arbeiten

Ein weiterer Fall, für den eine Chloronium-ion-vermittelte Cyclisierung vorgeschlagen wurde, ist die Biosynthese von Indolalkaloiden vom Hapalindol-Typ, eine Gruppe tetracyclischer Naturstoffe, die eine Isonitrilgruppe tragen.^[26] Die Ursprungshypothese zur Biosynthese der Hapalindole ging von einer Chloronium-ion-vermittelten Cyclisierungskaskade zwischen β -Ocimen (**18**) und Vinylisonitril **19** aus, die zur Bildung von tricyclischen Hapalindolen führt. Diese könnten die Ausgangsverbindungen für weitere Subfamilien der Indolalkaloide vom Hapalindol-Typ sein (Schema 6A).^[26,27] Da jedoch nicht alle Verbindungen des Hapalindol-Typs chloriert sind, wurde vorgeschlagen, dass während der Cyclisierung Chloroniumionen und Protonen im aktiven Zentrum des Enzyms miteinander konkurrieren.^[28] Hillwig et al. waren die ersten, die mit dem Biosynthesegencluster der Ambiguine (*amb*) aus *Fischerella ambigua* UTEX1903 einen Biosynthesegencluster für einen Naturstoff vom Hapalindol-Typ identifizieren konnten.^[26] Überraschenderweise ist weder im *amb*-Biosynthesegencluster noch im Genom von *F. ambigua* UTEX1903 ein Enzym codiert, das einer Chlorperoxidase ähnelt, welche die vorgeschlagene, durch ein Chloronium ion eingeleitete Cyclisierungskaskade katalysieren könnte. Darüber hinaus ist keine augenscheinliche Terpen-Synthase im *amb*-Biosynthesegencluster codiert, die für die Synthese von β -Ocimen (**18**) infrage käme. Stattdessen konnten drei Gene der Prenyltransferase-Superfamilie identifiziert werden (*ambP1-3*). In-vitro-Experimente ergaben, dass *ambP2* für eine GPP-Synthase und *ambP3* für eine aromatische Prenyltransferase codiert, die eine weitere Prenylierung von Hapalindol U (**21**) am aromatischen Ring katalysiert, was die Voraussetzung für die Bildung der pentacyclischen Ambiguine ist. Da keiner der drei Vertreter der Prenyltransferase-Superfamilie **18** in vitro bilden konnte, schlugen die Autoren



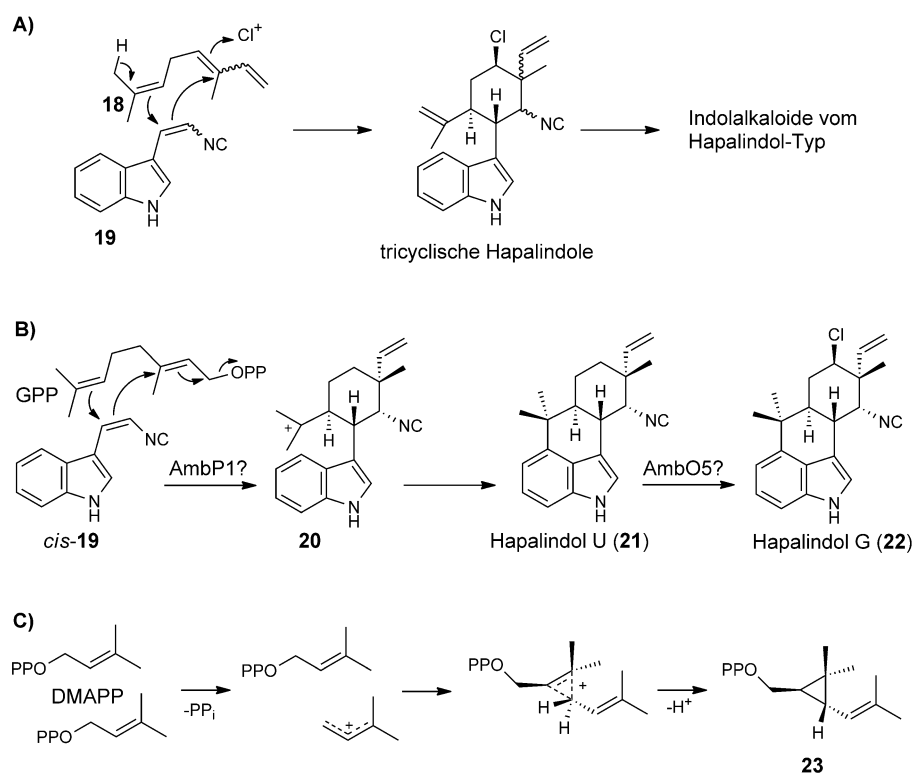
Schema 5. Vorgeschlagene Biosynthese der Merochlorine. A) Vorgeschlagene Biosynthese von Merochlorin A (**10**) und B (**11**) ausgehend von DMAPP, GPP und Malonyl-CoA. Durch Prenylierung von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN, **16**) mit Isosiquilavandulyldiphosphat (**15**) wird **9** gebildet^[25c] und anschließend über eine selektive C2-Chlorierung cyclisiert, gefolgt von einer weiteren Chlorierung zu **12**, das durch Verlust von Chlorid zu einem Benzyl-Carbokation umgewandelt wird. Dieses reaktive Carbokation ist anfällig für eine Kation-vermittelte Terpencyclisierung über **14**, was zur Bildung von **10** und **11** führt. Diese Reaktionsfolge wird alleinig von der V-CIPO Mcl24 katalysiert.^[25a] B) Vorgeschlagene Biosynthese von Merochlorin C (**17**) ausgehend von dessen vermeintlicher Vorstufe Merochlorin D (**18**), katalysiert von der V-CIPO Mcl40.^[25b]

vor, dass es sich bei der Vorstufe des Terpen-abgeleiteten Teils der Hapalindole um GPP handeln könnte. Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass AmbP1, das wie AmbP3 ein Homologes von bakteriellen aromatischen Prenyltransferasen

ist, sehr wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Verknüpfung von *cis*-**19** und GPP spielt, um die tetracyclischen Grundgerüste zu bilden.^[26] Führt man diesen Gedanken weiter, ist ein Szenario denkbar, bei dem AmbP1 die Bildung eines Allyl-Carbokations katalysiert, das die Bildung des tricyclischen Intermediats **20** in Gang bringt. Das so entstandene Carbokation kann von der Indolgruppe abgefangen werden, was zu den tetracyclischen Hapalindolen führt, oder alternativ durch Eliminierung eines Protons tricyclische Hapalindole bilden, die zu **21** weiterverarbeitet werden können. Diese biosynthetische Vorstufe kann anschließend von der mutmaßlichen Halogenase AmbO5 zu **22** chloriert werden (Schema 6B). Solch eine Cyclisierung ausgehend von zwei Alkenen, katalysiert von einer Prenyltransferase, würde an die Chrysanthemyldiphosphat-Synthase (CPPase) erinnern, die die Cyclopropanierung zweier Moleküle DMAPP nach initialer Dephosphorylierung eines der Reaktionspartner katalysiert, was zur Bildung von Chrysanthemyldiphosphat (**23**) führt (Schema 6C).^[29] Da CPPasen und FPPasen, die zu den *trans*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen gehören, eine hohe Sequenzübereinstimmung aufweisen (75 % Identität und 96 % Ähnlichkeit), geht man davon aus, dass CPPasen von FPPasen abstammen.^[29,30] Der Nachweis, dass sich auch eine aromatische Prenyltransferase im Laufe der Evolution dazu entwickelt hat, die Cyclisierung zweier Alkene zu katalysieren, wäre aus einem mechanistischen Blickwinkel höchst interessant.

In einem jüngsten Bericht über die Biosynthese von Cyclo-lavandulyldiphosphat (**25**) finden sich sogar noch mehr mechanistische Parallelen zu den eben genannten Chrysanthemyldiphosphat-Synthasen. Ozaki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein ungewöhnliches Mitglied der *cis*-Isoprenyldiphosphat-Synthase-Superfamilie aus dem

Lavanducyanin-Produzenten *Streptomyces* sp. CL190 die Kondensation und Cyclisierung zweier Moleküle DMAPP nach initialer Dephosphorylierung zu **25** bewirkt, einem strukturellen Bestandteil von Lavanducyanin (**26**).^[31] Der



Schema 6. A) Erste Hypothese zur Biosynthese von Hapalindolen.^[26,27] B) Denkbare neue Route für die Biosynthese von Hapalindol U (21), die AmbP1 als Schlüsselkatalysator für die Bildung der cyclischen Grundstruktur umfasst, auf Grundlage der Überlegungen von Hillwig et al.^[26] C) Vorgeschlagener Reaktionsweg in der Biosynthese von Chrysanthemylidiphosphat (23), katalysiert von der CPP-Synthase.^[29]

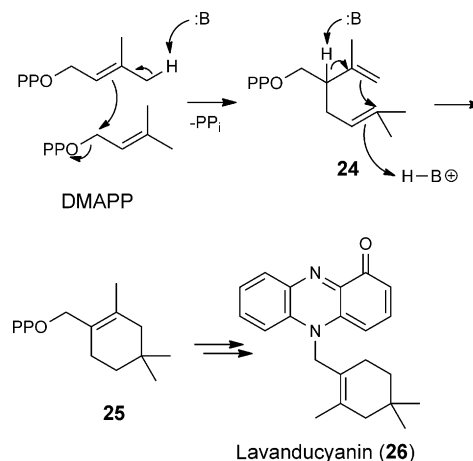
vorgeschlagene Reaktionsmechanismus umfasst zwei Reaktionen, in denen zwei Moleküle DMAPP in einer irregulären Nicht-Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung miteinander zu Lavandulylphosphat (24) verbunden werden, das anschließend zu 25 cyclisiert wird (Schema 7).^[31] Bemerkenswerterweise hat die Cyclolavandulyldiphosphat-Synthase große Ähnlichkeit zur Undecaprenyldiphosphat-Synthase, welche die sequenzielle *cis*-Kondensation von acht IPP-Einheiten mit FPP während der Biosynthese von Undecaprenyldiphosphat katalysiert.^[32] Da sich die Struktur der *cis*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen stark von derjenigen von *trans*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen unterscheidet,^[2] scheint es, dass unabhängig eine weitere nicht verwandte Prenyltransferase dahingehend evolviert ist, gleichzeitig als Prenyltransferase und Cyclase zu fungieren.

2.1.3. Eine neue Familie von Meroterpen-Cyclasen

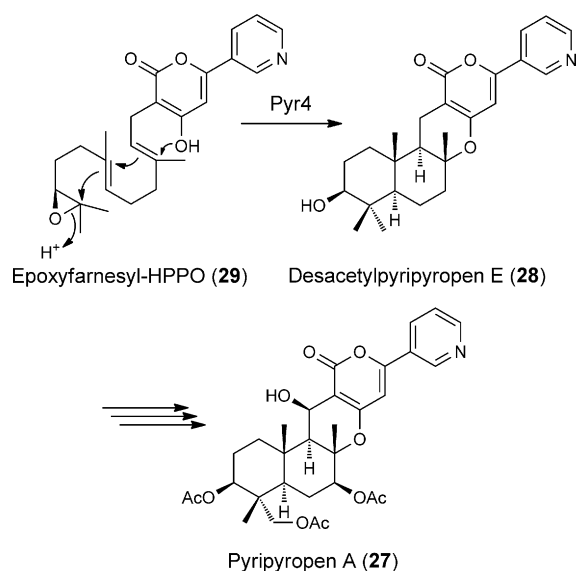
Bei allen bisher beschriebenen TCs gab ihre Annotation entweder einen Hinweis auf ihre Funktion, etwa bei den Haloperoxidasen, oder auf ihre Beteiligung am Terpenmetabolismus, wie bei den Prenyltransferasen, die auch als Cyclasen arbeiten. Das nächste Beispiel handelt von einer kryptischen TC, deren Annotation anfangs keinerlei Hinweise auf eine katalytische Aktivität oder eine Rolle im Terpenmetabolismus gab. In einer ausgefeilten Studie konnten Itoh et al.

den Biosynthesegencluster von Pyripyropen A (27) identifizieren, einem pilzlichen Meroterpen, das von *Aspergillus fumigatus* FO-1289 gebildet wird (Schema 8).^[33] Eine Retrobiosynthese ließ darauf schließen, dass eine pilzliche, iterative Polyketid-Synthase (PKS) vom Typ I, die Nicotinyl-CoA als Starteinheit nutzt, 4-Hydroxy-6-(3-pyridinyl)-2H-pyran-2-on (HPPO) bildet. Das α -Pyron-Grundgerüst wird daraufhin von einer Prenyltransferase farnesyliert, gefolgt von einer Epoxidierung der terminalen Doppelbindung. Anschließende Cyclisierung nach Protonierung des Oxiranrings führt zu Desacetylpyripyropen E (28), der Vorstufe von Pyripyropen A (27). Dies würde einer Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierung ähneln, analog zu TCs der Klasse II wie der Lanosterol-Synthase, die die Bildung eines Carbokations durch Protonierung einer terminalen Oxirangruppe einleitet.^[14] Aus diesem Grund wurde angenommen, dass sich eine klassische TC unter den Schlüsselenzymen der Pyripyropen-Biosynthese befindet. Dennoch konnte durch Homologiesuche kein Gen ausgemacht werden, das für eine

TC codiert. Deshalb wurde vermutet, dass eine Epoxidase eine Sauerstoff-vermittelte Cyclisierung katalysieren könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der heterologe Wirt *A. oryzae* M-2-3, der die Gene der mutmaßlichen Pre-



Schema 7. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Cyclolavandulyldiphosphat-Synthase, beginnend mit einer irregulären Nicht-Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung zweier Moleküle DMAPP zu Lavandulylphosphat (24), das anschließend zu Cyclolavandulyldiphosphat (25) cyclisiert wird, einem strukturellen Bestandteil von Lavanducyanin (26).^[31]



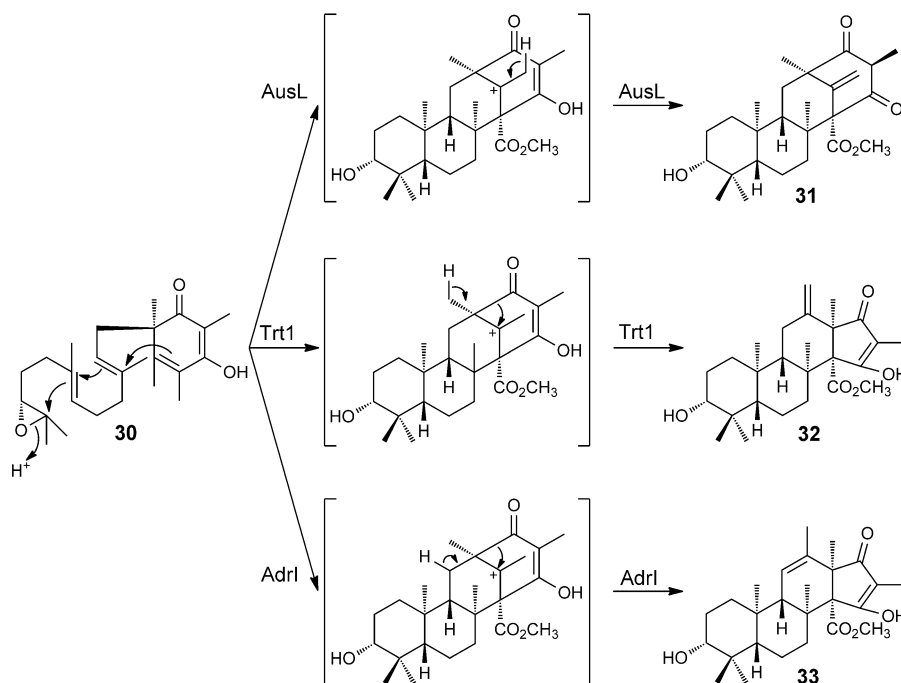
Schema 8. Vorgeschlagener Mechanismus für die Cyclisierung von Epoxyfarnesyl-HPPO (**29**) zu Desacetylpyripyropen E (**28**), der Vorstufe von Pyripyropen A (**27**), katalysiert durch die neuartige, membran-gebundene Meroterpenoid-Cyclase Pyr4.^[33a]

nyltransferase sowie der vermeintlichen Epoxidase exprierte, mit HPPO supplementiert, was jedoch nur zur Produktion des Dihydroxyfarnesyl-substituierten Pyrons anstelle des cyclisierten Meroterpenoids führte. Folglich konnte die Epoxidase die Cyclisierung des Epoxids, das stattdessen spontan zum Diol hydrolysierte, nicht katalysieren. Daraus ließ sich ableiten, dass eine kryptische, zu diesem Zeitpunkt unentdeckte Cyclase existieren musste. Letztlich geriet das Gen *pyr4* in den Fokus der Aufmerksamkeit, das als Gen für ein „integrales Transmembranprotein“ annotiert war. Dies geschah, da sich zahlreiche Homologe in anderen mutmaßlichen Biosynthesegenclustern von Polyketid-abgeleiteten Meroterpenen in *A. terreus* und *A. fumigatus* sowie in Biosynthesegenclustern von Indolditerpenen^[34] und dem Biosynthesegencluster des Chinon-Meroterpenoids BE-40644 befinden.^[35] Pyr4 enthält keine aspartatreichen Motive, die sonst typisch für TCs sind. Darüber hinaus besteht das Protein nur aus 242 Aminosäuren und war somit deutlich kleiner als jede zu diesem Zeitpunkt bekannte TC. Ein Hydropathiediagramm sagte voraus, dass Pyr4 sieben membrandurchspannende Helices aufweist, was auch eine Neuheit für TCs wäre. Nichtsdestotrotz führten In-vitro-Versuche mit Epoxyfarnesyl-

HPPO (**29**) und mikrosomal gebundenem Pyr4 zur Bildung von **28**. Dieser Befund bestätigte, dass es sich bei Pyr4 um eine neuartige, membrangebundene Meroterpenoid-Cyclase (MTC) handelt, die das erste Mitglied einer großen Familie von MTCs zu sein scheint.

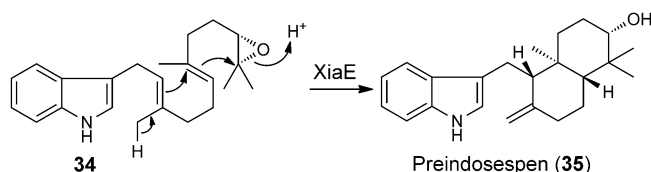
Für Homologe von Pyr4 aus anderen Polyketid-abgeleiteten Meroterpenoid-Biosynthesewegen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sie an Meroterpenoidcyclisierungen beteiligt sind. In Rekonstitutionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Pyr4-Homologen Trt1 und AusL, die in den Biosynthesegenclustern von Terretinin und Austinol codiert sind, um MTCs handelt.^[36] In einem sehr ähnlichen Ansatz konnte außerdem nachgewiesen werden, dass es sich bei AdrI um die MTC handelt, die an der Biosynthese von Andrastin A beteiligt ist.^[37] Diese Verbindungen leiten sich von 3,5-Dimethylorsellinsäure (DMOS) und FPP ab und haben Epoxyfarnesyl-DMOA-Methylester (**30**) als gemeinsames Biosyntheseintermediat (Schema 9). Die unterschiedlichen Resultate der Cyclisierungen, die von AusL, Trt1 und AdrI katalysiert werden und zur Bildung von Protoaustinoid A (**31**), Preterretinin A (**32**) und Andrastin E (**33**) führen, hängen von der Präferenz der jeweiligen MTC bezüglich des Ortes der Deprotonierung des gemeinsamen tetracyclischen Carbokation-Intermediats ab.

Diese Beispiele unterstreichen die Rolle dieser neuen Familie von TCs in der Biosynthese von Polyketid-abgeleiteten Meroterpenen aus Pilzen. Das Vorhandensein von Pyr4-Homologen in Biosynthesegenclustern von Indolditerpenen lässt darauf schließen, dass diese neuartigen MTCs Verbindungen als Substrate haben könnten, die im Hinblick auf den



Schema 9. Vorgeschlagener Mechanismus für die Cyclisierung von Epoxyfarnesyl-DMOA-Methylester (**30**) zu Protoaustinoid A (**31**), Preterretinin A (**32**)^[36] und Andrastin E (**33**)^[37] katalysiert von AusL, Trt1 und AdrI, abhängig von der jeweiligen Stelle der Protonabstraktion am gemeinsamen tetracyclischen Carbokation-Intermediat.

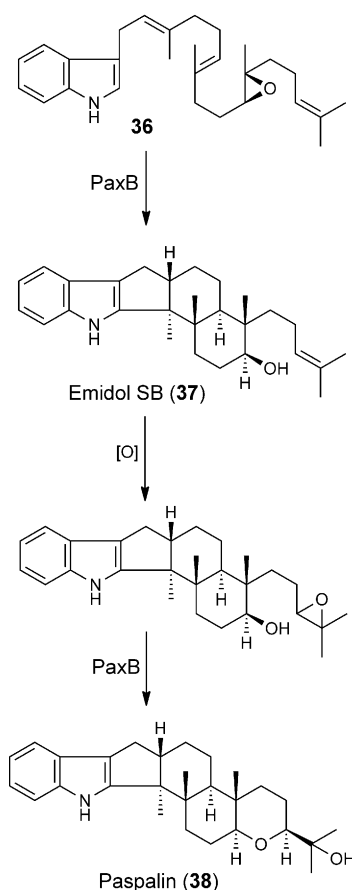
Nicht-Terpenoid-Teil und die Länge der Terpenoidseitenkette variieren. Darüber hinaus legt das Auftreten eines Pyr4-Homologen im Biosynthesegencluster von BE-40644 eines Actinomyceten nahe, dass diese Enzyme unter verschiedenen Reichen des Lebens weit verbreitet sind. Diese Annahmen werden gestützt von einer Studie über die Biosynthese von Indolesquiterpenen aus einem endophytischen Streptomyces, der aus Mangroven isoliert wurde.^[38] Genetische Analysen, Gendeletionsexperimente und heterologe Rekonstitutionsexperimente sprachen dafür, dass es sich bei dem Pyr4-Homologen XiaE um das erste bakterielle Beispiel dieses neuen Typs von TCs und den ersten funktionell charakterisierten Vertreter, der Indolterpenoidcyclisierungen katalysiert, handelt (Schema 10).^[39]



Schema 10. Vorgeschlagener Mechanismus für die Cyclisierung eines Indolfarnesylepoxid-Intermediats (**34**) zu Preindospen (**35**), katalysiert durch die Indolesquiterpenoid-Cyclase XiaE.^[39]

In-vivo-Experimente deckten auf, dass das Pyr4-Homologe PaxB dazu in der Lage ist, das epoxidierte Prenylindol **36** zu cyclisieren, was zu der Bildung von Emidol SB (**37**) führt (Schema 11). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PaxB ein Prenylindol cyclisieren kann, das an beiden terminalen Doppelbindungen epoxidiert ist, was in der Bildung von Paspalin (**38**) resultiert, der Kernstruktur von Paxillin.^[40] Diese Entdeckungen sprechen für einen Mechanismus über stufenweise Epoxidierungen und Cyclisierungen in der Paspalin-Biosynthese. Demzufolge ist PaxB das erste charakterisierte Mitglied einer pilzlichen Enzymfamilie, welche die Cyclisierung eines Diterpenrestes eines Meroterpens katalysiert.

Vorangegangene wegweisende Studien zur Biosynthese von Paspalin (**38**) deckten auf, dass *paxB* zu den vier Genen gehört, die den kleinsten Satz an Genen darstellen, die für die Bildung dieses Indolditerpens benötigt werden.^[41] Dennoch wurde im vorgeschlagenen Biosynthesemodell die Prenyltransferase PaxC als die TC (fehl)interpretiert.^[34,41] Dieser Vorschlag gründete wahrscheinlich auf der engen Strukturverwandtschaft von TCs der Klasse I und PTs mit Klasse-I-Terpenoid-Synthase-Struktur, die in Abschnitt 1 beschrieben wird, auch wenn der Mechanismus dieser Enzyme, die eine Schwanz-zu-Kopf-Cyclisierung nach Ionisierung der Allyl-Diphosphatesterbindung katalysieren, nicht auf die epoxidierte 3-Geranylgeranylindol-Vorstufe angewendet werden kann. Eine Analyse der Sekundärstruktur ließ darauf schließen, dass es sich bei PaxB um einen wichtigen Substrattransporter handeln könnte.^[41] Dieses Beispiel demonstriert die Tücken, wenn man sich bei der Untersuchung unbekannter Reaktionen auf Annotationen auf Basis bereits be-



Schema 11. Vorgeschlagener Mechanismus für die Biosynthese von Paspalin (**38**), bestehend aus stufenweisen Epoxidierungen und Cyclisierungen, die von PaxB katalysiert werden.^[40]

kannter Enzymreaktionen und Proteinfunktionen verlässt, und soll dazu ermutigen, ab und zu quer zu denken.

2.1.4. Konvergente Evolution von Bergamoten-Synthasen

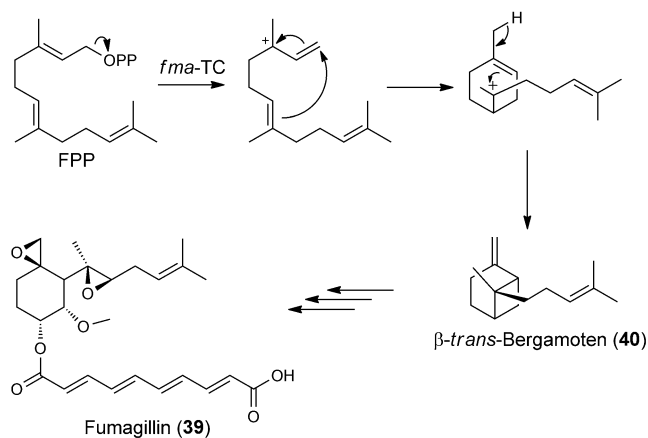
Ein weiterer Fall, bei dem eine Homologiesuche keine augenscheinliche TC offenbarte, ist die Biosynthese von Fumagillin (**39**). Da ein TC-Gen-Homologes im gesamten Genom von *A. fumigatus* Af293 fehlte, war es viele Jahre lang nicht möglich, den Biosynthesegencluster zu identifizieren.^[42] Anfänglich schlossen Lin et al., dass der Gencluster eine nichtkanonische TC enthält, da der Terpen-abgeleitete Teil von Fumagillin sehr wahrscheinlich vom Sesquiterpen β -trans-Bergamoten (**40**) abstammt, dessen Bildung eine TC benötigt.^[42] Aus diesem Grund wurden andere Strukturmerkmale von Fumagillin (**39**) in die Suche nach dem Biosynthesegencluster einbezogen, wie die Dicarbonsäure und verschiedene Oxidationen, was zu einem Gencluster führte, der *fma* genannt wurde. Die Identität des Clusters wurde mit genetischen und biochemischen Methoden nachgewiesen. Mit dem *fma*-Gencluster in Händen wurden die umliegenden Gene genauer unter die Lupe genommen. Aufmerksamkeit erregte dabei das vorausgesagte Genprodukt Af520 (genannt *fma*-TC), das wahrscheinlich aus sechs membrandurchspannenden Helices besteht und eine PFAM01040-UbiA-Prenyl-

transferase(*p*-Hydroxybenzoesäure-Oligoprenyltransferase)-Domäne enthält, da die UbiA-Prenyltransferase von *E. coli* strukturell ähnlich zu TCs der Klasse I ist. In-vitro-Studien mit Mikrosomen, die *fma*-TCs enthielten, belegten eindeutig, dass dieses Enzym eine neuartige membrangebundene TC ist, die FPP in das bicyclische Terpen **40** umwandeln kann (Schema 12). Diese Reaktion hängt strikt von Mg^{2+} ab, was dafür spricht, dass der Katalysemechanismus von *fma*-TC dem von TCs der Klasse I ähnelt, die in einer Metallcluster-abhängigen Ionisierung des Allyl-Diphosphates das Allylkation erzeugen.^[42] Bemerkenswerterweise produzieren Pflanzen verschiedene Bergamotene mithilfe löslicher TCs;^[43] deshalb ist *fma*-TC ein perfektes Beispiel für die konvergente Evolution von anscheinend nicht verwandten Enzymen, die ähnliche Produkte synthetisieren.^[42]

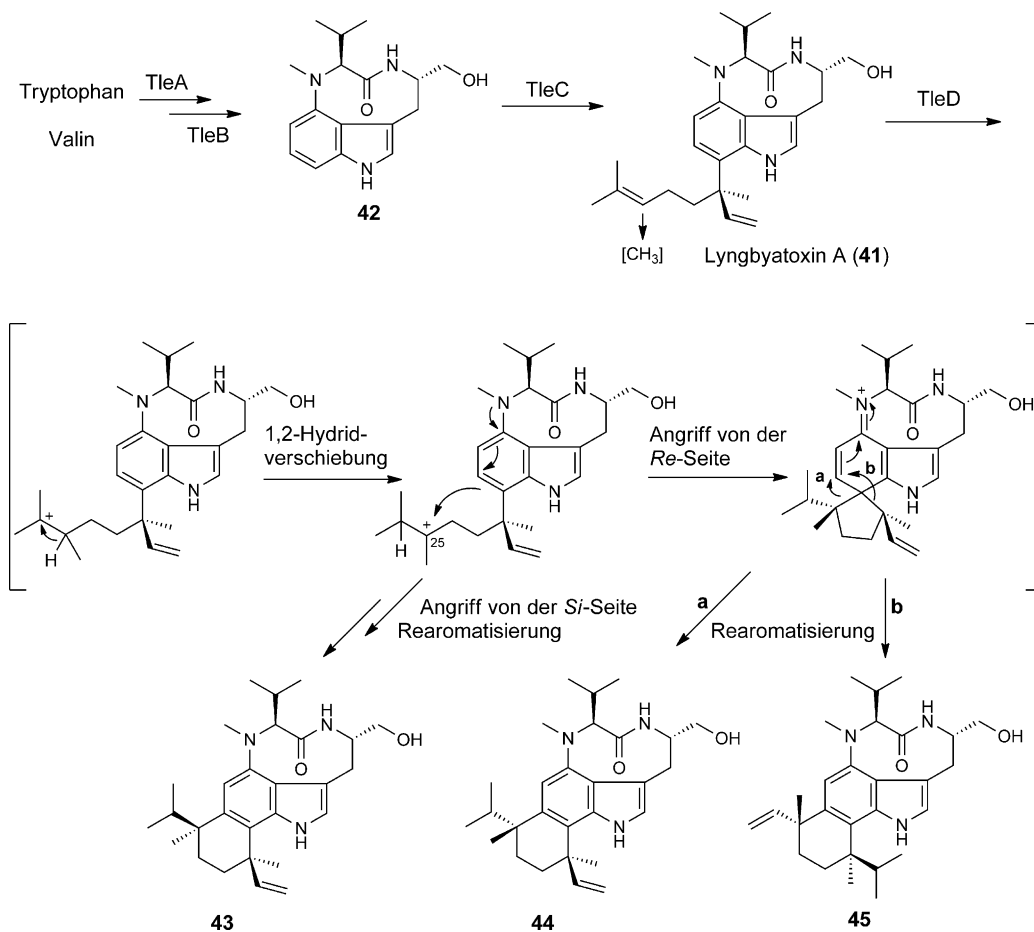
2.1.5. Von einer Methyltransferase vermittelte Terpenoidcyclisierung

Eine völlig neuartige Cyclisierungsreaktion wurde bei der Biosynthese des Proteinkinase-C-Inhibitors Teleocidin B entdeckt. Awakawa et al. versuchten, die späten Stufen der Teleocidin-Biosynthese aufzuklären, welche die Bildung eines sechsgliedrigen Rings einschließen, der mit einem Indol verbunden ist.^[44] Zu dieser Zeit war bereits bekannt, dass die Biosynthesemaschinerie von Lyngbyatoxin A (**41**), das strukturell mit Teleocidin B verwandt ist, eine nichtribosomale Peptidsynthetase (LtxA) und eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (LtxB) enthält, die gemeinsam L-Valin und L-Tryptophan in (–)-Indolactam V (**42**) umwandeln. Der Indolring von **42** wird im Anschluss weiter mit einem Geranylrest versehen, katalysiert von einer aromatischen Prenyltransferase (LtxC). Dieser Schritt führt zur Bildung von **41**, das auf der Grundlage von Fütterungsexperimenten als Vorstufe von Teleocidin B vorgeschlagen wurde.^[45] Im Unterschied zu Teleocidin B deutet die Struktur von **41** auf fehlende Methylierung und Cyclisierung des Geranylrestes hin. Durch eine

Homologiesuche konnten die Autoren einen Biosynthesegencluster (*tle*) im Genom des Teleocidinproduzenten identifizieren, der dem *ltx*-Biosynthesegencluster ähnelt, und dessen Rolle in der Biosynthese von **41** durch heterologe Expression nachweisen. Da keine Gene für C-Methyltrans-



Schema 12. Vorgeschlagener Mechanismus für die Cyclisierung von Farnesyl diphosphat (FPP) zu β -trans-Bergamoten (**40**), einem Ausgangsprodukt von Fumagillin (**39**), katalysiert von der kryptischen Terpen-Cyclase *fma*-TC.^[42]



Schema 13. Vorgeschlagene Biosynthese von Teleocidin B-1 (**43**), Teleocidin B-4 (**44**) und Des-O-Methylolivoretin C (**45**) durch die C-Methyltransferase TleD ausgehend von Lyngbyatoxin A (**41**). Details siehe Text.^[44]

ferasen oder Terpen-Cyclasen in Nachbarschaft zum *lte*-Biosynthesegencluster gefunden werden konnten, begannen die Autoren mit der Koexpression von sechs Methyltransferase-Gen-Kandidaten zusammen mit den *lte*-Biosynthesegenen im heterologen Wirt, der **41** produziert. Die Transformante, die das Gen der C-Methyltransferase *tleD* trägt, produzierte drei neue Verbindungen, die als Teleocidin B-1 (**43**), Teleocidin B-4 (**44**) und Des-O-Methylolivoretin C (**45**) identifiziert werden konnten (Schema 13). In-vitro-Analyse von TleD mit **41** als Substrat bestätigte dessen Beteiligung an der Biosynthese von **43–45** und belegte, dass eine Methyltransferase ausreicht, um den Geranylrest von **41** zu methylieren und anschließend zu cyclisieren. Die Autoren schlugen vor, dass TleD die weiterführende Cyclisierung von **41** durch das Einbringen einer Methylgruppe am Geranylrest einleitet, was die Bildung einer Kationspezies zur Folge hat. Nach einer 1,2-Hydridverschiebung kann das entstehende tertiäre Carbokation nukleophil durch den elektronenreichen Indolring angegriffen werden, was zur Bildung eines spiroverknüpften Intermediats führt. Dieser Schritt kontrolliert daher die Konfiguration an C-25 durch die Bildung des Spirorings nach Angriff von der *Re*- oder der *Si*-Seite. Zwei verschiedene C-C-Bindungen dieses Intermediats können daraufhin wandern, was zur Bildung der Grundgerüste von **44** und **45** führt. Dieser Vorgang wird durch die Rearomatisierung des Indolrings angetrieben.^[44] Die Autoren ziehen eine Parallele zu TCs der Klasse I, auch wenn der Mechanismus tatsächlich mehr an TCs der Klasse II erinnert, die vor der Cyclisierung eine terminale Doppelbindung aktivieren, mit dem Unterschied, dass die Erzeugung des Carbokation-Intermediates durch Methylierung anstelle einer Protonierung geschieht und dass eine 1,2-Hydridverschiebung auftritt.

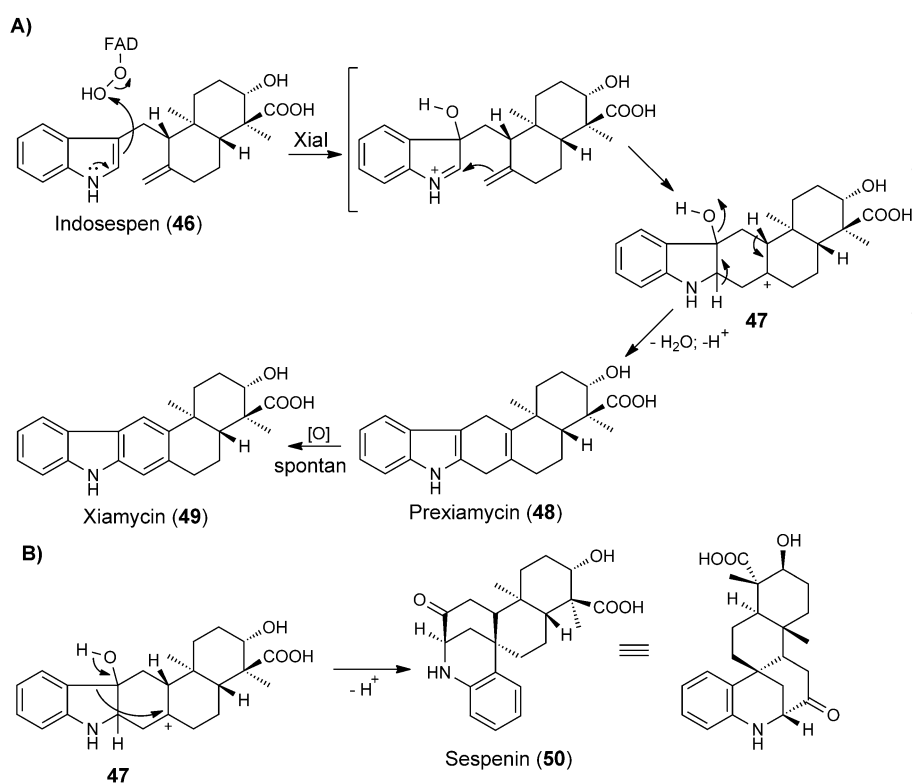
2.2. Terpenoidcyclisierungen durch neuartige Cyclisierungsmechanismen

2.2.1. Von einer Flavin-Monooxygenase katalysierte Meroterpen-cyclisierungen

Alle TCs, die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellt wurden (mit Ausnahme der V-CIPO Mcl24), katalysieren Reaktionen, die an TCs der Klasse I oder II erinnern, obgleich sie sich in ihren Proteinstrukturen stark von diesen unterscheiden. Es scheint jedoch, dass die Natur zusätzlich zur Wiederverwendung bewährter Cyclisierungsmechanismen auch weitere Strategien entwickelt hat, um Terpene zu cyclisieren. Dies wird in einigen nennenswerten Berichten über

Terpenoidcyclisierungen angedeutet, die von Oxidasen katalysiert werden. Ein interessanter Cyclisierungsschritt ist z. B. die weiterführende Cyclisierung des Decalin-Ringsystems von Indospen (**46**) zum Ringsystem von Xiamycin in der Biosynthese von Indolesquiterpenen (Schema 14A), katalysiert von einer Flavin-abhängigen Oxidase. Für diese Reaktionsstufe wurde eine kryptische Hydroxylierung vorgeschlagen, die den Grundstein für eine Anellierung legt, die zur Bildung des intermediären Carbeniums **47** führt, das über Deprotonierung, Verlust eines Äquivalents Wasser und Aromatisierung zum Ringsystem von Xiamycin weiterreagiert.^[38b] Dieses Modell wurde durch die Tatsache untermauert, dass Deletion von *xiaF*, einem Gen, das für eine als Indoloxigenase annotierte Flavin-abhängige Oxidase kodiert, das Ausbleiben der Xiamycinproduktion zur Folge hatte.^[39] Eine unabhängige In-vitro-Studie, die ein XiaF-Homologes (XiaI; 99 % Identität) aus einem marinen Streptomyceten untersuchte, der auch Xiamycin produzierte, wies die Umwandlung von Indospen (**46**) zu Prexiamycin (**48**) nach, das spontan zu Xiamycin (**49**) oxidiert (Schema 14A).^[46]

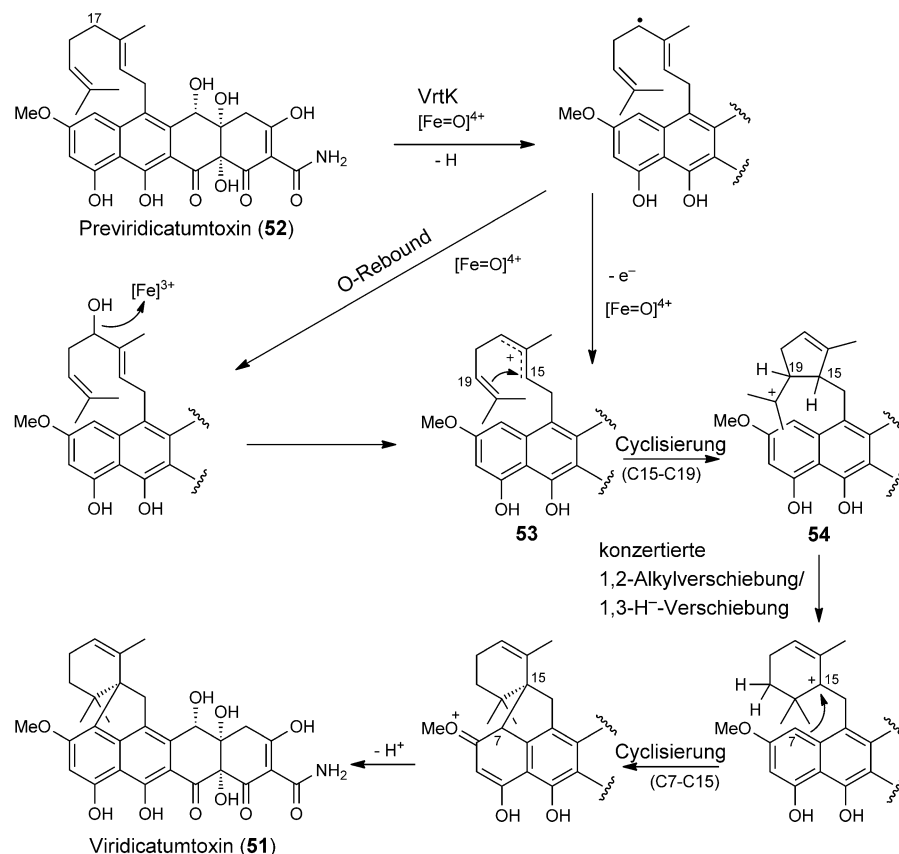
Für die Biosynthese des verwandten Indolesquiterpens Sespenin (**50**), das zusammen mit Xiamycin und Indospen isoliert wurde, wurde ein ähnlicher Biosyntheseweg vorgeschlagen, bei dem das hydroxylierte Carbenium **47** als gemeinsames Intermediat auftritt und eine Umlagerung zum pentacyclischen Ringsystem mit einem zentralen quartären Kohlenstoffatom eingeht (Schema 14B).^[38b,39]



Schema 14. Vorgeschlagener Mechanismus für die weiterführende Cyclisierung von Indospen (**46**) zu Prexiamycin (**48**) über eine kryptische Hydroxylierung, katalysiert von der Flavin-abhängigen Monooxygenase XiaI.^[46] Vorgeschlagener Cyclisierungsweg in der Biosynthese von Sespenin (**50**).^[38b,39]

2.2.2. Von einem Cytochrom P450 katalysierte Meroterpencyclisierung

Eine kryptische Hydroxylierung, die die Cyclisierung einer Prenylseitenkette auslöst, wird auch für die Biosynthese des Tetracyclin-artigen pilzlichen Meroterpenoids Viridicatumtoxin (**51**) vorgeschlagen. Hier konnte in vivo gezeigt werden, dass das Cytochrom P450 VrtK die Umwandlung des acyclischen Previridicatumtoxins (**52**) zu **51** katalysiert (Schema 15).^[47] Um die Cyclisierung einzuleiten, wurde eine



Schema 15. Vorgeschlagener Mechanismus für die Cyclisierung von Previridicatumtoxin (**52**) zu Viridicatumtoxin (**51**), katalysiert vom Cytochrom P450 VrtK. Details siehe Text.^[47]

C17-Hydroxylierung von **52** über einen Wasserstoff-Abstraktions-/Sauerstoff-Rebound-Mechanismus vorgeschlagen, gefolgt von einer Dehydratisierung, um das intermediäre Allylkation **53** zu bilden. Da in Biotransformationsassays allerdings kein C17-hydroxyliertes Intermediat gefunden werden konnte, wurde alternativ eine Wasserstoffabstraktion von **52** zu einem Kohlenstoffradikal vorgeschlagen, gefolgt von einem Elektronentransfer auf das Eisen-Hämzentrum, was ebenfalls zur Bildung des Allylkations **53** führt. Die vorgeschlagene Entstehung von **53** bildet die Grundlage für nachfolgende Cyclisierungen. Gestützt durch Isotopenmarkierung mit [¹³C,²H]-markierten Mevalonaten und quantenchemische Modellierung schlugen Chooi et al. die Bildung eines tertiären Carbokation-Intermediates **54** über einen C15-C19-Ringschluss vor, das eine Ringerweiterung über eine

konzertierte 1,2-Alkylverschiebung/1,3-Hydridverschiebung erfährt, gefolgt von einem Angriff von C7 auf C15, um das spirocyclische Ringsystem von **51** zu bilden (Schema 15).^[47]

1962 mutmaßte Breslow,^[48] dass ein Reaktionsweg mit einem freien Radikal für die Polycyclisierung von Squalen in der Biosynthese von Sterolen verantwortlich sein könnte, was die erfolgreiche Nutzung von radikalischen Reaktionswegen in der Synthese von polycyclischen Terpenoiden vorantrieb.^[48] Später wurde jedoch Oxidosqualen als biosynthetisches Intermediat nachgewiesen, und der heutzutage weithin

akzeptierte, auf Carbokationen basierende Mechanismus wurde vorgeschlagen. Dies veranlasste Breslow dazu, im Rückblick zu bekunden, dass seine Modellstudien „von beschränktem biochemischem Interesse“ seien.^[49] In Hinblick auf die neue TC VrtK, die die Cyclisierung des Terpenrestes in der Biosynthese von **51** wahrscheinlich über einen radikalischen Mechanismus katalysiert, scheint diese Schlussfolgerung voreilig zu sein. Auf alle Fälle sollten radikalische Synthesestrategien im Gedächtnis behalten werden, während man präparative Polycyclisierungen von Terpenen plant.

2.2.3. Oxidative Cyclisierung in der Biosynthese von Δ^1 -Tetrahydrocannabinolsäure

Alle bisher beschriebenen TCs, zusammen mit TCs der Klassen I und II, haben etwas gemeinsam: Alle von ihnen scheinen Chemie mit Carbokationen zu nutzen. Von dieser Perspektive aus ist es faszinierend, dass erst kürzlich eine Ausnahme von dieser Regel in einer Proteinstudie über die Cyclase in der Biosynthese von Δ^1 -Tetrahydrocannabinol (Δ^1 -THC) entdeckt wurde, dem maßgeblichen psycho-

aktiven Inhaltsstoff von *Cannabis sativa* L.^[50] Eine In-vitro-Studie von Taura et al. lieferte erste experimentelle Belege, dass Cannabigerolsäure (**55**) über eine oxidative Cyclisierung, die von dem Enzym THCS-Synthase katalysiert wird, in Δ^1 -Tetrahydrocannabinolsäure (Δ^1 -THCS, **56**) umgewandelt wird, die Vorstufe von Δ^1 -THC.^[51] Shoyama et al. klärten die Struktur dieses Flavoproteins mit einer Auflösung von 2.75 Å auf (Abbildung 2 A).^[52]

Gestützt durch Mutationsanalysen und die Kristallstruktur wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, in dem das N5-Atom des FAD-Kofaktors, der kovalent an His114 und Cys176 gebunden ist, mit einem Tyrosinrest (Tyr484) zusammenwirkt, um die Bildung eines reaktiven *o*-Chinonmethids aus **55** mithilfe einer Hydridübertragung zu katalysieren. Für His292 und Tyr417 (Abbildung 2 B) des aktiven

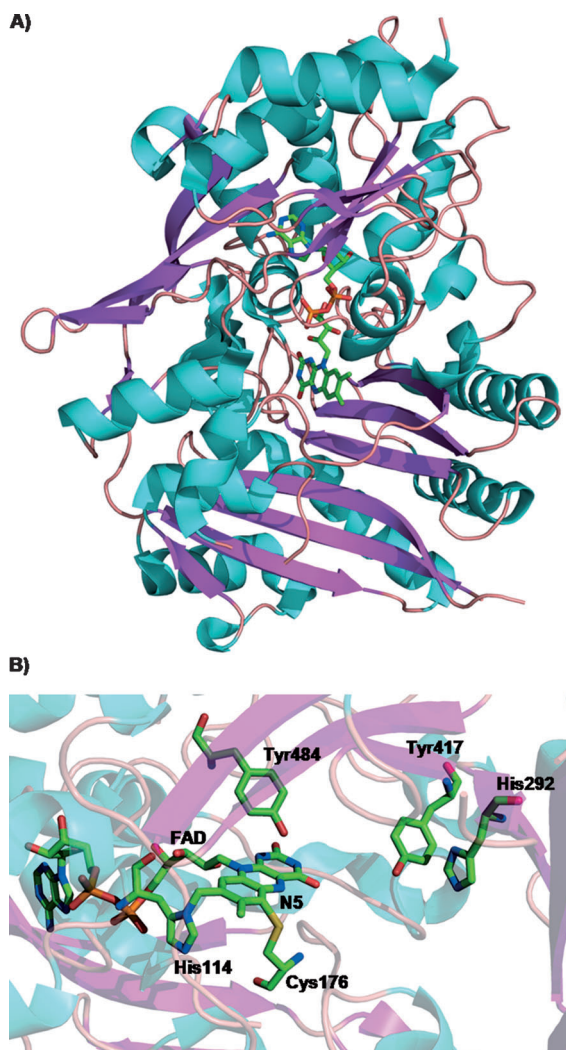


Abbildung 2. Struktur der Δ^1 -Tetrahydrocannabinolsäure-Synthase (THCS-Synthase; PDB-Code: 3VTE).^[52] A) Bändermodell der Gesamtstruktur der THCS-Synthase; α -Helices sind türkis eingefärbt, β -Faltblätter violett und Schleifen rosa. Der FAD-Kofaktor (C grün, N blau, O rot, P orange) ist als Stäbchenmodell abgebildet. B) Reste des aktiven Zentrums der THCS-Synthase als Stäbchenmodell (C grün, N blau, O rot, P orange, S gelb); der FAD-Kofaktor ist kovalent an His 114 und Cys 176 gebunden. Die Darstellung wurde mit PyMol erzeugt.^[22]

Zentrums wurde vorgeschlagen, dass sie an der Substratbindung beteiligt sind.^[52] Dieser Oxidationsschritt leitet eine Oxo-Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf ein (Schema 16).

2.2.4. Reduktive Cyclisierung in der Iridoid-Biosynthese

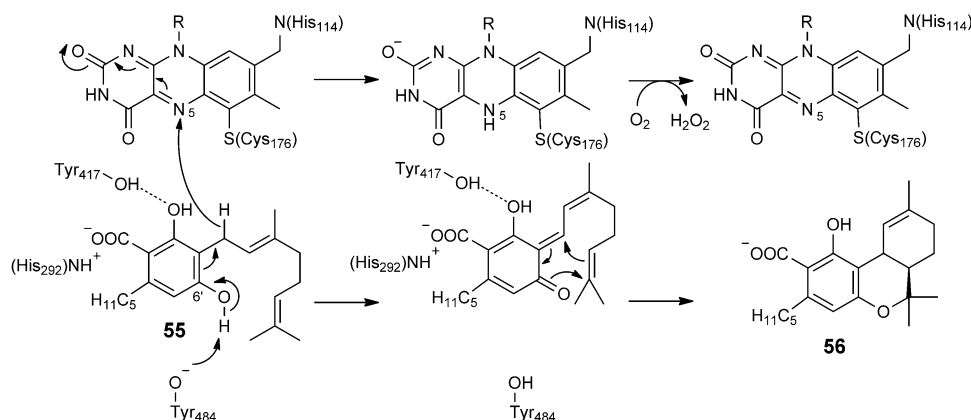
Der Cyclisierungsweg, der von der THCS-Synthase katalysiert wird, scheint sehr außergewöhnlich für TCs zu sein. Dennoch könnten ähnliche Cyclisierungsschemata in der Natur durchaus verbreiteter sein. Dies wird von einer Studie über die Iridoid-Synthase aus *Catharanthus roseus* angedeutet, die kurz nach jener zur THCS-Synthase erschien. Die Iridoid-Synthase katalysiert die Bildung des unverkennbaren Ringsystems der Iridoide, das aus einem Cyclopentanring

besteht, der mit einem Tetrahydropyranring verbunden ist.^[53] Vorangegangene Studien mit Pflanzenrohextrakt ließen darauf schließen, dass 10-Oxogeranial die direkte Vorstufe der Iridoide ist und in einem NADH/NADPH-abhängigen Schritt zu Nepetalactol umgewandelt wird.^[54] Um die Zahl an möglichen NAD(P)H-abhängigen Enzymen einzuschränken, führten Gue-Flores et al. eine Koexpressionsanalyse mit einem dem Cyclisierungsschritt vorangehenden Enzym (Geraniol-10-Hydroxylase) als Referenz durch. Das am höchsten eingestufte koregulierte NADPH-nutzende Enzym stellte sich als Progesteron-5 β -Reduktase (P5 β R) heraus, ein Enzym, das normalerweise die Reduktion einer C-C-Doppelbindung von Progesteron in der Cardenolid-Biosynthese katalysiert.^[55] In-vitro-Studien mit diesem Enzym führten in Gegenwart von entweder NADH oder NADPH zur Umwandlung von 10-Oxogeranial (**57**) in *cis-trans*-Nepetalactol (**58**), das mit seinen geöffneten Dialdehydformen (*cis-trans*-Iridodiale; **59a** und **59b**) im Gleichgewicht steht. Dieser Befund bestätigte die Rolle der Iridoid-Synthase bei der ungewöhnlichen reduktiven Cyclisierung von 10-Oxogeranial, für die ein zweistufiger Mechanismus vorgeschlagen wurde. Zu Beginn katalysiert das Enzym eine 1,4-Reduktion ähnlich jener, die für P5 β R vorgeschlagen wurde,^[56] was zur Bildung des Enolintermediats **60** führt. Dieses kann entweder über eine Oxo-Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf, die der vorgeschlagenen Reaktion in der Biosynthese von Δ^1 -THCS ähnelt, oder über eine intramolekulare Michael-Addition weiterreagieren (Schema 17A). Um aufzuklären, welcher der Reaktionswege der tatsächliche ist, wurden in einer Folgestudie die beiden Substratanaloga **61** und **62**, von denen jedes jeweils einen der beiden Reaktionswege benachteiligt, synthetisiert und für Enzymreaktionen eingesetzt (Schema 17B).^[57] Bemerkenswerterweise wurde nur das chlorierte Analogon **61** in einer S_N2'-Reaktion analog der vorgeschlagenen Michael-Addition cyclisiert, wohingegen bei **62** die Reaktion bereits nach dem anfänglichen Reduktionsschritt stoppte. Aus diesen Befunden folgerten die Autoren, dass das Enzym einem Michael-Reaktionsweg folgt.

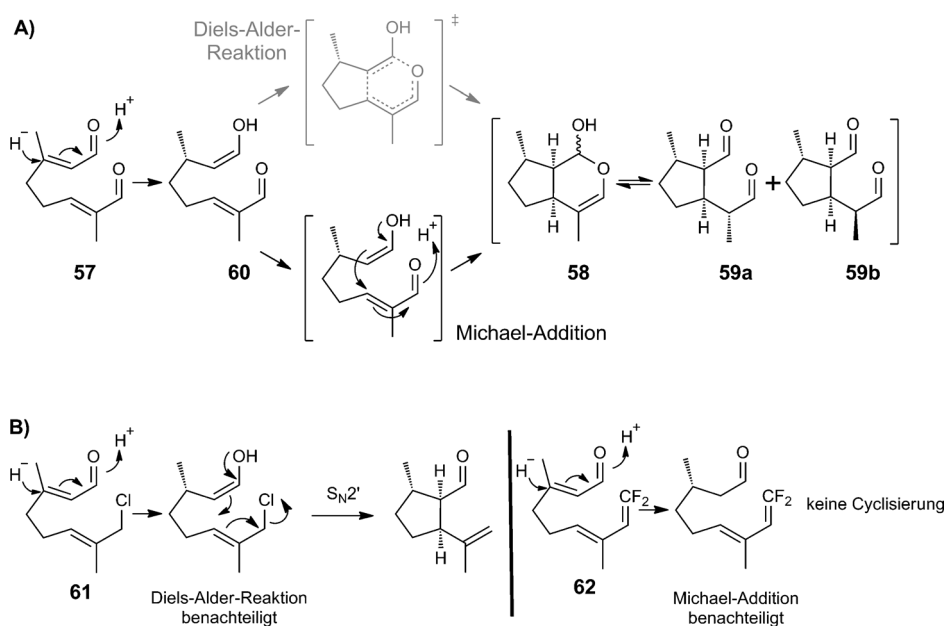
Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob es sich bei dem Mechanismus um ein weiteres allgemeines Schema bei Terpenoidcyclisierungen handeln könnte. Es ist zu betonen, dass die Bildung des reaktiven Intermediats in diesem Fall über eine Reduktion anstelle einer Oxidation, wie in der Biosynthese von Δ^1 -THCS, erreicht wird. Dieses Enzym sowie die THCS-Synthase sind herausragende Beispiele für den Einfallsreichtum der Natur bei der Biosynthese cyclisierter Terpene.^[53, 58]

2.3. Terpenoidcyclisierung ohne vorgeschlagenen Mechanismus

Um die Biosynthese von mono- und pentacyclischen C₃₅-Terpenen wie Tetraprenyl- β -Curcumen (**63**) und Baciterpenol A (**64**) von *Bacillus subtilis* (für die die Autoren den Begriff „Sesquarperene“ vorschlagen) aufzuklären, betrieben Sato et al. großen Aufwand, indem sie 2514 Gendelektionsmutanten von *B. subtilis* analysierten, die vom National Bio-Resource Project (NIG, Japan) bereitgestellt wurden.^[59] Dies



Scheme 16. Vorgeschlagener Mechanismus für die oxidative Cyclisierung von Cannabigerolsäure (**55**) zu Δ^1 -Tetrahydrocannabinolsäure (**56**), katalysiert durch das Enzym THCS-Synthase.^[52]



Scheme 17. Reduktive Cyclisierung von 10-Oxogeranial (**57**) in der Biosynthese der Iridoide. A) Ursprünglich vorgeschlagene Mechanismen der Cyclisierung von **57** durch Iridoid-Synthase zu *cis-trans*-Nepetalactol (**58**), das im Gleichgewicht mit den *cis-trans*-Iridodialen **59a** und **59b** steht.^[53] B) Weiterführende mechanistische Studien mit den Substratanaloga **61** und **62**. Nur Substrat **61**, das eine Diels-Alder-Reaktion stark benachteiligt, wird cyclisiert.^[57]

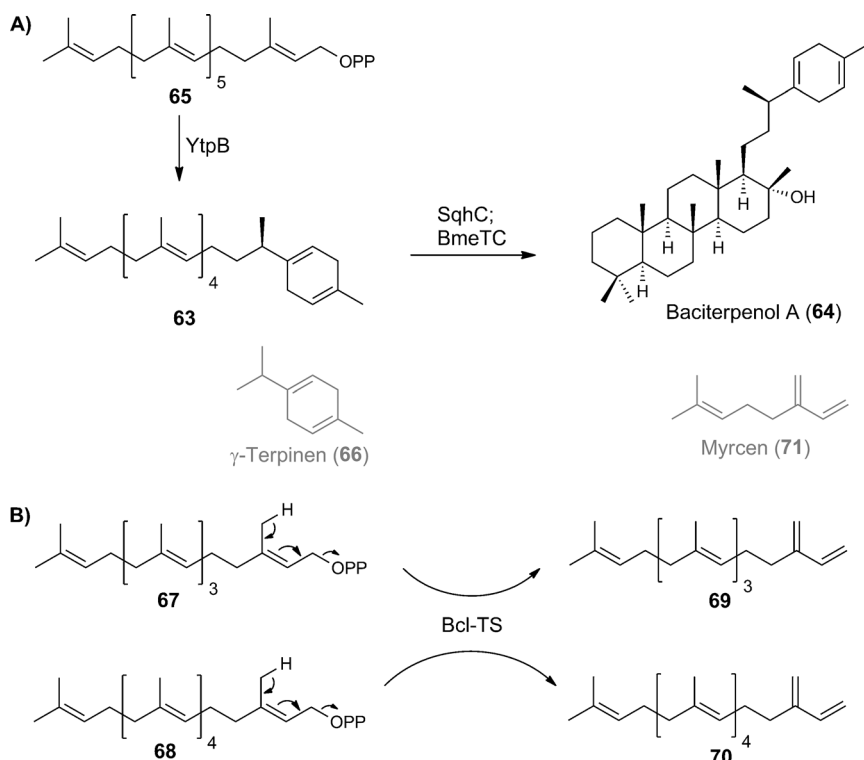
war nötig, da kein geeigneter Cyclasekandidat in der Nähe der Gene gefunden werden konnte, die für eine heterodimere Heptaprenyldiphosphat-Synthase kodieren, das Enzym, das den Biosyntheseweg mit der Terpenoidvorstufe Heptaprenyldiphosphat (**65**) versorgt. Das Screening berücksichtigte alle „funktionell unbekannten Proteine“ sowie „konservierte hypothetische Proteine“, die aus mehr als 180 bzw. 240 Aminosäuren bestanden und in den Genomen C_{35} -Terpen-produzierender Bakterien konserviert waren, nicht jedoch in Nicht-Produzenten derselben Gattung. Die Suche konnte auf 49 Stämme eingengt werden, und die Analyse deren Lipidfraktionen offenbarte, dass nur die Mutante mit einer Deletion des Gens *ytpB* nicht mehr in der Lage war,

monocyclische Sesquiterpene zu bilden. In-vitro-Studien mit aufgereinigtem YtpB bestätigten, dass es sich bei diesem Enzym um eine Tetraprenyl- β -Curcumen-Synthase handelt, die **65** in Tetraprenyl- β -Curcumen (**63**) umwandelt (Schema 18 A). Ein Mechanismus für diese Cyclisierung wurde nicht vorgeschlagen, da die Primärstruktur von YtpB keine Ähnlichkeit mit irgendeiner bereits bekannten TC hat.^[59] Allerdings erinnert das Ergebnis der Reaktion an die Cyclisierung von GPP zu γ -Terpinen (**66**; Schema 18),

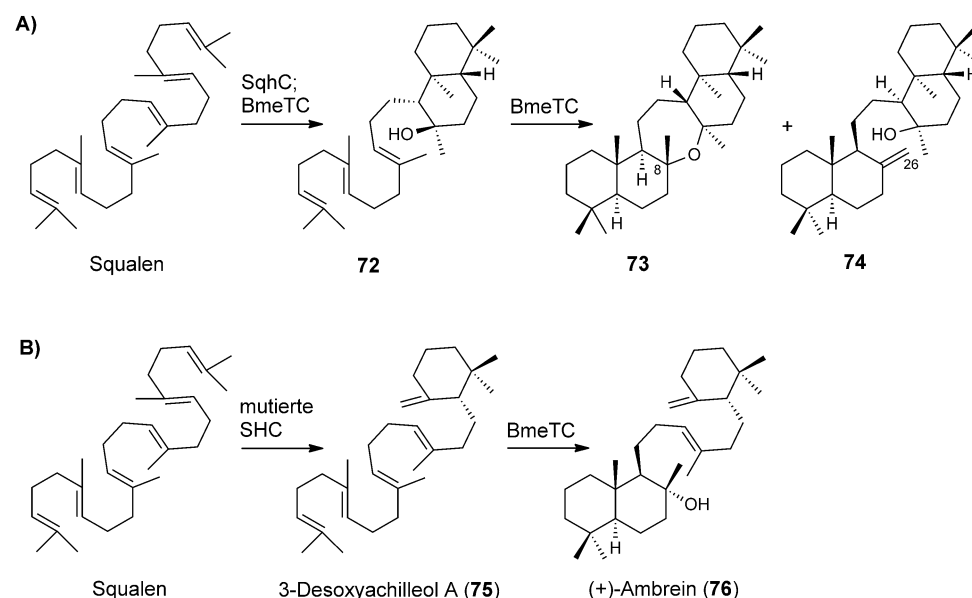
die von einer klassischen TC der Klasse I katalysiert wird,^[60] weshalb mechanistische Parallelen plausibel sind. Interessanterweise konnte für Bcl-TS, das Homologe der Tetraprenyl- β -Curcumen-Synthase von *B. clausii*, in vitro gezeigt werden, dass es die acyclische Umwandlung von Geranylarnesylidiphosphat (**67**) und Hexaprenyldiphosphat (**68**) zu β -Geranylarnesen (**69**) und β -Hexapren (**70**) katalysiert (Schema 18 B).^[61] Dieser Zusammenhang zeigt Analogie zu Enzymen mit Klasse-I-Terpenoid-Cyclase-Struktur, da Homologe von TCs der Klasse I auch die Umwandlung von Polyprenyldiphosphaten zu acyclischen Terpenen katalysieren, beispielsweise Myrcen (**71**; Schema 18), das von der Myrcen-Synthase gebildet wird.^[62] Weitere Enzymstudien werden voraussichtlich Aufschluss über den genauen Reaktionsmechanismus geben und

enthüllen, ob tatsächlich Parallelen zu den oben genannten Terpen-Synthasen bestehen. **63** wird daraufhin vom Enzym SqhC, das der Squalen-Hopen-Cyclase ähnelt, weiter zum pentacyclischen Grundgerüst von Baciterpenol A (**64**) cyclisiert.^[59]

Die evolutionäre Nähe zwischen SqhC und Squalen-Hopen-Cyclase inspirierte Sato et al. dazu, rekombinantes SqhC mit Squalen zu inkubieren, was zur Bildung des bicyclischen Triterpens **72** führte,^[63] eines Naturstoffs des Farns *Polypodium formosana*^[64] (Schema 19 A). Während die Autoren **72** nicht in vivo in *Bacillus subtilis* nachweisen konnten, wurden sie in *B. megaterium* fündig und belegten, dass das YtpB-Homologe Bcl-TS von *B. megaterium* außer zur Cycli-



Schema 18. Vorgeschlagene Biosynthesewege für A) die YtpB-katalysierte Umwandlung von Heptaprenyldiphosphat (**65**) in Tetraprenyl- β -Curcumen (**63**), das weiter zu Baciterpenol A (**64**) cyclisiert wird,^[59] sowie B) die Bcl-TS-katalysierte Umwandlung von Geranyl farnesyl diphosphat (**67**) und Hexaprenyldiphosphat (**68**) in β -Geranyl farnesene (**69**) und β -Hexaprene (**70**).^[61] γ -Terpinen (**66**) und Myrcen (**71**) werden zum Vergleich gezeigt.

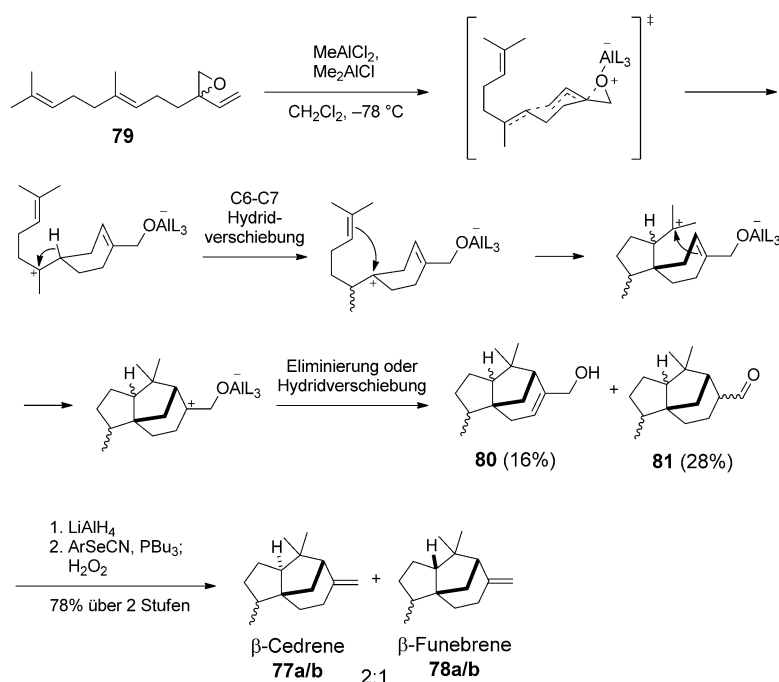


Schema 19. A) Cyclisierung von Squalen zu **72**, katalysiert von SqhC oder dessen Homologem BmeTC aus *B. megaterium*,^[63] das von BmeTC zu einem Onoceranoxid **73** sowie zum Triterpen **74** weitercyclisiert werden kann.^[65] Gewinnung von (+)-Ambrein (**76**) ausgehend von Squalen über das nichtnatürliche Triterpen 3-Desoxyachilleol A (**75**) mithilfe einer mutierten Squalen-Hopen-Cyclase und der Tetraprenyl- β -Curcumen-Cyclase BmeTC.

sierung von Tetraprenyl- β -Curcumen auch dazu in der Lage ist, **72** ausgehend von Squalen herzustellen (Schema 19 A).^[63] Darüber hinaus zeigten Ueda et al., dass **72** von demselben Enzym sowohl zu einem Onoceranoxid **73** cyclisiert werden kann,^[65] das ebenso bereits aus einem Farn isoliert wurde,^[66] als auch zu dem neuartigen Triterpen **74**.^[65] Bei BmeTC handelt es sich also um eine difunktionelle Triterpen-/Sesquarтерpen-Cyclase, die sowohl Tetraprenyl- β -Curcumen zu Baciterpenol A (**64**) umwandeln kann (Schema 18 A) als auch Squalen zu Onoceranoxiden über Cyclisierung von beiden Enden her (Schema 19 A). Da **73** und **74** auch in vivo in *B. megaterium* nachgewiesen werden konnten, handelt es sich bei beiden um Naturstoffe und damit um die ersten bakteriellen Onoceroide.^[65]

Der Mechanismus für die Cyclisierung von **63** zu **64** könnte durchaus analog zu dem der Squalen-Hopen-Cyclase ablaufen, wo eine terminale Doppelbindung protoniert wird, was eine Cyclisierungskaskade auslöst, die von einem Wassermolekül beendet wird. Für den Fall der Squalen-Hopen-Cyclase weiß man, dass die positive Ladung

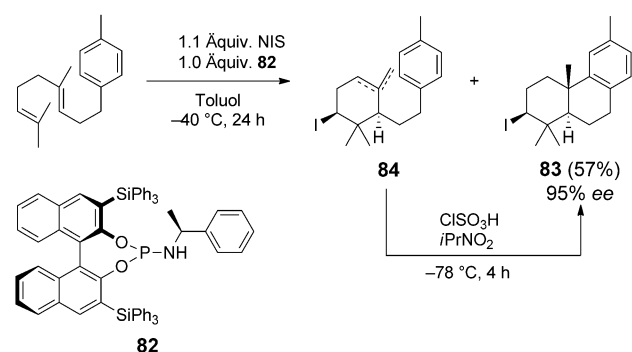
außer durch direkte Deprotonierung des polycyclischen Intermediates zu Hopen auch durch Addition von Wasser neutralisiert werden kann, was zur Bildung von Hopan führt.^[3c] Dennoch scheint die Cyclisierungsreaktion, die zu den Onoceranoxiden führt, außergewöhnlich zu sein. Die Autoren mutmaßen aus gutem Grund, dass Squalen zum bicyclischen Intermediat **72** cyclisiert wird, welches das aktive Zentrum verlässt, gedreht wird und ein zweites Mal vom aktiven Zentrum aufgenommen wird, um die Polycyclisierung der anderen Hemisphäre von **72** zu katalysieren. Die positive Ladung des entstehenden C8-Carbokations könnte dann entweder durch die nukleophile Addition der intramolekularen Hydroxygruppe (was zu **73** führt) oder durch die Deprotonierung von H-26



Schema 20. Schwanz-zu-Kopf-Cyclisierung von racemischem Vinylepoxid **79** mithilfe einer nichtdissoziierenden Lewis-Säure. Die starke Koordinierung der Lewis-Säure an den Alkohol ermöglicht die ungehinderte Ladungsausbreitung hin zu den tricyclischen Produkten **80** und **81**, die in die β -Cedrene (**77a/b**) und β -Funebrene (**78a/b**) umgewandelt werden können.^[7]

(was die Bildung von **74** zur Folge hätte) neutralisiert werden.^[65] Ein solches Szenario wäre beispiellos für Terpen-Cyclasen.

Abschließend wurde in derselben Studie noch die Promiskuität von BmeTC getestet. Dazu wurde überprüft, ob das Enzym dazu in der Lage ist, das nichtnatürliche, monocyclische Triterpen 3-Desoxyachilleol A (**75**) zu cyclisieren. Und in der Tat war BmeTC dazu in der Lage, die Cyclisierung von **75** auf gleiche Art und Weise wie die Cyclisierung von Squalen zu **72** katalysieren, was zur Bildung von (+)-Ambrein (**76**) führte, dem Hauptinhaltsstoff von Ambra. Dabei handelt



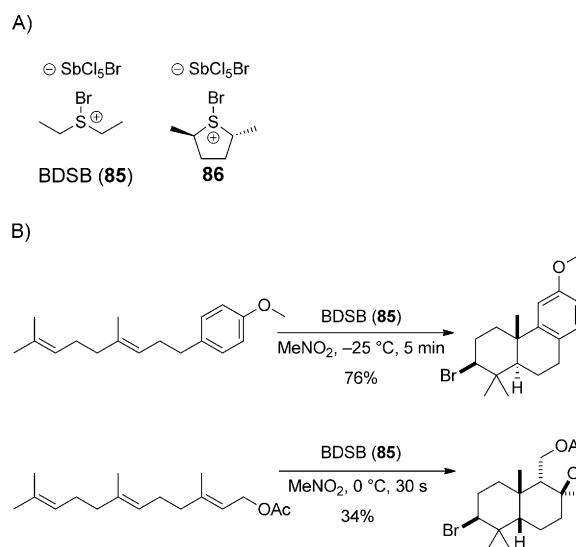
Schema 21. Enantioselektive Iodocyclisierung unter Verwendung von NIS und dem chiralen Phosphoramidit **82**. Das unerwünschte Olefin **84** kann mithilfe von ClSO_3H in das tricyclische Terpenoid **83** umgewandelt werden.^[76]

es sich um ein Sekret des Verdauungssystems von Pottwalen, einen der teuersten Parfümstoffe tierischen Ursprungs (Schema 19B). **75** wurde enzymatisch aus Squalen durch den Einsatz einer mutierten Squalen-Hopen-Cyclase von *Alicyclobacillus acidocaldarius* gewonnen. Diese enzymatische Synthesestrategie, durchgeführt mit zellfreien *E. coli*-Aufschlüssen, die das überexprimierte rekombinante Enzym enthielten, benötigte für die Bildung von (+)-Ambrein (**76**) aus Squalen nur zwei Stufen gegenüber den 19–35 Stufen der berichteten Totalsynthesen.^[65]

3. Neue biomimetische Syntheseansätze

Wegen der einzigartigen Fähigkeit, mehrere Ringe und Stereozentren gleichzeitig zu bilden, beeinflusste die Biosynthese von Terpenoiden die Synthesechemie seit der Pionierarbeit von Stork und Burgstahler sowie Eschenmoser et al. stark.^[49] Es gab mehrere erfolgreiche Versuche zur Nachahmung von Biosynthesewegen, bei denen verschiedene Agentien zum Auslösen von Cyclisierungen linearer Ausgangsverbindungen eingesetzt wurden, darunter Brønsted-Säuren, Lewis-Säuren, UV-Licht,^[67] Übergangsmetalle wie Ir,^[68] Pt^[69] und Au,^[70] aber auch exotischere Materialien wie Zeolithe^[71]

und Antikörper.^[72] Da die meisten dieser Methoden bereits gut etabliert und umfassend rezensiert sind,^[49,73] soll sich dieser Abschnitt mehr um die aktuelleren Entwicklungen auf dem Gebiet der Synthese drehen.



Schema 22. Evaluierung des neuen Bromierungsreagens BDSB (**85**).

A) Struktur von BDSB und des einfachen chiralen Derivats **86**.^[77] B) Beispiele für das Potenzial von BDSB für schnelle, milde und selektive Bromocyclisierungen.^[77]

Obwohl in der Natur bei Terpen-Cyclasen der Klassen I und II sowohl Schwanz-zu-Kopf- als auch Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierungen vorkommen, bevorzugen Chemiker deutlich Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierungen, da die Ladungsausbreitung bei Schwanz-zu-Kopf-Cyclisierungen in organischen Lösungsmitteln oft von E1- oder S_N1-Reaktionen gestoppt wird, bevor die gesamte Cyclisierung abgeschlossen ist.^[7] Erst kürzlich konnten Pronin und Shenvi zeigen, dass nichtdissoziierende Lewis-Säuren benötigt werden, um eine durchgängige Ladungsausbreitung zu erreichen^[7] – eine Strategie, die die präzise kontrollierte Platzierung von katalytischen Resten im aktiven Zentrum von Terpen-Cyclasen der Klasse II nachahmt. Dieses Konzept ermöglichte die Synthese einer Mischung von β -Cedrenen (**77a/b**) und β -Funebrenen (**78a/b**) ausgehend vom racemischen Vinylepoxid **79** (Schema 20).

Vinylepoxid **79** wurde in vier Stufen aus Geranyl bromid erhalten.^[7] Ein Screening verschiedener Lewis-Säuren für die Cyclisierungskaskade zeigte deutlich, dass Alkylaluminiumchloride die besten Resultate lieferten und ihr Einsatz dabei überwiegend zu den Cyclisierungsmustern der Cedrene und Funebrene führte. Das resultierende Kation wurde entweder durch Eliminierung zum Allylalkohol **80** oder durch eine Hydridverschiebung zum Aldehyd **81** gequenchet. **81** kann in zwei Stufen in ein 2:1-Gemisch von β -Cedrenen (**77a/b**) und β -Funebrenen (**78a/b**) umgewandelt werden. Diese Methode ermöglichte erstmals die Synthese eines Mitglieds der Funebren-Familie^[7] und demonstrierte, dass auch vernachlässigte Reaktionsstrategien großes Potenzial bergen, um komplizierte Grundgerüste präparativ zugänglich zu machen.

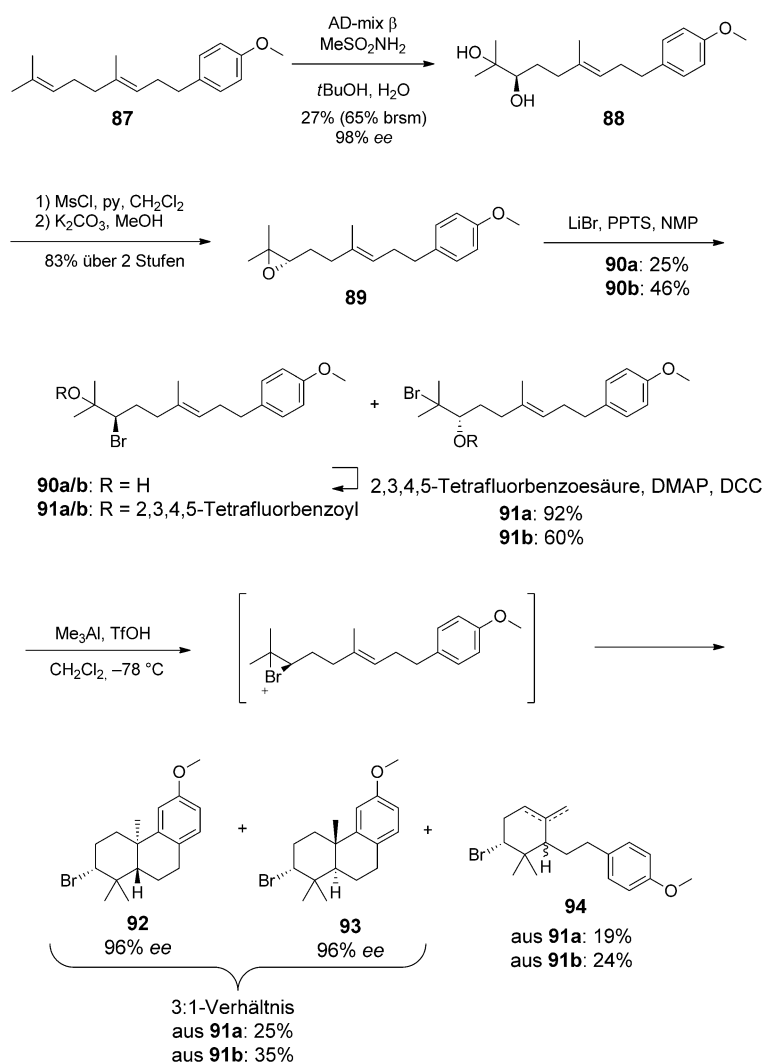
3.1. Durch Haloniumionen ausgelöste Cyclisierungen

Der Nutzen von Haloniumionen für Cyclisierungen ist bekannt, jedoch war ihre Anwendung lange wegen des Mangels an enantioselektiven Methoden beschränkt.^[74] Waren sie zur Mitte des letzten Jahrhunderts noch ein wichtiges Hilfsmittel, um relative Konfigurationen zu kontrollieren, wurden sie schnell von starken enantioselektiven Funktionalisierungen wie Epoxidierungen, Aziridierungen und Dihydroxylierungen übertroffen.^[74] Die Basis für enantioselektive und eventuell sogar katalytische Halogenierungen wird erst jetzt etabliert.^[74,75]

2007 berichteten Sakakura et al. erstmals über enantioselektive Halocyclisierungen eines Polyrenoids.^[76] Unter Verwendung von asymmetrischen Phosphoramiditen wie **82** als nukleophile Promotoren zusammen mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) gelang ihnen ein Enantiomerenüberschuss bis zu 95 % bei der Synthese des tricyclischen Terpenoids **83** (Schema 21).

Die Iodcyclisierung führt typischerweise zu unerwünschten *endo*- oder *exo*-Olefinen wie **84**

als Nebenprodukte in einem typischen Verhältnis von 3:7 für **84/83**. Diese Verbindungen entstehen durch ein verfrühtes Quenchen des Kations vor dem nukleophilen Angriff des aromatischen Systems. Glücklicherweise war es möglich, dieses Nebenprodukt mithilfe von ClSO₃H in das gewünschte tricyclische Terpenoid **83** umzuwandeln. Durch diese herausragenden Ergebnisse für enantioselektive Iodcyclisierungen angespornt, wendeten sich die Autoren Bromcyclisierungen zu. Auch wenn Versuche zur Verwendung von *N*-Bromsuccinimid als Halogenierungsmittel die erwarteten Produkte in guten Ausbeuten lieferten, fiel dabei der Enantiomerenüberschuss auf lediglich 36 %. Zusammengefasst bietet diese Methode einen vielversprechenden Startpunkt, es fehlen jedoch immer noch Beispiele für die Cyclisierung von elektronenarmen Polyrenoiden^[77] sowie für Anwendungen in der Totalsynthese von Naturstoffen.



Schema 23. Enantioselektive Bromcyclisierung durch das erste enantiomerenreine Bromoniumion. Das Bromoniumion wird in situ aus den Tetrafluorbenzoylestern **91a/b** gebildet, die zu demselben Bromoniumion reagieren.^[79] brsm = basierend auf zurückgewonnener Ausgangsverbindung, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, NMP = *N*-Methyl-2-pyrrolidon, PPTS = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat py = Pyridin, TfOH = Trifluormethansulfonsäure.

Da bromierte und chlorierte Naturstoffe iodidierte Naturstoffe zahlenmäßig deutlich übertreffen, ist es sehr wichtig, die bekannten Methoden auf andere Halogene auszuweiten. Neueste Veröffentlichungen setzten ihren Fokus auf die Entwicklung von Bromierungsreagentien wie Phosphit-Harnstoff-Derivate^[78] oder BDSB (**85**; Schema 22 A).^[77] BDSB, obgleich achiral, ermöglicht sehr milde, schnelle und selektive Kation- π -Cyclisierungen (Schema 22 B); der Nutzen dieser Verbindung konnte zusätzlich durch verschiedene racemische Totalsynthesen belegt werden.^[77] Um die fehlende Enantioselektivität anzugehen, wurde das einfache chirale Analogon **86** entwickelt, leider führten erste Experimente zu keinem Enantiomerenüberschuss.^[77] Zukünftige Untersuchungen müssen den genauen Reaktionsverlauf ermitteln, um das Potenzial eines asymmetrischen Ansatzes einzuschätzen.

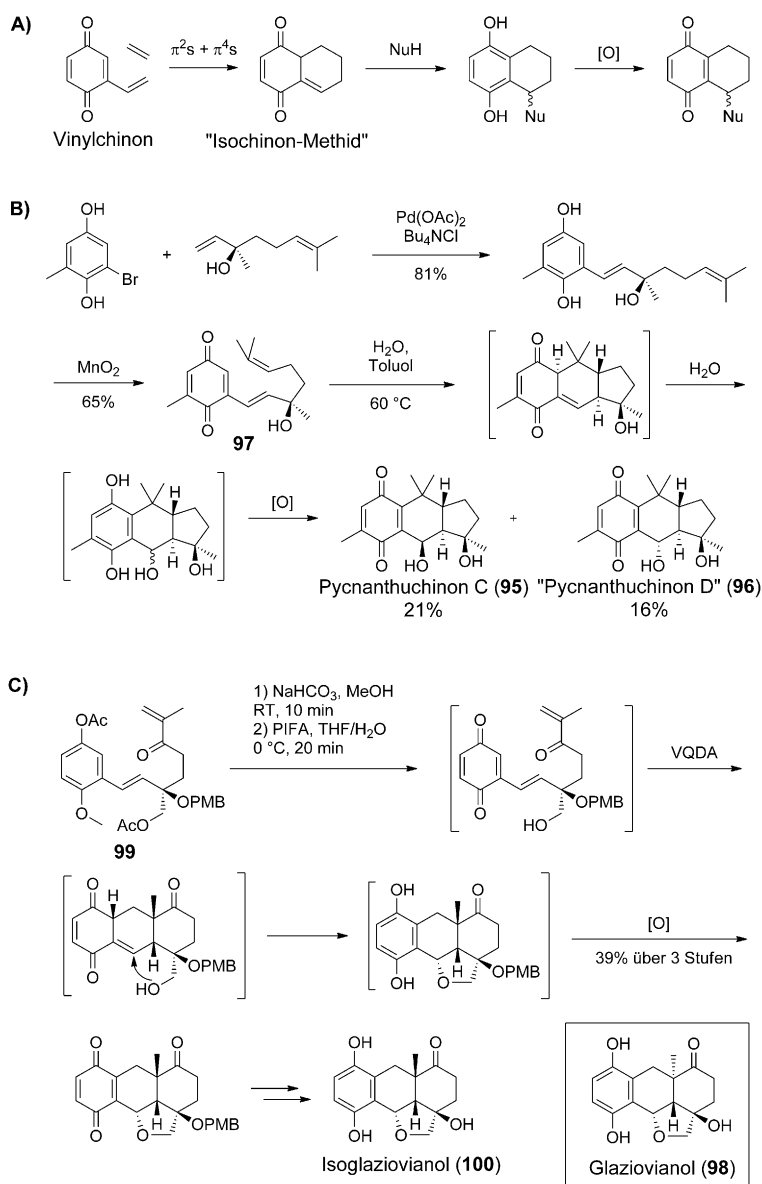
Braddock et al. verfolgten eine alternative Strategie ohne neu entwickelte Bromierungsreagentien, die schließlich zur ersten enantiospezifischen Polyencyclisierung mit einem enantiomerenreinen Bromoniumion führte.^[79] Ausgehend von Geranylderivat **87** wurde dabei die chirale Information mithilfe einer asymmetrischen Dihydroxylierung nach Sharpless unter Bildung des Diols **88** eingeführt, gefolgt von einer Interkonversion zum Epoxid **89** und einer Ringöffnung durch Lithiumbromid zu den isomeren Bromhydrinen **90a/b** (Schema 23). Nach Aktivierung mit Tetrafluorbenzoesäure konnten die Autoren die Vorstufen **91a/b** cyclisieren, indem sie Dimethylaluminiumtriflat nutzten, was zur Bildung einer Mischung der diastereomeren Terpene **92** und **93** führte. Zusätzlich wurde Olefin **94** als Nebenprodukt durch vorzeitiges Quenchen des Carbokations erhalten (wie in Schema 21 zu sehen). Aber was noch wichtiger war, beide Verbindungen zeigten Enantiomerenüberschüsse von 96 %, was das Potenzial dieser Methode unterstreicht. Allerdings verdeutlicht dieses Beispiel auch, dass es sehr schwierig ist, die Kontrolle über den Faltungsprozess außerhalb eines aktiven Zentrums eines Enzyms zu behalten, um die Bildung unerwünschter Diastereomere zu verhindern. In der Zukunft werden zusätzliche Fortschritte und exemplarische Anwendungen dieser Methode nötig sein, um ausreichenden Gebrauch von enantiomerenreinen Bromoniumionen zu machen.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass auch Methoden zur Fluorcyclisierung entwickelt und stetig verbessert werden,^[80] worauf jedoch wegen der Seltenheit von fluorierten Naturstoffen nicht weiter eingegangen wird.

3.2. Diels-Alder-Reaktionen von Vinylchinonen

Ein interessanter neuer Biosyntheseweg für die Cyclisierung von Chinon-Meroterpenoiden

wurde 2010 von Trauner und Mitarbeitern basierend auf retrosynthetischen Überlegungen vorgeschlagen – die Diels-Alder-Reaktion von Vinylchinonen (DAVQ; Schema 24 A).^[81] Der Vorschlag baut auf der Hypothese auf, dass Vinylchinone in Diels-Alder-Reaktionen als Diene mit Elektronenmangel auftreten können, die mit den elektronenreichen trisubstituierten Olefinen der Terpenseitenketten als Dienophile reagieren. Mit einer kurzen, schutzgruppenfreien Synthese von Pycnanthuchinon C (**95**) zusammen mit dem bisher unbekannten Diastereomer **96** konnten die Au-



Schema 24. Biomimetische Anwendungen der DAVQ-Reaktion für die Synthese von Chinon-Meroterpenoiden. A) Generelles Prinzip der DAVQ-Reaktion. Das intermediäre Isochinonmethid kann von Nukleophilen abgefangen werden. B) Biomimetische Synthese von Pycnanthuchinon C (**95**) über eine DAVQ-Reaktion von Vinylchinon **97**.^[81] Das Intermediat wird von H₂O abgefangen und oxidiert spontan zu Pycnanthuchinon C (**95**) sowie dem Diastereomer **96**. C) Versuch der biomimetischen Synthese von Glaziovianol (**98**).^[82] Überraschenderweise führte die DAVQ-Kaskade zur Bildung des isomeren Terpenoids Isoglaziovianol (**100**), das zuvor nicht bekannt war. PIFA = Phenyliod(III)-bis(trifluoracetat), PMB = *para*-Methoxybenzyl.

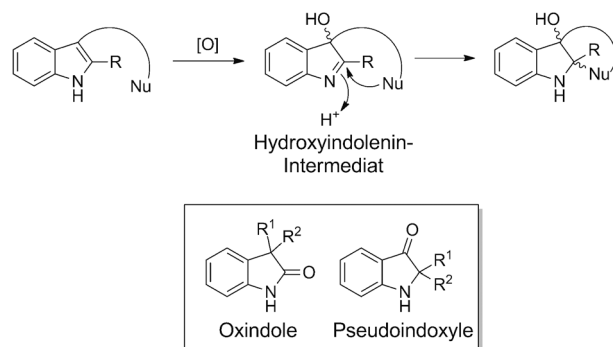
toren die Gültigkeit ihres Modells demonstrieren (Schema 24B).^[81] Besonders interessant ist, dass die DAVQ-Umwandlung des Schlüsselintermediats **97** auch in Citratpuffer bei Raumtemperatur erfolgt, wenn auch in sehr niedrigen Ausbeuten von 8 %. Da diese Beobachtung die Idee stützt, dass die DAVQ-Kaskade auch in der Natur abläuft, schlugen die Autoren vor, dass **96** wahrscheinlich auch in der Natur vorhanden ist und dementsprechend Pycnanthuchinon D genannt werden sollte.

Anschließend wendeten sich Trauner et al. der nah verwandten Glaziovianol-Familie zu.^[82] Glaziovianol (**98**) setzt sich aus einem zentralen 6-6-6-Ringsystem anstelle eines 6-6-5-Ringsystems wie bei den Pycnanthuchinonen zusammen. Die benötigte Vorstufe **99** wurde in drei Stufen aus bekannten Startmaterialien gewonnen. Nach Entschützung und Oxidation durchlief das resultierende Vinylchinon direkt eine DAVQ-Reaktion bei Raumtemperatur, bevor es isoliert werden konnte. Überraschenderweise stellte sich jedoch nach Abspaltung der PMB-Schutzgruppe und Reduktion zum Hydrochinon heraus, dass es sich beim erhaltenen Produkt wegen eines *endo*- statt eines *exo*-Übergangszustands während der Diels-Alder-Reaktion um das falsche Diastereomer (–)-Isoglaziovianol (**100**) handelt (Schema 24C). Versuche, dieses Problem zu lösen, waren erfolglos, und so bleiben offene Fragen, ob eine wahrscheinlich auftretende DAVQ-Kaskade in Biosynthesewegen spontan abläuft oder Enzymkatalyse benötigt. Es ist auch denkbar, dass Isoglaziovianol (**100**) tatsächlich ein Naturstoff ist, der spontan über photochemische Reaktionen zu Glaziovianol (**98**) epimerisiert.^[82] Zusätzliche Studien sind notwendig, um die biosynthetische Relevanz der DAVQ-Reaktion aufzuklären.

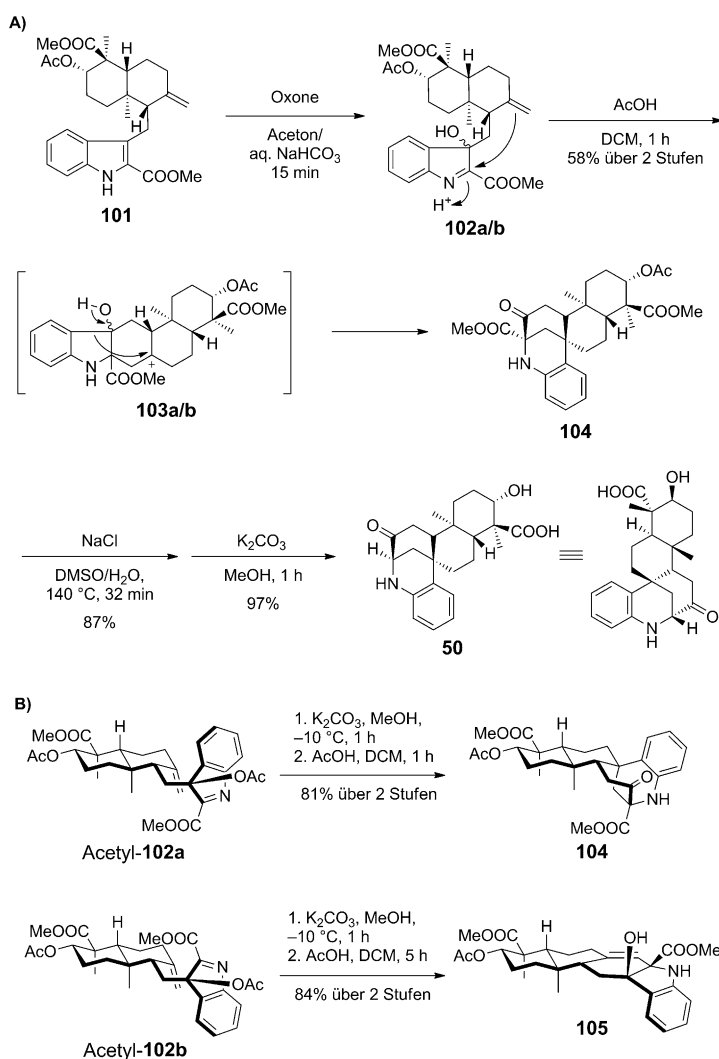
3.3. Oxidative Cyclisierung von Indolterpenoiden

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 besprochen können Indolterpencyclisierungen von Oxidationen des Indolringsystems ausgelöst werden, die ein intermediäres Hydroxyindolenin zur Folge haben, das von einem intramolekularen Nukleophil angegriffen werden kann (Schema 25). Dieses Intermediat ist sehr anfällig für pinakolartige Umlagerungen hin zu Oxindolen und Pseudooxindolen. Als solches ist es die gemeinsame biosynthetische Vorstufe von spirocyclischen prenylierten Diketopiperazinen.^[83]

Im Falle des Sespenins (**50**) handelt es sich beim Nukleophil für die oxidative Cyclisierung um die terminale Doppelbindung der Sesquiterpengruppe – formal eine Aza-Prins-Reaktion. Diese Überlegung wurde kürzlich für die erste Totalsynthese von Sespenin angewendet (Schema 26A).^[84] Erste Versuche mit verschiedenen Oxidationsmitteln zeigten, dass strikt biomimetische Bedingungen nur zu niedrigen Ausbeuten an Sespenin (<21 %) führten, da das Fehlen eines Substituenten an C2 des Indols die oxidative Spaltung des Pyrrolrings begünstigte. Wegen der konvergenten Syntheserouten konnte dieses Pro-



Schema 25. Oxidative Cyclisierung von Indolterpenen durch nukleophilen Angriff von intramolekularen Nukleophilen auf das Hydroxyindolenin-Intermediat. Alternativ oder zusätzlich werden pinakolartige Umlagerungen hin zu Oxindolen und Pseudooxindolen gefunden.

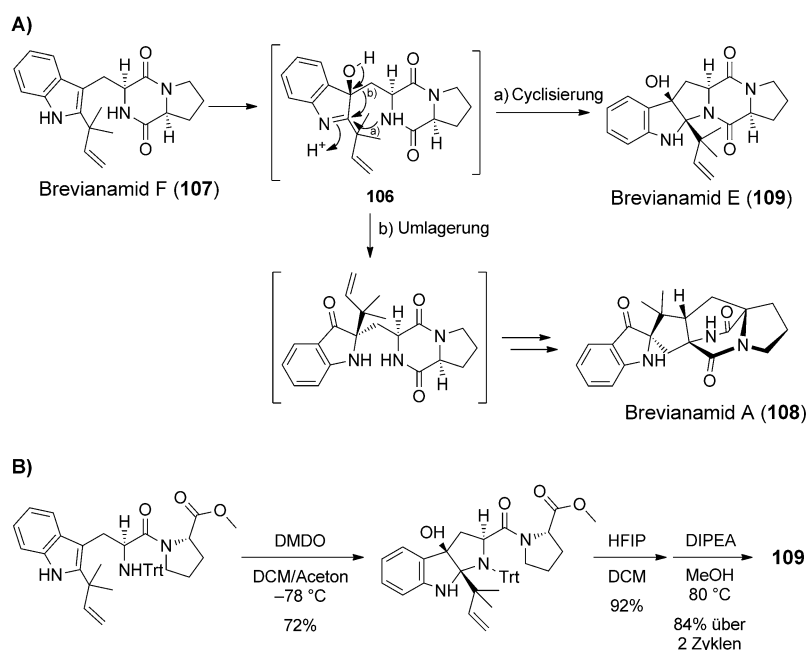


Schema 26. Bioinspired Synthese von Sespenin (**50**). A) Schlüsselreaktionen der säurekatalysierten oxidativen Cyclisierung. DCM = Dichlormethan. B) Unterschiedliche Reaktionsverläufe der epimeren Hydroxyindolenine Acetyl-**102a/b**. Das intermediäre Kation kann entweder durch eine pinakolartige Umlagerung zu **104** oder durch die einfache Eliminierung eines Protons zu **105** gequenchet werden.^[84]

blem durch die Verwendung des Methoxycarbonyl-substituierten Indolderivats **101** einfach behoben werden, das in zwölf Stufen erhalten wurde. Anschließend Oxidation mit Oxone führte zu einem untrennbaren Gemisch aus epimeren Hydroxyindoleninen **102a/b**. Dieses Gemisch wurde anschließend unter leicht sauren Bedingungen bei Raumtemperatur umgesetzt, um die Cyclisierungskaskade hin zu den pentacyclischen intermediären Kationen **103a/b** und nachfolgend zu dem geschützten Sespeninderivat **104** einzuleiten, das in zwei zusätzlichen Stufen problemlos in Sespenin (**50**) umgewandelt wurde. Obwohl die Hydroxyindolenine **102a/b** theoretisch zu Oxindolen und Pseudoindoxylen umgelagert werden können, wurden bemerkenswerterweise keine solchen Verbindungen gefunden.

Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus der Cyclisierung war es notwendig, die beiden Epimere **102a/b** zu trennen. Das gelang durch die Herstellung der Acetylderivate Acetyl-**102a/b**, gefolgt von HPLC-Aufreinigung. Interessanterweise zeigten beide Epimere unterschiedliche Cyclisierungsverläufe, sobald sie den Cyclisierungsbedingungen ausgesetzt waren. Nur Epimer Acetyl-**102a** konnte problemlos in das sespeninartig umgelagerte Produkt **104** umgewandelt werden. Dagegen trat im Falle von Acetyl-**102b** keine pinakolartige Umlagerung auf; das intermediäre Carbokation wurde einfach durch die Eliminierung eines Protons gequencht, was zur Bildung des Cyclohexenderivats **105** führte, das dem Kohlenstoffgrundgerüst von Prexiamycin (**48**) ähnelt (Schema 26B). Auf Grundlage dieser Beobachtung schlussfolgerten die Autoren, dass die biosynthetische Divergenz bei der Bildung von Xiamycin (**49**) und Sespenin (**50**) nicht willkürlich verläuft, sondern durch die Konfiguration des vorangehenden Hydroxyindolenins vordefiniert ist (Schema 14). Auf diese Weise gelang den Autoren nicht nur die erste Synthese von Sespenin und dadurch die Strukturbestätigung, sondern sie konnten darüber hinaus demonstrieren, wie organische Synthesechemie mithelfen kann, Biosynthesewege aufzuklären, selbst bis hin zu komplizierten stereochemischen Details. Zusätzlich unterstreicht dieses Beispiel einmal mehr, dass die Konfiguration für das Schicksal von Carbokationen eine entscheidende Rolle spielt und zur Bildung von komplett verschiedenen Grundgerüsten führen kann.

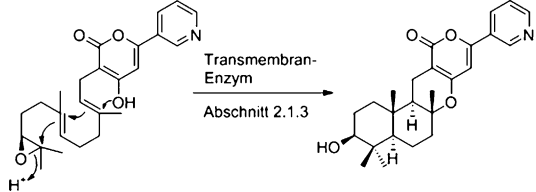
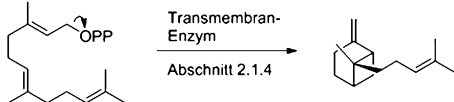
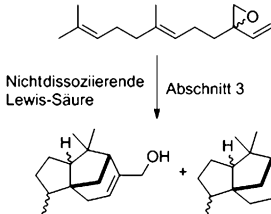
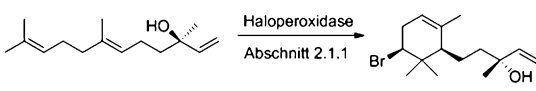
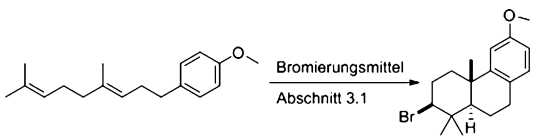
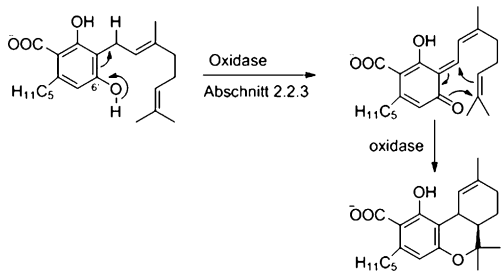
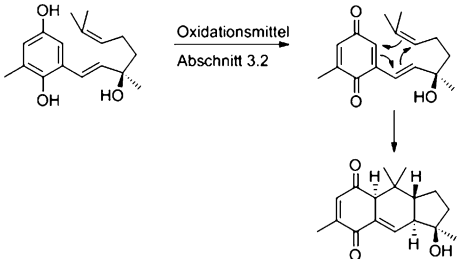
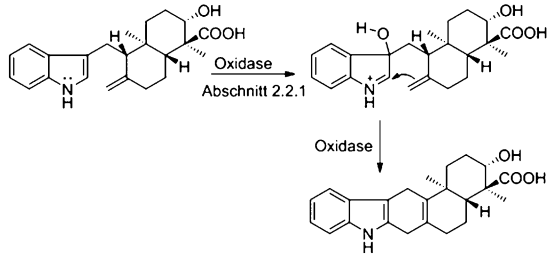
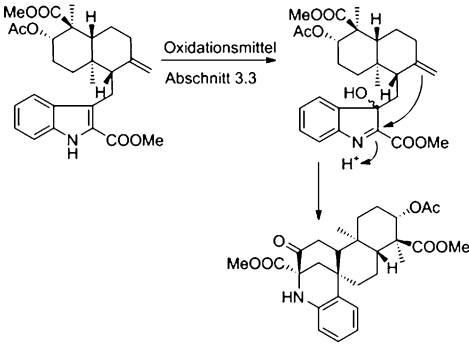
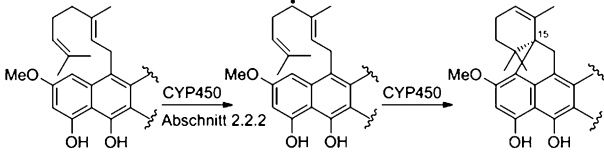
Ähnliche oxidative Biosynthesewege sind nicht nur von den Indolterpenen bekannt, sondern auch von prenylierten Indolalkaloiden. Ein Beispiel sind die Brevianamide, eine Gruppe von Diketopiperazinen aus *Penicillium brevicompactum*.^[85] Wie von Sanz-Cervera et al. vorgeschlagen, kann das zentrale Hydroxyindolenin-Intermediat **106**, das von Brevianamid F (**107**) abstammt, entweder eine pinakolartige Umlagerung ähnlich der Biosynthese des Sespenins durchlaufen, was zur Bildung von Brevianamid A (**108**) führt, oder



Schema 27. Oxidative Reaktionswege von prenylierten Indolalkaloiden der Brevianamidfamilie. A) Vorgeschlagener Biosyntheseweg, der sich bei Hydroxyindolenin **106** zu cyclischem Brevianamid E (**109**) oder zu Pseudoindoxyl Brevianamid A (**108**) teilt. B) Erste stereoselektive oxidative Cyclisierung zu Brevianamid E (**109**).^[85] DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, DMDO = Dimethyldioxiran, HFIP = Hexafluorpropan-2-ol, Trt = Triphenylmethyl.

von einem Stickstoffnukleophil abgefangen werden, was die Bildung von Brevianamid E (**109**) zur Folge hätte (Schema 27A).

Obwohl dieses Modell niemals biochemisch bestätigt wurde, wird es durch eine stereoselektive Synthese von Brevianamid E (**109**) untermauert, bei der Dimethyldioxiran als Oxidationsmittel verwendet wurde (Schema 27B).^[86] Weitere Unterstützung kommt von einer Studie zur Biosynthese der strukturell verwandten Notoamide, bei der gezeigt werden konnte, dass die FAD-abhängige Oxidase NotB die 2,3-Oxidation eines Indols katalysiert, was den Weg für einen N-C-Ringschluss des Epoxyindol-Intermediats bereitet.^[87] Und auch eine jüngste Synthesestudie zu den strukturell verwandten spirocyclischen Citrinalin- und Cyclopaminfamilien untersuchte unterschiedliche Möglichkeiten, um stereoselektive Indoloxidationen und regioselektive Umlagerungen zu erzielen.^[88] Diese Beispiele unterstreichen das breite Spektrum der oxidativen Chemie von Indolderivaten, bei der alle Arten von Nukleophilen genutzt werden können, um komplexe polycyclische Moleküle zu bilden. Es bleibt der Kreativität des Lesers überlassen, über Möglichkeiten nachzudenken, wie die in diesem Aufsatz präsentierten Cyclisierungsverläufe auf andere Nukleophile ausgeweitet werden können, um so das Gebiet der Bildung von Carbocyclen und Heterocyclen voranzubringen.

Reaktionstypen neuartiger Terpen-Cyclasen	Biomimetisches Äquivalent in chemischen Synthesen
<p>„Klassische“ Kopf-zu-Schwanz-Cyclisierungen</p> 	<p>Nicht Gegenstand dieses Reviews; Beispiele werden an anderer Stelle ausführlich rezensiert.^[49]</p>
<p>„Klassische“ Schwanz-zu-Kopf-Cyclisierungen</p> 	
<p>Cyclisierungen, ausgelöst durch Haloniumionen</p> 	
<p>Diels-Alder-Reaktionen</p> 	
<p>Cyclisierungen, ausgelöst durch Indoloxidation</p> 	
<p>Cyclisierungen, ausgelöst durch Radikalbildung</p> 	<p>Nicht Gegenstand dieses Reviews; Beispiele werden an anderer Stelle rezensiert.^[48-49]</p>

Schema 28. Reaktionstypen von neuartigen TCs, die bereits Anwendung in der Synthesechemie fanden. CYP450 = Cytochrom P450.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend scheint es, als wäre es Terpen-/Terpenoidcyclisierungen gemein, dass sehr verschiedene Enzyme auf vielfältige Art und Weise ähnliche reaktive Intermediate bilden, die anfällig für weiterführende Cyclisierungen sind. Wenn man sich diese Diversität vor Augen führt, kann man davon ausgehen, dass noch viele unbekannte TCs zu entdecken sind. Dennoch bergen auch die bereits entdeckten neuen TCs viele Chancen. Da beispielsweise Homologe von neuen TCs, etwa Pyr4, in vielen Meroterpen-Biosynthesegenclustern hoch konserviert codiert sind, könnten solche Enzyme zu wertvollen Markern für Genom-Mining werden, um neue Verbindungen zu finden. Auf der anderen Seite sollte ihre Entdeckung dazu ermuntern, nicht nur auf Homologiesuche zu bereits charakterisierten Enzymen zu vertrauen, sondern aktiv nach neuen TCs zu suchen, wenn keine offensichtlichen TC-Gene in Biosynthesegenclustern cyclisierter Terpene gefunden werden können. Eine große Herausforderung wird die weitere Untersuchung der genauen Reaktionsmechanismen der neuartigen TCs sein. Detaillierte mechanistische Einblicke könnten sich als sehr wertvoll in Bezug auf die Manipulation von Biosynthesewegen erweisen, um „nichtnatürliche“ Naturstoffe zu erschaffen. Da für konventionelle TCs der Klassen I und II gezeigt werden konnte, dass diese einfach durch das Verändern bestimmter Aminosäuren bezüglich ihres Resultats der Cyclisierungsreaktion beeinflusst werden können,^[89] könnte ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen neuartiger TCs ein wertvoller Schlüssel zu rationalem Design von Proteinen und Verbindungen sein. Zu guter Letzt ist ein besseres Verständnis der neuartigen TCs von großem Interesse in Bezug auf die evolutionäre Entwicklung dieser Enzyme. Die Homologie von Pyr4 und verwandten Cyclasen zu Transportern warf die Frage auf, ob diese Proteine auch an Transportprozessen beteiligt sind: Crawford und Clardy mutmaßten, dass diese MTCs eventuell als Effluxproteine arbeiten, während sie die Cyclisierung katalysieren.^[33b] Obwohl ein solches Szenario in Anbetracht der vielfältigen Modifizierungen, die sich der Cyclisierung anschließen und die sich sehr wahrscheinlich im Zellinneren abspielen, widersprüchlich zu sein scheint, sollten solche interessante Fragen in der Zukunft in den Fokus der Forschung genommen werden.

Aber nicht nur aus einem enzymatischen/biochemischen Blickwinkel sind die neuen TCs und ihre grundlegenden Mechanismen interessant. Auch für Syntheschemiker, die Strategien entwickeln wollen, um enzymkatalysierte Reaktionen nachzuahmen, bergen die neuartigen TCs großes Potenzial. Dies wird durch die besprochenen jüngsten biomimetischen Synthesen verdeutlicht, die in Schema 28 nochmals zusammengefasst werden. Diese bereits erfolgreich durchgeführten Synthesen sowie die einzigartigen Reaktionstypen der neuartigen TCs, wie die der Prenyltransferasen (Abschnitt 2.1.2.) oder Methyltransferasen (Abschnitt 2.1.5.), werden hoffentlich zu weiteren Durchbrüchen auf dem Gebiet der Synthese verhelfen.

Eingegangen am 2. August 2014

Online veröffentlicht am 8. Dezember 2014

- [1] E. M. Davis, R. Croteau, in *Topics in Current Chemistry*, Bd. 209 (Hrsg.: F. J. Leeper, J. C. Vederas), Springer, Berlin/Heidelberg, **2000**, S. 53–95.
- [2] Y. Gao, R. B. Honzatko, R. J. Peters, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1153–1175.
- [3] a) D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412–3442; b) D. W. Christianson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 141–150; c) G. Siedenburg, D. Jendrosseck, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3905–3915.
- [4] a) B. Greenhagen, J. Chappell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13479–13481; b) R. K. Allemann, *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 1791–1798.
- [5] K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure* **1998**, *6*, 127–133.
- [6] J. A. Aaron, D. W. Christianson, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1585–1597.
- [7] S. V. Pronin, R. A. Shenvi, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 915–920.
- [8] K. C. Wang, S. Ohnuma, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1529*, 33–48.
- [9] A. Saito, H. C. Rilling, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *208*, 508–511.
- [10] a) C. A. Lesburg, *Science* **1997**, *277*, 1820–1824; b) M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13543–13548.
- [11] C. D. Poulter, *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 17–26.
- [12] I. Prosser, A. L. Phillips, S. Gittings, M. J. Lewis, A. M. Hooper, J. A. Pickett, M. H. Beale, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 691–702.
- [13] K. U. Wendt, *Science* **1997**, *277*, 1811–1815.
- [14] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118–122.
- [15] a) G. Topcu, Z. Aydogmus, S. Imre, A. C. Goren, J. M. Pezzuto, J. A. Clement, D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1505–1508; b) D. J. Faulkner, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1992–1993.
- [16] a) J. D. Martin, J. M. Palazon, C. Perez, J. L. Ravelo, *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 395–406; b) D. J. Faulkner, *Pure Appl. Chem.* **1976**, *48*, 25–28.
- [17] a) J. N. Carter-Franklin, J. D. Parrish, R. A. Tschirret-Guth, R. D. Little, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3688–3689; b) J. N. Carter-Franklin, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15060–15066.
- [18] M. N. Isupov, A. R. Dalby, A. A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G. N. Murshudov, J. A. Littlechild, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1035–1049.
- [19] A. Butler, M. Sandy, *Nature* **2009**, *460*, 848–854.
- [20] a) W. Hemrika, R. Renirie, S. Macedo-Ribeiro, A. Messerschmidt, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23820–23827; b) J. M. Winter, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18577–18581.
- [21] a) D. A. Dougherty, *Science* **1996**, *271*, 163–168; b) C. A. Lesburg, J. M. Caruthers, C. M. Paschall, D. W. Christianson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 695–703.
- [22] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99rc6 Schrödinger, LLC.
- [23] J. M. Winter, M. C. Moffitt, E. Zazopoulos, J. B. McAlpine, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16362–16368.
- [24] P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyanaga, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4268–4270.
- [25] a) S. Diethelm, R. Teufel, L. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11023–11026; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11203–11206; b) L. Kaysser, P. Bernhardt, S. J. Nam, S. Loesgen, J. G. Ruby, P. Skewes-Cox, P. R. Jensen, W. Fenical, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11988–11991; c) R. Teufel, L. Kaysser, M. T. Villaume, S. Diethelm, M. K. Carbullido, P. S. Baran, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11019–11022; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11199–11202.

- [26] M. L. Hillwig, Q. Zhu, X. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 372–377.
- [27] A. Park, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3257–3260.
- [28] A. Raveh, S. Carmeli, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 196–201.
- [29] H. K. Erickson, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6886–6888.
- [30] H. V. Thulasiram, H. K. Erickson, C. D. Poulter, *Science* **2007**, *316*, 73–76.
- [31] T. Ozaki, P. Zhao, T. Shinada, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4837–4840.
- [32] M. Fujihashi, Y. W. Zhang, Y. Higuchi, X. Y. Li, T. Koyama, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4337–4342.
- [33] a) T. Itoh, K. Tokunaga, Y. Matsuda, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, T. Kushiro, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 858–864; b) J. M. Crawford, J. Clardy, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 805–807.
- [34] S. Saikia, M. J. Nicholson, C. Young, E. J. Parker, B. Scott, *Mycol. Res.* **2008**, *112*, 184–199.
- [35] T. Kawasaki, T. Kuzuyama, K. Furihata, N. Itoh, H. Seto, T. Daiiri, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 957–966.
- [36] Y. Matsuda, T. Awakawa, T. Itoh, T. Wakimoto, T. Kushiro, I. Fujii, Y. Ebizuka, I. Abe, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1738–1741.
- [37] Y. Matsuda, T. Awakawa, I. Abe, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8199–8204.
- [38] a) L. Ding, J. Munch, H. Goerls, A. Maier, H. H. Fiebig, W. H. Lin, C. Hertweck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6685–6687; b) L. Ding, A. Maier, H. H. Fiebig, W. H. Lin, C. Hertweck, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4029–4031; c) M. Baunach, L. Ding, T. Bruhn, G. Bringmann, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9040–9043; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9210–9213.
- [39] Z. Xu, M. Baunach, L. Ding, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10293–10297; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10439–10443.
- [40] K. Tagami, C. Liu, A. Minami, M. Noike, T. Isaka, S. Fueki, Y. Shichijo, H. Toshima, K. Gomi, T. Daiiri, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260–1263.
- [41] S. Saikia, E. J. Parker, A. Koulman, B. Scott, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1625–1630.
- [42] H. C. Lin, Y. H. Chooi, S. Dhingra, W. Xu, A. M. Calvo, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4616–4619.
- [43] a) C. Landmann, B. Fink, M. Festner, M. Dregus, K. H. Engel, W. Schwab, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *465*, 417–429; b) C. Sallaud, D. Rontein, S. Onillon, F. Jabes, P. Duffe, C. Giacalone, S. Thoraval, C. Escoffier, G. Herbet, N. Leonhardt, M. Causse, A. Tissier, *Plant Cell* **2009**, *21*, 301–317.
- [44] T. Awakawa, L. Zhang, T. Wakimoto, S. Hoshino, T. Mori, T. Ito, J. Ishikawa, M. E. Tanner, I. Abe, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9910–9913.
- [45] K. Irie, S. Kajiyama, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2773–2788.
- [46] H. Li, Q. Zhang, S. Li, Y. Zhu, G. Zhang, H. Zhang, X. Tian, S. Zhang, J. Ju, C. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8996–9005.
- [47] Y. H. Chooi, Y. J. Hong, R. A. Cacho, D. J. Tantillo, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16805–16808.
- [48] R. Breslow, E. Barrett, E. Mohacsi, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 1207–1211; J. Justicia, L. A. de Cienfuegos, A. G. Campana, D. Miguel, V. Jakoby, A. Gansauer, J. M. Cuerva, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3525–3537.
- [49] R. A. Yoder, J. N. Johnston, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4730–4756; G. Stork, A. W. Burgstahler, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5068–5077; A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1890–1904.
- [50] Y. Gaoni, R. Mechoulam, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1646–1647.
- [51] F. Taura, S. Morimoto, Y. Shoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9766–9767.
- [52] Y. Shoyama, T. Tamada, K. Kurihara, A. Takeuchi, F. Taura, S. Arai, M. Blaber, Y. Shoyama, S. Morimoto, R. Kuroki, *J. Mol. Biol.* **2012**, *423*, 96–105.
- [53] F. Geu-Flores, N. H. Sherden, V. Courdavault, V. Burlat, W. S. Glenn, C. Wu, E. Nims, Y. Cui, S. E. O'Connor, *Nature* **2012**, *492*, 138–142.
- [54] S. Uesato, H. Ikeda, T. Fujita, H. Inouye, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4431–4434.
- [55] I. Gavidia, R. Tarrio, F. Rodriguez-Trelles, P. Perez-Bermudez, H. U. Seitz, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 853–864.
- [56] A. Thorn, C. Egerer-Sieber, C. M. Jager, V. Herl, F. Muller-Uri, W. Kreis, Y. A. Muller, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17260–17269.
- [57] S. Lindner, F. Geu-Flores, S. Braese, N. Sherden, S. E. O'Connor, *Chem. Biol.* **2014**, DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.09.010.
- [58] J. Chappell, *Nature* **2012**, *492*, 50–51.
- [59] T. Sato, S. Yoshida, H. Hoshino, M. Tanno, M. Nakajima, T. Hoshino, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9734–9737.
- [60] J. Lucker, M. K. El Tamer, W. Schwab, F. W. A. Verstappen, L. H. W. van der Plas, H. J. Bouwmeester, H. A. Verhoeven, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3160–3171.
- [61] T. Sato, H. Yamaga, S. Kashima, Y. Murata, T. Shinada, C. Nakano, T. Hoshino, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 822–825.
- [62] J. Bohlmann, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21784–21792.
- [63] T. Sato, H. Hoshino, S. Yoshida, M. Nakajima, T. Hoshino, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17540–17543.
- [64] Y. Arai, M. Hirohara, H. Ageta, H. Y. Hsu, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1325–1328.
- [65] D. Ueda, T. Hoshino, T. Sato, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18335–18338.
- [66] H. Ageta, K. Shiojima, K. Masuda, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 2272–2274.
- [67] C. Heinemann, M. Demuth, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1129–1130.
- [68] O. F. Jeker, A. G. Kravina, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12166–12169; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12388–12391.
- [69] M. J. Geier, M. R. Gagné, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3032–3035.
- [70] J. Carreras, M. Livendahl, P. R. McGonigal, A. M. Echavarren, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4896–4899; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4996–4999.
- [71] C. Tsangarakis, E. Arkoudis, C. Raptis, M. Stratakis, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 583–586.
- [72] C. M. Paschall, J. Hasserodt, T. Jones, R. A. Lerner, K. D. Janda, D. W. Christianson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1743–1747; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1859–1864.
- [73] a) R. R. Naredla, D. A. Klumpp, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6905–6948; b) C. M. R. Volla, I. Atodiresi, M. Rueping, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2390–2431.
- [74] S. E. Denmark, W. E. Kuester, M. T. Burk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10938–10953; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11098–11113.
- [75] C. K. Tan, W. Z. Yu, Y.-Y. Yeung, *Chirality* **2014**, *26*, 328–343.
- [76] A. Sakakura, A. Ukai, K. Ishihara, *Nature* **2007**, *445*, 900–903.
- [77] S. A. Snyder, D. S. Treitler, A. P. Brucks, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14303–14314.
- [78] Y. Sawamura, H. Nakatsuji, M. Akakura, A. Sakakura, K. Ishihara, *Chirality* **2014**, *26*, 356–360.
- [79] D. C. Braddock, J. S. Marklew, K. M. Foote, A. J. P. White, *Chirality* **2013**, *25*, 692–700.
- [80] a) J. R. Wolstenhulme, J. Rosenqvist, O. Lozano, J. Ilupeju, N. Wurz, K. M. Engle, G. W. Pidgeon, P. R. Moore, G. Sandford, V. Gouverneur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9796–9800; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9978–9982; b) N. A. Cochrane, H. Nguyen, M. R. Gagne, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 628–631.
- [81] F. Löbermann, P. Mayer, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6199–6202; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6335–6338.

- [82] F. Löbermann, L. Weisheit, D. Trauner, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4324–4326.
- [83] A. D. Borthwick, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641–3716.
- [84] Y. Sun, P. Chen, D. Zhang, M. Baunach, C. Hertweck, A. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9012–9016; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 9158–9162.
- [85] J. F. Sanz-Cervera, T. Glinka, R. M. Williams, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8471–8482.
- [86] L. Zhao, J. P. May, J. Huang, D. M. Perrin, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 90–93.
- [87] S. Li, J. M. Finefield, J. D. Sunderhaus, T. J. McAfoos, R. M. Williams, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 788–791.
- [88] E. V. Mercado-Marin, P. Garcia-Reynaga, S. Romminger, E. F. Pimenta, D. K. Romney, M. W. Lodewyk, D. E. Williams, R. J. Andersen, S. J. Miller, D. J. Tantillo, R. G. S. Berlinck, R. Sarpong, *Nature* **2014**, *509*, 318–324.
- [89] a) Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078–1082; b) J. B. R. Herrera, W. K. Wilson, S. P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6765–6766; c) D. Morrone, M. Xu, D. B. Fulton, M. K. Determan, R. J. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5400–5401.