

Identifizierung von Intermediaten der PR-Toxin-Biosynthese durch *Penicillium roqueforti*

Ramona Riclea und Jeroen S. Dickschat*

Abstract: Das Sesquiterpenoid 7-*epi*-Neopetason wurde über das Wieland-Miescher-Keton synthetisiert. Die Verbindung war identisch zu einem zuvor vorläufig identifizierten Bestandteil des Bouquets von *Penicillium roqueforti*. Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Isotopomeren von Mevalonolacton zeigten, dass die Oxidation an C12 und die Isomerisierung der C11-C12- zur C7-C11-Doppelbindung unabhängig voneinander und nicht über ein C7-C11-C12-Allylradikal in einem Schritt ablaufen. Fütterung von (11,12,13- $^{13}\text{C}_3$)-7-*epi*-Neopetason resultierte im Einbau der Isotopenmarkierung in PR-Toxin, wodurch die Verbindung als biosynthetisches Intermediat etabliert wurde.

Der Ascomycet *Penicillium roqueforti* kann aus Erde, Pflanzen oder sich zersetzendem organischen Material isoliert werden und wird traditionell für die Produktion von Roquefort und anderen Blauschimmelkäsen verwendet. Sein Spektrum an Sekundärmetaboliten beinhaltet nicht nur Aromakomponenten, sondern auch stark biologisch aktive Verbindungen wie das klinisch verwendete Immunsuppressivum Mycophenolsäure (**1**, Abbildung 1),^[1] das Neurotoxin Roquefortin C (**2**)^[2,3] und das sesquiterpenoide Mycotoxin PR-Toxin (**3**). PR-Toxin inhibiert lebenswichtige zelluläre Prozesse wie die Transkription^[4] und Proteinbiosynthese^[5] und hat in Mäusen eine letale Dosis (LD_{50}) von ca. 5 mg kg^{-1} .^[6] Die niedrigen Konzentrationen biologisch aktiver Sekundärmetabolite im Schimmelkäse könnten möglicherweise das „Französische Paradoxon“, d. h. das geringe Auftreten kardiovaskulärer Mortalität in der französischen Bevölkerung trotz des vergleichsweise hohen Konsums gesättigter Fette und Alkohols, erklären.^[7] Nach der Strukturaufklärung von **3** im Jahre 1975 durch Strong und Mitarbeiter^[8] wurden die verwandten Eremofortine B (**4**), A (**5**) und C (**6**) sowie die oxygenierten Eremophilane **7–9** entdeckt.^[9–12]

Die Biosynthese von **3** wurde bisher nicht im Detail studiert. Der erste Schritt ist die Umwandlung von Farnesylpyrophosphat (FPP) in den Stammkohlenwasserstoff Aristolochen (**10**) durch die Aristolochen-Synthase.^[13,14] Obwohl jüngst fragmenthafte Informationen über das Biosynthesegencluster erhalten wurden,^[15] sind die Natur der meisten biosynthetischen Intermediate sowie die genauen Funktionen der Gene und Enzyme für deren Umsetzung immer noch

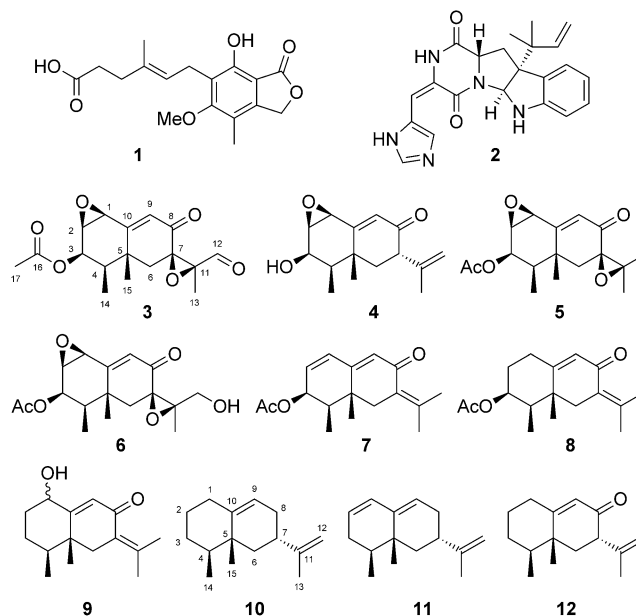


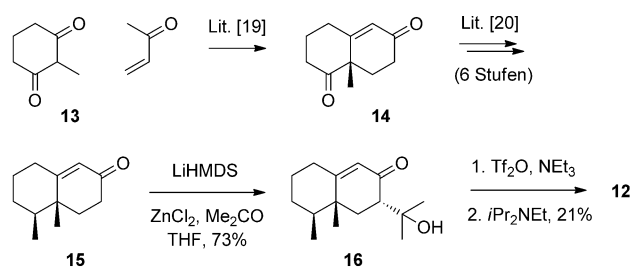
Abbildung 1. Sekundärmetabolite aus *Penicillium roqueforti*.

unklar. Die Eremofortine A–C und **7** sind als Intermediate des Biosyntheseweges vorgeschlagen worden,^[12,16,17] allerdings könnten manche dieser Metabolite auch Nebenprodukte der PR-Toxin-Biosynthese sein. Wir haben kürzlich über die Detektion von Nootkaten (**11**) und 7-*epi*-Neopetason (**12**) in Duftstoffextrakten von *P. roqueforti* berichtet.^[18] Während **11** auf Basis seines Massenspektrums und Retentionsindexes, die beide mit Literaturdaten übereinstimmten, sicher identifiziert wurde, konnte **12** lediglich vorläufig identifiziert werden. Wir berichten nun über die unzweifelhafte Identifizierung von **12** durch Totalsynthese und über Fütterungsexperimente mit isotope-markierten Vorstufen, die direkte Einblicke in die Biosynthese von **3** geben.

Die Synthese von **12** ging von 2-Methylcyclohexan-1,3-dion (**13**) aus, das zunächst nach einer bekannten Methode über das Wieland-Miescher-Keton (+)-**14** in das Octalon **15** überführt wurde (Schema 1).^[19,20] In Anlehnung an eine beschriebene Prozedur für die Synthese von Petasin^[21] wurde **15** anschließend in einer Aldoladdition an Aceton eingesetzt, um Ligudicin C (**16**), einen bekannten Naturstoff aus *Ligularia dictyoneura*,^[22] zu erhalten. Behandlung mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid in NEt_3 gefolgt von einer Hoffmann-Eliminierung mit Hünig-Basis ergab die Zielverbindung **12**. Das synthetische 7-*epi*-Neopetason war bezüglich EI-Massenspektrum und Retentionsindex identisch zur flüchtigen Verbindung in den Duftstoffextrakten von *P. roqueforti* (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Verbin-

[*] Dr. R. Riclea, Prof. Dr. J. S. Dickschat
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
E-Mail: dickschat@uni-bonn.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506128> zu finden.



Schema 1. Synthese von 7-*epi*-Neopetason (**12**).

ung **12** erwies sich hinsichtlich der Isomerisierung der im letzten Schritt installierten olefinischen Doppelbindung in die konjugierte α,β -Position als äußerst instabil. Diese Isomerisierung wurde sogar nach einwöchiger Lagerung bei -80°C beobachtet.

Für eindeutige biosynthetische Studien wurden die ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Daten von **3** erneut durch Anwendung zweidimensionaler NMR-Techniken einschließlich $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC und NOESY zugeordnet (Tabelle 1). Die erhaltenen Daten klärten einige falsch zu-

Tabelle 1: Erneut zugeordnete ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von **3** in CDCl_3 .

C ^[a]	^1H (δ , m, J ^[b])	^{13}C (δ) ^[c]
1	3.62 (d, $^3J=3.5$, 1 H)	55.9 (CH)
2	3.92 (dd, $^3J=4.9$, $^3J=3.6$, 1 H)	55.5 (CH)
3	5.11 (dd, $^3J=5.1$, $^3J=5.1$, 1 H)	69.9 (CH)
4	1.77 (dq, $^3J=5.4$, $^3J=6.9$, 1 H)	42.7 (CH)
5	–	38.1 (C _q)
6a	1.80 (d, $^2J=14.5$, 1 H)	41.5 (CH ₂)
6b	2.13 (d, $^2J=14.5$, 1 H)	–
7	–	67.3 (C _q)
8	–	191.7 (C _q)
9	6.38 (s, 1 H)	129.9 (CH)
10	–	164.7 (C _q)
11	–	67.4 (C _q)
12	9.66 (s, 1 H)	198.6 (CH)
13	1.45 (s, 3 H)	13.6 (CH ₃)
14	0.99 (d, $^3J=7.1$ Hz, 3 H)	10.1 (CH ₃)
15	1.41 (s, 3 H)	21.9 (CH ₃)
16	–	170.6 (C _q)
17	2.13 (s, 3 H)	20.7 (CH ₃)

[a] Nummerierung der Kohlenstoffpositionen wie in Abbildung 1.

[b] Chemische Verschiebungen δ in ppm; Multiplizitäten m: s = Singulett, d = Dublett, m = Multipllett; Kopplungskonstanten nJ über n Bindungen in Hertz. [c] Die Zuordnung der Kohlenstoffsignale (CH₃, CH₂, CH und C_q) wurde aus einem DEPT-Spektrum abgeleitet.

geordnete chemische Verschiebungen im Bericht zur Strukturaufklärung von **3** (Vertauschung von C13 mit C15)^[8] und stimmten mit zwei späteren Berichten überein.^[11,23]

Anschließend wurde die Biosynthese von **3** durch Fütterung von ($2\text{-}^{13}\text{C}$)- und ($6\text{-}^{13}\text{C}$)Mevalonolacton (**17**) untersucht.^[18,24] Die isotonenmarkierten Verbindungen wurden an Pilzkulturen auf hydratisiertem Reismedium^[15] gefüttert, und nach zweiwöchiger Kultivierung wurde **3** mit einer Ausbeute von 50 mg aus 15 g Nährmedium isoliert. Fütterung von ($2\text{-}^{13}\text{C}$)-**17** gefolgt von Isolierung von **3** und ^{13}C -NMR-Analyse

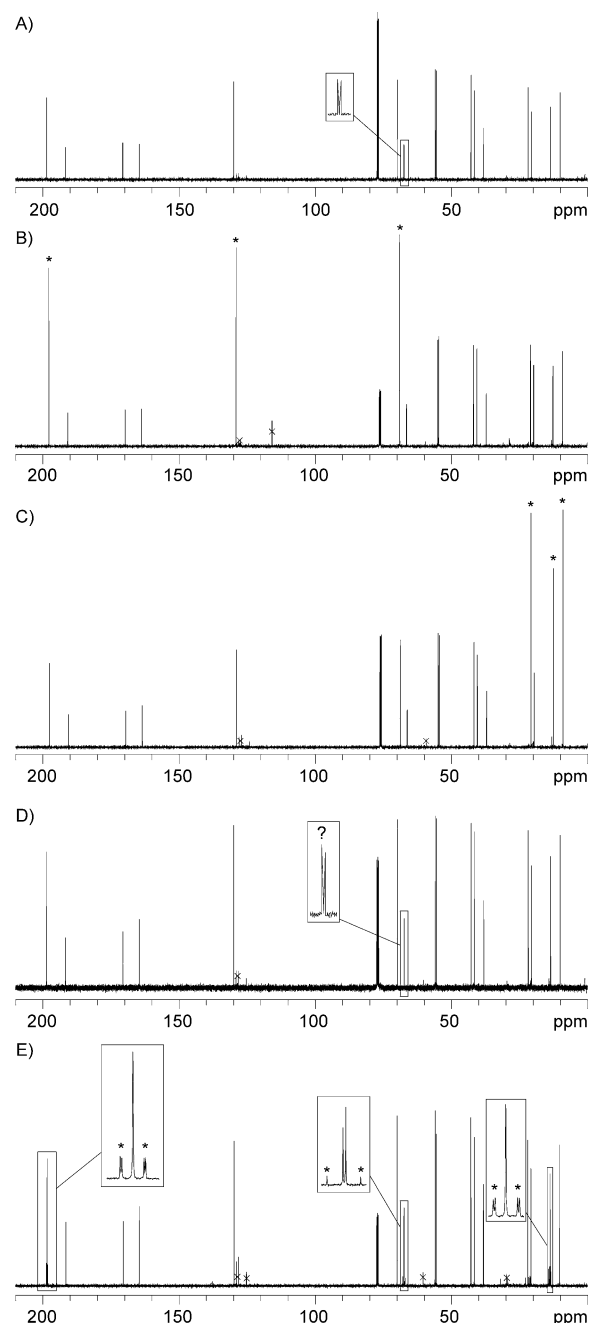
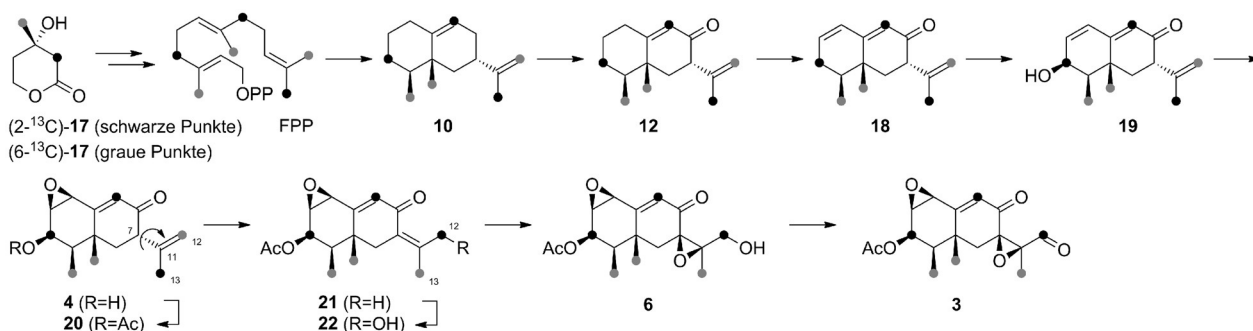


Abbildung 2. ^{13}C -NMR-Spektren von PR-Toxin (**3**). A) Unmarkiertes **3**, B) [$3,9,12\text{-}^{13}\text{C}_3$]-**3** nach Fütterung von ($2\text{-}^{13}\text{C}$)-**17**, C) [$13,14,15\text{-}^{13}\text{C}_3$]-**3** nach Fütterung von ($6\text{-}^{13}\text{C}$)-**17**, D) [$11\text{-}^{13}\text{C}$]-**3** nach Fütterung von ($11\text{-}^{13}\text{C}$)-**12** (siehe Text, Einbau unklar) und E) [$11,12,13\text{-}^{13}\text{C}_3$]-**3** nach Fütterung von ($11,12,13\text{-}^{13}\text{C}_3$)-**12**. Sternchen zeigen Signale der ^{13}C -angereicherten Kohlenstoffpositionen, Fragezeichen markieren Signale von Kohlenstoffpositionen mit unklarem, aber erwartetem Einbau der ^{13}C -Markierung. Signale von Verunreinigungen sind durchkreuzt.

zeigte den Einbau der Markierung in C3, C9 und C12, während Fütterung von ($6\text{-}^{13}\text{C}$)-**17** Einbau in C13, C14 und C15 ergab (Abbildungen 2B und 2C). Dieses Ergebnis war in Übereinstimmung mit früheren Berichten über Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Vorstufen.^[23,25,26] Zusammen



Schema 2. Hypothetischer Biosyntheseweg zu PR-Toxin (3). Schwarze und graue Punkte verweisen auf ¹³C-markierte Kohlenstoffpositionen aus zwei Fütterungsexperimenten.

mit unserer Erkenntnis, dass die Isotopenmarkierung von (6-¹³C)-17 spezifisch in das olefinische C12 von 10 eingebaut wird,^[18] geben diese Fütterungsexperimente einen detaillierten Einblick in den stereochemischen Verlauf und Mechanismus der PR-Toxin-Biosynthese.

Ein vorgeschlagener Biosyntheseweg zu 3, der als Arbeitshypothese entwickelt wurde, ist in Schema 2 gezeigt. Generell berücksichtigt dieser Vorschlag, dass Oxidationen des Kohlenstoffgerüsts von 10 und aller späteren Intermediate insbesondere in allylischen Positionen begünstigt sind. Diesem Prinzip folgend kann 10 zuerst durch allylische Oxidation in 12 umgewandelt werden. Einführung einer weiteren olefinischen Doppelbindung, entweder durch eine Dehydrogenase oder durch allylische Oxidation und Eliminierung von Wasser, was die Bildung von 9 erklären würde, könnte 18 ergeben, das zu 19 oxidiert werden kann. Dessen Epoxidierung würde Eremofortin B (4) liefern, das zu 20 acetyliert wird. Diese Verbindung wird dann zu 22 umgesetzt, entweder durch eine direkte Oxidation über ein C7-C11-C12-Allylradikal mit Einführung einer Hydroxyfunktion an C12 oder in einem zweistufigen Prozess aus Isomerisierung der Doppelbindung zu 21 und allylische Oxidation an C12. Wie die Ergebnisse der Fütterungsexperimente mit (2-¹³C)- und (6-¹³C)-17 mit Hinblick auf die Einbaupositionen in 10 und 3 demonstrieren, muss C12 von 20 in C13 von 21/22 übergehen, während C13 von 20 als C12 von 21/22 endet (oder es muss ein ähnlicher Positionstausch von C12 und C13 auf der Stufe eines alternativen Intermediates erfolgen). Diese Erkenntnis widerspricht einem Mechanismus, durch den 20 direkt über ein C7-C11-C12-Allylradikal in 22 umgewandelt wird, ist aber in Einklang mit einer Isomerisierung von 20, das aus einer anderen Konformation als gezeigt reagiert, die sich durch Rotation um die C7-C11-Bindung ergibt, um so dass konjugierte Enon 21 zu ergeben. Dieser Prozess könnte spontan sein, wenn auch ein strikter stereochemischer Verlauf gefordert wäre, und wäre ähnlich zu der beobachteten spontanen Isomerisierung von synthetischem 12. Nachfolgende allylische Oxidation von 21 zu 22, Epoxidierung zu Eremofortin C (6) und Oxidation ergäben 3.

Eremofortin A (5), das zuvor als biosynthetisches Intermediat vorgeschlagen wurde,^[16,17] erscheint vielmehr als Nebenprodukt der Biosynthese durch frühzeitige Epoxidierung von 21 erklärbar; dessen Umsetzung in 22 würde die benachteiligte Oxidation einer nichtaktivierten Methylgruppe

erfordern. Die Existenz von 5 stützt außerdem die Idee, dass die Umwandlung von 20 zu 22 ein zweistufiger Prozess aus Isomerisierung und allylischer Oxidation und nicht eine einstufige allylische Oxidation ist. Die Tatsache, dass 22 im Unterschied zu 5 nie aus *P. roqueforti* isoliert werden konnte, widerspricht nicht dessen Natur als biosynthetisches Intermediat, da ein Intermediat schnell umgesetzt werden wird, wohingegen ein Nebenprodukt des Biosyntheseweges akkumulieren kann.

Der vorgeschlagene Biosyntheseweg wurde weiterhin durch Fütterung fortgeschrittener ¹³C-markierter Intermediate studiert. Zu diesem Zweck wurde (11-¹³C)-12 über die in Schema 1 gezeigte Route unter Verwendung von (2-¹³C)Aceton in der Umwandlung von 15 zu (11-¹³C)-16 synthetisiert. Das markierte (11-¹³C)-12 wurde an *P. roqueforti* verfüttert, aber überraschenderweise konnte kein Einbau festgestellt werden (Abbildung 2D). Da die synthetische Verbindung (11-¹³C)-12 mehrere Wochen vor Durchführung des Fütterungsexperimentes hergestellt worden war, wurde ihre Identität erneut durch GC/MS geprüft, wodurch aufgedeckt wurde, dass das gesamte Material eine Isomerisierung der Doppelbindung mit Umwandlung der Isopropenylgruppe in die konjugierte Isopropylidengruppe vollzogen hatte, obwohl die Verbindung bei -80 °C gelagert worden war. Zwei Interpretationen schienen möglich, warum kein Einbau in 3 zu beobachten war: Erstens könnte das isomerisierte Material oder eines seiner nachgelagerten Metabolite durch eines oder mehrere Enzyme der PR-Toxin-Biosynthese nicht akzeptiert werden, oder zweitens könnte der experimentelle Ansatz schlecht gewählt worden sein, insofern als ein fortgeschrittenes Intermediat des Biosyntheseweges möglicherweise schlecht durch den Pilz aufgenommen würde. Ein weiteres Problem des experimentellen Ansatzes schien zu sein, dass die Detektion der Isotopenmarkierung im Fall geringer Einbauraten (< 0.2 %) schwierig wäre, da dies zu nur leicht verstärkten und somit wenig aufschlussreichen ¹³C-Signalen führen würde. Allerdings müssen geringe Einbauraten wegen des hohen Produktionsniveaus von 3 durch *P. roqueforti* in Betracht gezogen werden. Um diese Probleme zu umgehen, wurde (11,12,13-¹³C₃)-12 aus (¹³C₃)Aceton synthetisiert und sofort nach Herstellung an *P. roqueforti* gefüttert. Obwohl die Einbauraten von (11,12,13-¹³C₃)-12 gering waren, konnte der Einbau der Markierung in die Positionen C11/C12/C13 von 3 unzweifelhaft durch die Detektion von Satellitensignalen

links und rechts neben den entsprechenden Peaks der für die nichtmarkierten Kohlenstoffatome nachgewiesen werden, die ihren Ursprung in ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen haben (Abbildung 2E).

Zusammenfassend haben wir 7-*epi*-Neopetason (**12**) synthetisiert, das sich als identisch mit einer zuvor vorläufig identifizierten volatilen Verbindung in Duftstoffextrakten des PR-Toxin-Produzenten *Penicillium roqueforti* erwies. Die Instabilität von **12** bezüglich einer Doppelbindungsisomerisierung könnte auf eine entsprechende spontane Isomerisierung auch während der PR-Toxin-Biosynthese hinweisen. Fütterungsexperimente mit zwei ^{13}C -markierten Isotopomeren von Mevalonolacton deckten auf, dass die Oxidation eines Intermediates mit C11-C12-Doppelbindung über ein C7-C11-C12-Allylradikal mit gleichzeitiger Einführung einer Hydroxyfunktion an C12 keine geeignete Erklärung für die betreffende Doppelbindungsisomerisierung liefert. Die Ergebnisse der Fütterungen zeigen vielmehr, dass die Oxidation an C12 von der Isomerisierung der Doppelbindung unabhängig ist. Verbindung **12** konnte außerdem durch Fütterung von (11,12,13- $^{13}\text{C}_3$)-**12** als Intermediat der PR-Toxin-Biosynthese nachgewiesen werden. Viele Intermediate dieses Biosyntheseweges wurden bis heute postuliert,^[12,16,17] und hier liefern wir den ersten experimentellen Beweis dafür, dass **12** ein echtes Intermediat ist. Die Strategie, drei benachbarte Kohlenstoffe in **12** zu markieren, ermöglichte eine sehr empfindliche Detektion des Einbaus durch die Beobachtung von Satellitensignalen aufgrund von ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen. Das Phänomen der ^{13}C , ^{13}C -Kopplung in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie kann überdies genutzt werden, um Umlagerungen von Kohlenstoffgerüsten, etwa während Terpencyclisierungen, durch die Beobachtung von umlagerungsinduzierten ^{13}C , ^{13}C -Kopplungen zu verfolgen,^[27,28] oder es bietet die Möglichkeit zur Strukturaufklärung durch ^{13}C , ^{13}C -COSY-NMR.^[28–30] Weitere Anwendungen von Isotopenmarkierungstechniken zur Aufklärung von Schlüsselschritten in Biosynthesewegen sind Gegenstand unserer gegenwärtigen Forschung.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch den DFG-Sonderforschungsbereich 813, „Chemie an Spinzentren“, gefördert.

Stichwörter: Biosynthese · Isotopenmarkierung · NMR-Spektroskopie · Terpenoide · Totalsynthesen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 12167–12170
Angew. Chem. **2015**, 127, 12335–12338

- [1] P. Lafont, J. P. Debeaupuis, M. Gaillardin, J. Payen, *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 37, 365–368.
- [2] P. M. Scott, M.-A. Merrien, J. Polonsky, *Experientia* **1976**, 32, 140–142.

- [3] M. I. Ries, H. Ali, P. P. Lankhorst, T. Hankemeier, R. A. L. Bovenberg, A. J. M. Driessen, R. J. Vreeken, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 37289–37295.
- [4] Y. Moule, M. Jemmali, N. Rousseau, *Chem.-Biol. Interact.* **1976**, 14, 207–216.
- [5] Y. Moule, M. Jemmali, N. Darracq, *FEBS Lett.* **1978**, 88, 341–344.
- [6] F.-C. Chen, C.-F. Chen, R.-D. Wei, *Toxicon* **1982**, 20, 433–441.
- [7] I. M. Petyaev, Y. K. Bashmakov, *Med. Hypotheses* **2012**, 79, 746–749.
- [8] R.-D. Wei, H. K. Schnoes, P. A. Hart, F. M. Strong, *Tetrahedron* **1975**, 31, 109–114.
- [9] S. Moreau, A. Gaudemer, A. Lablache-Combier, J. Biguet, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 833–834.
- [10] S. Moreau, M. Cancan, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 2632–2634.
- [11] S. Moreau, J. Biguet, A. Lablache-Combier, F. Baert, M. Foulon, C. Delfosse, *Tetrahedron* **1980**, 36, 2989–2997.
- [12] D. Sørensen, A. Raditsis, L. A. Trimble, B. A. Blackwell, M. W. Sumarah, J. D. Miller, *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 121–123.
- [13] T. M. Hohn, R. D. Plattner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, 272, 137–143.
- [14] R. H. Proctor, T. M. Hohn, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 4543–4548.
- [15] P. I. Hidalgo, R. V. Ullán, S. M. Albillos, O. Montero, M. Á. Fernández-Bodega, C. García-Estrada, M. Fernández-Aguado, J.-F. Martín, *Fungal Genet. Biol.* **2014**, 62, 11–24.
- [16] S. Moreau, A. Lablache-Combier, J. Biguet, *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, 39, 770–776.
- [17] H. H. Jeleń, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6569–6574.
- [18] N. L. Brock, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2013**, 14, 1189–1193.
- [19] P. Buchschacher, A. Fürst, J. Gutzwiller, *Org. Synth.* **1985**, 63, 37–43.
- [20] V. M. T. Carneiro, H. M. C. Ferraz, T. O. Vieira, E. E. Ishikawa, L. F. Silva, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2877–2882.
- [21] M. C. Witschel, H. J. Bestmann, *Synthesis* **1997**, 107–112.
- [22] A. Tan, H. He, H. Yang, M. Zhang, Z. Wang, X. Hao, *Yaoxue Xuebao* **2003**, 38, 924–926.
- [23] A. A. Chalmers, A. E. de Jesus, C. P. Gorst-Allman, P. S. Steyn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2899–2903.
- [24] L. Barra, B. Schulz, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2014**, 15, 2379–2383.
- [25] C. P. Gorst-Allman, P. S. Steyn, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 5359–5362.
- [26] S. Moreau, A. Lablache-Combier, J. Biguet, *Phytochemistry* **1981**, 20, 2339–2342.
- [27] A. P. W. Bradshaw, J. R. Hanson, M. Sivers, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 819a.
- [28] L. Barra, K. Ibrom, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 6637–6640; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 6737–6740.
- [29] G. A. Ellis, T. P. Wyche, C. G. Fry, D. R. Braun, T. S. Bugni, *Mar. Drugs* **2014**, 12, 1013–1022.
- [30] T. P. Wyche, J. S. Piotrowski, Y. Hou, D. Braun, R. Deshpande, S. McIlwain, I. M. Ong, C. L. Myers, I. A. Guzei, W. M. Westler, D. R. Andes, T. S. Bugni, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 11583–11586; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 11767–11770.

Eingegangen am 3. Juli 2015
Online veröffentlicht am 12. August 2015