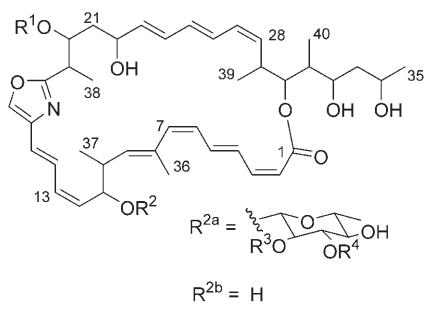


Chivosazol A – Aufklärung der absoluten und relativen Konfiguration

Dominic Janssen, Dieter Albert, Rolf Jansen, Rolf Müller und Markus Kalesse*

Myxobakterien sind eine reichhaltige Quelle für neue Naturstoffe mit biologischer Wirksamkeit. Unter den verschiedenen Stämmen, die von der Art *Sorangium cellulosum* isoliert wurden, produzierte Soce12 eine Reihe bedeutender biologisch aktiver Verbindungen wie etwa Sorangicin A,^[1] Sorangiolide,^[2] Disorazole^[3] und Chivosazole. Die Chivosazole (Tabelle 1) bilden eine Gruppe von 31-gliedrigen Makroliden,

Tabelle 1:

 $R^{2b} = H$

Chivosazol	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	A	Me	2a	Me
2	A ₁ (6,7-E)	Me	2a	Me
3	B	H	2a	Me
4	C	Me	2a	H
5	D	H	2a	H
6	E	H	2a	H
7	F	Me	2b	–

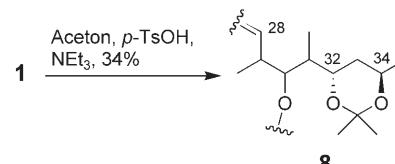
die 1997 am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (HZI, ehemals GBF) isoliert wurden.^[4] Sie zeigen eine gute antibiotische Aktivität gegen Hefen und filamentöse Pilze und sind hochgradig zytotoxisch gegen Säugerzellen (IC_{50} 9 ng mL⁻¹ für L929 und HeLa). Mit der Aus-

nahme von Chivosazol F (7) weisen alle Varianten eine 6-Desoxyglucopyranose-Einheit (Chinovose) an C11 auf.

Die Struktur von Chivosazol A (1) wurde durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt.^[4] Wegen der fehlenden Konfigurationszuweisung der zehn Chiralitätszentren fand eine chemische Synthese von 1 hingegen nicht statt. Daher beschäftigten wir uns zunächst mit der Konfigurationszuordnung als elementare Voraussetzung für eine erfolgreiche Synthese.

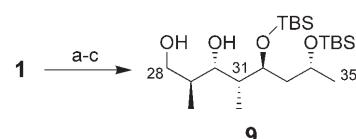
Hier beschreiben wir die Bestimmung der absoluten und relativen Konfiguration von Chivosazol durch eine Kombination aus chemischem Abbau, Partialsynthese, NMR-Spektroskopie und genetischer Analyse.^[5]

Zu Beginn unserer Arbeiten untersuchten wir die relative Konfiguration an C32 und C34 mithilfe der Acetonid-Methode. Drei neue ¹³C-NMR-Signale des Acetonids bei δ -Werten von 24.8, 25.2 und 101.8 ppm (Schema 1) und deren



Schema 1. Synthese des Acetonids 8.

Analyse nach Rychnovsky und Evans^[6] ergeben eine 1,3-*anti*-Diol-Anordnung an C32 und C34. Zur Konfigurationsbestimmung der benachbarten Chiralitätszentren wurde Chivosazol A (1) als TBS-Ether geschützt und einer Ozonolyse mit reduktiver Aufarbeitung unterzogen (Schema 2).

Schema 2. a) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH₂Cl₂, 30% vierfach TBS-geschütztes 1; b) O₃, CH₂Cl₂, -78 °C; c) NaBH₄, CH₂Cl₂, 46% über 2 Stufen. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

Anschließend wurden NOESY-Experimente herangezogen, um die relative Konfiguration der vier benachbarten Zentren im Fragment 9 festzulegen (Abbildung 1). Da bereits die Anordnung des Diols an C32-C34 als *anti* identifiziert wurde, war somit die gesamte relative Konfiguration festgelegt.

Um unseren Strukturvorschlag zu bestätigen, synthetisierten wir in einem unabhängigen Experiment das Fragment 9 (Schema 3). Dazu unterzogen wir den vom Roche-Ester 10

[*] D. Janssen, Dr. D. Albert, Prof. Dr. M. Kalesse
Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe (BMWZ)
Leibniz Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
Fax: (+49) 511-762-3011
E-Mail: markus.kalesse@oci.uni-hannover.de

Dr. R. Jansen
Mikrobielle Wirkstoffe
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Prof. Dr. R. Müller
Institut für Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

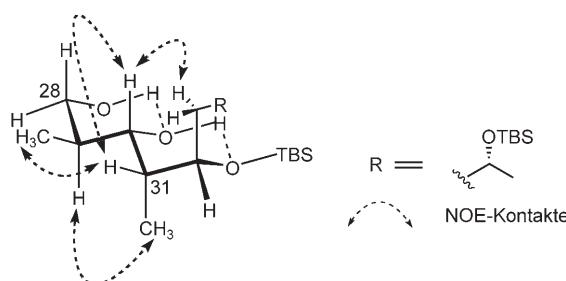
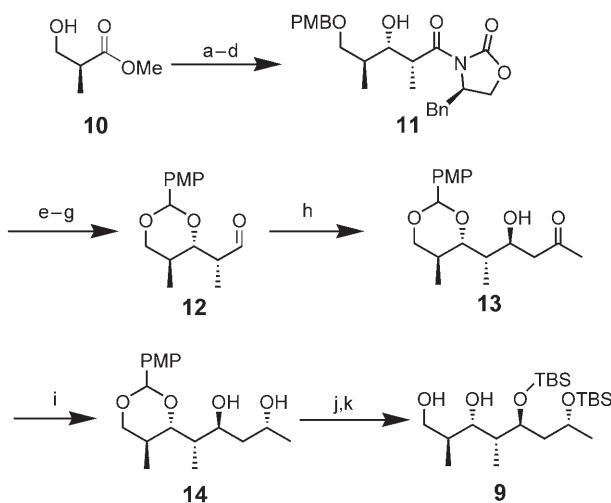


Abbildung 1. NOE-Kontakte im Fragment 9 (aussagekräftige Kopplungskonstanten: H29-H30: 9.7 Hz, H30-H31: 1.0 Hz, H31-H32: 1.8 Hz).



Schema 3. a) PMBO(NH) CCl_3 , CSA, CH_2Cl_2 , RT, 91%; b) DIBAI-H, CH_2Cl_2 , -78°C , 76%; c) $(\text{COCl})_2$, DMSO, NEt_3 , CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 95%; d) (R) - $(+)$ -4-Benzyl-3-propionyloxazolidin-2-on, TfOBBu_2 , NEt_3 , CH_2Cl_2 , 85%; e) DDQ, MS 4 Å, CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 73%; f) LiBH_4 , EtOH , THF , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 96%; g) $(\text{COCl})_2$, DMSO, NEt_3 , CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 99%; h) 2-(Trimethylsilyloxy)propen, $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, Toluol, -78°C , 86%, d.r. 97:3; i) $\text{Me}_4\text{NHB(OAc)}_3$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{AcOH}$ (1:1), -40°C , 57%; j) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , 72%; k) $\text{Pd(OH)}_2/\text{C}$, H_2 , iPrOH , 74%. PMB = *p*-Methoxybenzyl; CSA = Camphersulfonsäure; DIBAI-H = Diisobutylaluminiumhydrid; DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzoquinon; PMP = *p*-Methoxyphenyl; Bn = Benzyl.

abgeleiteten Aldehyd einer *syn*-selektiven Evans-Aldol-Reaktion, und eine anschließende Anti-Felkin-selektive Mukaiyama-Aldol-Reaktion erzeugte das Hydroxyketon **13**. Reduktion von **13** mit $\text{Me}_4\text{NHB(OAc)}_3$ lieferte selektiv das *anti*-Diol **14**. Die Schützung als TBS-Ether und anschließende Abspaltung des Acetals schlossen die Synthese des Segments **9** ab. Dessen spektroskopische Eigenschaften waren identisch mit denen des gleichen Fragments, das durch chemischen Abbau erhalten wurde. Zusätzlich konnten wir durch den Vergleich der $[\alpha]_D$ -Werte die absolute Konfiguration als 29S, 30S, 31S, 32S und 34R bestimmen.

Zur Bestimmung der restlichen fünf Chiralitätszentren führten wir eine kombinierte NMR- und Molecular-Modeling-Studie durch. Das entscheidende NMR-Signal für die Konformationsanalyse ist ein transannularer NOE zwischen H7 und einem der diastereotopen Protonen an C21.^[7] Ge-

stützt auf diesem NOE-Kontakt wurde eine Konformationsanalyse vorgenommen, bei der die Substituenten nicht berücksichtigt wurden. Schließlich wurden nur solche Konformationen berücksichtigt, die im Einklang mit dem transannularen NOE waren.

Die Konformationsanalyse wurde mittels einer Monte-Carlo-Suche mit dem Programm Macromodel (Version 8.0)^[8] durchgeführt. Startstrukturen waren vereinfachte Moleküle, in denen die Seitenketten (mit Ausnahme von Me36) und OH-Gruppen des Makrocyclus durch H-Atome ersetzt wurden. Zehn Torsionswinkel (siehe Abbildung 2) wurden

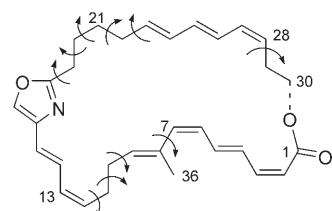


Abbildung 2. Das makrocyclische Rückgrat von Chivosazol A wurde einer Monte-Carlo-Konformationsanalyse unterzogen. Die gestrichelte Linie gibt die Stelle der formalen Ringöffnung an.

zufälligen Änderungen unterworfen (MCMM-Algorithmus; Monte Carlo Multiple Minimum).^[9] Dazu wurden formal Ringöffnungen an der Lactonbindung C30–O1 (gestrichelte Linie in Abbildung 2) simuliert und ein erneuter Ringschluss nur für C30–O1-Abstände von weniger als 4.5 Å zugelassen. Die so gefundenen Konformationen wurden im Vakuum und in Chloroform als Lösungsmittel mit dem Merck-Molecular-Kraftfeld (MMFF) und der Polak-Ribiére(PR)-Gradientenmethode minimiert (GB/SA-Solvatationsmodell; Generalized Born Surface Area).^[10] Die damit berechneten Konformationen wurden berücksichtigt, wenn der Abstand zwischen H7 und einem der diastereotopen Protonen an C21 kleiner als 4 Å war.

Die so identifizierten Grundstrukturen wurden in Gruppen zusammengefasst, und in den repräsentativen Konformationen wurden die fehlenden Substituenten in Übereinstimmung mit den gemessenen $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten eingeführt.^[11] In allen Fällen gab es nur eine Konformation, die den Kopplungskonstanten entsprach. Eine weitere Strukturoptimierung ergab im Vergleich zur Startstruktur ein unverändertes Gerüst und war im Einklang mit den experimentellen NOE-Daten. Die wichtigsten Strukturdetails sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Konformation mit der niedrigsten Energie entspricht der aus den NMR-Experimenten erhaltenen Struktur. Berechnete Strukturparameter, die von den NMR-Daten abweichen, sind fettgedruckt hervorgehoben.

Um zu prüfen, ob die Einführung der Substituenten eine veränderte Konformation im Energieminimum ergibt, wurde der Strukturvorschlag abermals einer Monte-Carlo-Konformationssuche unterzogen. Dieses Mal wurden lediglich die Doppelbindungsgeometrien und die Konfiguration der Chiralitätszentren fixiert, wohingegen keine Einschränkung des H7-H21b-Abstandes vorgenommen wurde. Auch bei dieser Monte-Carlo-Suche wurde das globale Minimum mit

Tabelle 2: Entscheidende Atomabstände aus der Monte-Carlo-Rechnung; Stereoisomere, die nicht mit den beobachteten NOE-Daten im Einklang sind, sind fett gedruckt.

Verbindung	10L-11L-19D- 20D-22L-29D- 30D	10D-11D-19L- 20L-22D-29L- 30L	10L-11L-19L- 20L-22D-29L- 30L	10L-11L-19D- 20L-22D-29L- 30L	10L-11L-19D- 20L-22D-29L- 30L	10D-11D-19L- 20D-22L-29D- 30D	10L-11D-19D- 20L-22D-29L- 30L	10L-11L-19L- 20D-22L-29D- 30D
Energie	579.630	604.198	626.566	637.536	591.998	610.873	603.238	642.117
[kJ mol ⁻¹] ^[a]								
Atomabstände [Å]								
H7-H9	3.4	3.4	2.4	3.3	3.3	3.3	3.5	3.2
H7-H21a	3.8	3.2	5.8	2.8	4.1	3.8	3.8	3.3
H7-H21b	2.8	2.7	4.2	3.2	3.0	2.6	2.6	3.3
H7-H36	2.6	2.5	3.5	2.5	2.6	2.6	2.7	2.6
H7-H38	4.1	2.9	7.6	3.9	3.6	2.5	3.5	3.0
H9-H10	3.1	3.1	2.3	2.3	3.1	3.1	3.1	2.2
H9-H11	3.5	3.3	2.8	2.7	3.4	3.4	2.7	2.7
H9-H14	3.7	3.1	3.6	3.2	3.5	3.2	4.1	3.3
H9-H37	2.5	2.5	3.6	3.5	2.5	2.5	2.7	3.6
H10-H11	2.4	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.7	2.5
H10-H36	2.2	2.1	4.0	4.0	2.2	2.1	2.1	4.0
H11-H36	2.6	3.0	4.1	4.1	2.8	2.7	4.1	4.0
H12-H37	2.5	2.6	2.4	2.6	2.5	2.6	2.8	2.6
H20-H21a	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
H20-H21b	2.6	2.6	2.4	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5
H20-H38	3.8	3.8	3.9	2.5	2.4	2.5	2.5	2.5
H21a-H38	2.3	2.4	2.3	3.2	3.5	3.5	3.3	3.1
H21b-H38	2.8	2.8	3.4	2.3	2.3	2.3	2.2	2.3
H22-H23	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
H28-H29	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
H28-H30	2.4	2.5	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6
H28-H39	2.9	2.8	2.9	2.8	2.9	2.7	2.9	3.1
H29-H26	2.2	2.1	2.2	2.1	2.2	2.1	2.2	2.2
H29-H40	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.4

[a] In Chloroform als Lösungsmittel (GB/SA); Kraftfeld: MMFF.

demselben starren Kohlenstoffrückgrat wie in der ursprünglichen Konformationsanalyse gefunden (Abbildung 3). Eine geringe Abweichung (ca. 2 Hz) der berechneten $^3J_{\text{H}10, \text{H}11}$ -Kopplungskonstante von dem Wert, der nach einer von Haasnoot et al.^[11] modifizierten Karplus-Gleichung erhalten wurde, führt zu dem Schluss, dass in dieser Region ein Konformationsgleichgewicht angenommen werden kann.

Die Analyse der beiden Konformationen oberhalb des globalen Minimums ergab, dass die Regionen C7–C11 und C19–C22 ein gewisses Maß an konformativer Flexibilität

haben. Hierbei wurden in beiden Strukturen Wasserstoffbrücken zwischen HO22 und N16 bzw. O20 gefunden (siehe Hintergrundinformationen). Ein schnelles Gleichgewicht zwischen dem globalen Minimum als vorherrschender Konformation (ca. 90 %) und den lokalen Minima kann die beobachteten Abweichungen der Kopplungskonstanten erklären. Verknüpft man diese Betrachtungen mit den durch chemischen Abbau erhaltenen Konfigurationszuweisungen (29D, 30D), kann die absolute Konfiguration durch die Kombination von NMR-Experimenten und Molecular-Modeling-Studien mit 10L-11L-19D-20D-22L-29D-30D angegeben werden.

Wegen der begrenzten Verfügbarkeit von Chivosazol A konnten wir allerdings keine zusätzliche Strukturzuweisung durch chemischen Abbau erhalten. Um dennoch weitere Einblicke zu gewinnen, nutzten wir die genetische Analyse der Polyketid-Cluster.^[14] Der für Chivosazol zuständige Biosynthese-Gencluster kodiert für ein komplexes Hybrid aus Polyketidsynthasen (PKS) und einer nicht-ribosomalen Peptidsynthase.^[12] Entsprechend der Analyse der Zentralregion der Ketoreduktasen (KR), wie sie von Reid et al.^[13] und Caffrey et al.^[14] vorgeschlagen wurde, haben wir die Konfigurationen an C30, C32 und C34 bestimmt. Diese Vorgehensweise konnten wir durch den Vergleich der Konfigurationen validieren, die durch chemischen Abbau erhalten wurden und somit als interner Standard dienten. Die Anwesenheit eines Aspartatrestes in der Ketoreduktase zeigt dabei

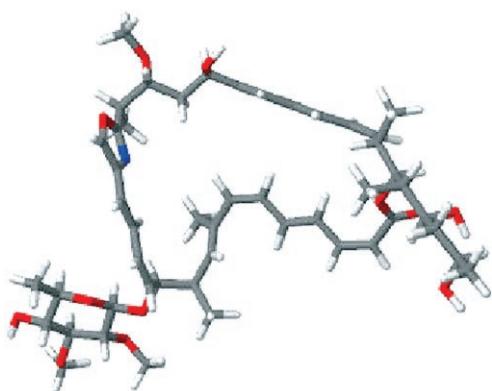


Abbildung 3: Berechnete Struktur von Chivosazol A (1).

an, dass der zugehörige Alkohol in **D**-Konfiguration gebildet wird. Die Abwesenheit dieses Aspartatrestes führt hingegen zur Bildung der **L**-Konfiguration. Die Anwendung dieser Vorgehensweise bestätigt die bereits etablierten Zentren an C30, C32 und C34 in der Seitenkette (Tabelle 3). Zusätzlich stimmt die Genanalyse mit der spektroskopischen Konfigurationszuweisung für C11, C20 und C22 überein.

Tabelle 3: Ausschnitt aus den Ketoreduktase-Domänen der Chivosazol-Polyketid synthase (jeweils Aminosäuren 146–155).

KR	Zentralregion ^[a]	KR-Produkt ^[b]
KR1	AGVLR <u>D</u> GCL	C34 (D)
KR2	ALSYQ <u>G</u> PLA	C32 (L)
KR3	ALR <u>L</u> ED <u>R</u> TI	C30 (D)
KR4	AGLAP <u>S</u> SNVA	DB
KR5	AGVLR <u>D</u> GLAV	DB
KR6	ATV <u>M</u> R <u>D</u> RSLV	DB
KR7	AGGTDATRIG	C22 (L)
KR8	ATTL <u>A</u> D <u>GL</u> LA	C20 (D)
KR10	AGEMRTSTPA	DB
KR11	AGLIR <u>D</u> ALIP	DB
KR12	AFLFASEPLA	C11 (L)
KR13	AMVL <u>A</u> D <u>RT</u> LM	DB
KR14	AGLADHERPA	DB
KR15	AGVLR <u>D</u> ALIP	DB
KR16	ALVLHQ <u>R</u> SLA	DB

[a] Aspartat ist grau unterlegt. [b] Absolute Konfiguration der KR-Produkte 1, 2, 3, 7, 8 und 12 in Klammern. Die übrigen KR-Domänen führen nach Eliminierung von Wasser zur Bildung von Doppelbindungen (DB).^[12]

Wir berichten hier erstmals über die Konfigurationsbestimmung eines Naturstoffs durch die Kombination von klassischer Strukturzuweisung und Genanalyse. Einige Bereiche des Moleküls wurden mit drei unabhängigen Vorgehensweisen analysiert: chemischer Abbau und Synthese, Analyse der NMR-Daten in Kombination mit rechnergestützter Konformationsanalyse und Zuweisung der Aminosäuresequenz. Alle drei Vorgehensweisen kommen unabhängig zur selben Konfiguration, und nur die Kombination dieser drei Methoden ermöglichte eine verlässliche Zuweisung der dreidimensionalen Struktur von Chivosazol A (**1**) (Abbildung 4).

Eingegangen am 22. Dezember 2006
Online veröffentlicht am 15. Mai 2007

Stichwörter: Chivosazole · Ketoreduktase · Konfigurationszuweisung · Molecular Modeling · NMR-Spektroskopie

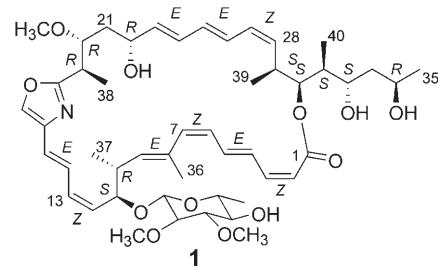


Abbildung 4. Absolute Konfiguration von Chivosazol A (**1**).

- [1] a) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, D. Schomburg, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 111–119; b) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, D. Schomburg, V. Wray, G. Höfle, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 6031–6034; c) H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 7–13.
- [2] R. Jansen, H. Irschik, H. Meyer, H. Reichenbach, V. Wray, D. Schomburg, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1995**, 867–872.
- [3] a) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 759–773; b) H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 31–35.
- [4] R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1997**, 1725–1732.
- [5] Hierzu verwandte Ansätze: a) R. K. Kondru, P. Wipf, D. N. Berantan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2204–2205; b) S. Kiren, L. J. Williams, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2905–2908; c) N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 866–876; d) J. Hassfeld, F. Christophe, H. Steinmetz, T. Carlonagno, D. Menche, *Org. Lett.* **2006**, 8, 4751–4754.
- [6] a) S. D. Rychnovsky, B. N. Rogers, T. I. Richardson, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 9–17; b) D. A. Evans, D. L. Rieger, J. R. Gage, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7099–7100.
- [7] C. R. Landis, L. L. Luck, J. M. Wright, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, 109, 44–59.
- [8] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.* **1990**, 11, 440–467.
- [9] a) G. Chang, C. Wayne, W. C. Guida, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4379–4386; b) M. Saunders, K. N. Houk, Y. D. Wu, W. C. Still, M. Lipton, G. Chang, W. C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1419–1427.
- [10] W. C. Still, A. Tempzyk, R. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6127–6129.
- [11] C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. De Leeuw, C. Altona, *Tetrahedron* **1980**, 36, 2783–2792.
- [12] O. Perlova, K. Gerth, O. Kaiser, A. Hans, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2006**, 121, 174–191.
- [13] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, 42, 72–79.
- [14] P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, 4, 654–657.