

Chlorotonil A, ein Macrolid mit einzigartiger *gem*-Dichlor-1,3-dionfunktion aus *Sorangium cellulosum*, So ce1525**

Klaus Gerth, Heinrich Steinmetz, Gerhard Höfle und Rolf Jansen*

Im Verlauf unserer Suche nach biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien fanden wir Stämme des Genus *Sorangium cellulosum* als Produzenten von Naturstoffen mit faszinierenden Strukturen, die vielfältige biologische Aktivitäten zeigen und sich daher als Wirkstoffe oder Leitstrukturen eignen.^[1] Unter ihnen finden sich hochwirksame Antibiotika wie die antimykotischen Soraphene^[2] oder die antibakteriellen Sorangicine^[3] und Thuggacine^[4] sowie die Epothilone als Tumortheraeutika.^[5]

Gewisse *Sorangium-cellulosum*-Stämme, z. B. Stamm So ce1525, sind sogar fähig, mehrere Naturstofffamilien mit komplexen Strukturen aus unterschiedlichen Substanzklassen gleichzeitig zu erzeugen. HPLC/MS-Analysen zufolge produziert dieser Stamm nicht nur Sorangicine, sondern auch Sorangiolide^[6] (Macrolidcarbonsäuren), Disorazole^[7] (Oxazolbislactone) sowie zuvor unbekannte Homologe der Chivosazole^[8] (Macrolidglycoside, die einen Oxazolring enthalten). Des Weiteren belegten HPLC/MS-Analysen des Stammes So ce1525 das Vorhandensein eines neuartigen, chlorhaltigen Metaboliten (Chlorotonil A). Hier beschreiben wir die Isolierung sowie spektroskopische und röntgenographische Strukturaufklärung von Chlorotonil A (**1**, Abbildung 1).

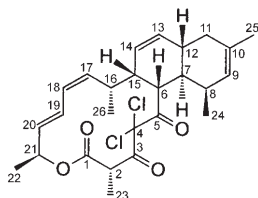


Abbildung 1. Absolute Konfiguration von Chlorotonil A (**1**).

[*] Dr. K. Gerth, Dipl.-Ing. H. Steinmetz, Prof. G. Höfle, Dr. R. Jansen
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-6027-9499
E-Mail: rolf.jansen@helmholtz-hzi.de
Homepage: http://www.helmholtz-hzi.de/en/research_groups/other_research_groups/microbial_drugs/

[**] Wir danken N. Dankers, K. Schober und K.-P. Conrad für ihre Mitarbeit bei der Isolierung und Fermentation ebenso wie A. Roß, H. Schüler und R. Krützfeld und ihren Mitarbeitern für die Unterstützung bei Fermentation und Aufarbeitung der Fermentationsbrühe sowie V. Wray, B. Jaschok-Kentner und C. Kakoschke für die Aufnahme der NMR-Spektren (HZI). Unser besonderer Dank gilt H.-J. Hecht (HZI) sowie N. Rahn, A. Kena Diba und M. Wiebecke (Leibniz-Universität Hannover) für die Röntgenstrukturanalyse.

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

Durch Zentrifugieren wurden 2.65 kg Adsorberharz Amberlite XAD 16 und Zellmasse aus 70 L Fermentationsbrühe^[9] von *S. cellulosum*, Stamm So ce1525, abgetrennt und schrittweise mit Methanol und Aceton extrahiert. Zur Entfernung polarer Verunreinigungen wurden alle Chargen im Vakuum eingengt und die verbliebenen wässrig-ölgigen Mischungen zwischen Wasser und CH₂Cl₂ verteilt. Zur Abtrennung lipophiler Nebenprodukte wurde jeder CH₂Cl₂-Extrakt zwischen Methanol und Heptan verteilt. Dabei entwickelte sich in den Methanolphasen ein weißlicher Niederschlag, der durch Filtration abgetrennt wurde; so wurden insgesamt 5.4 g **1** erhalten, entsprechend einer Ausbeute an isoliertem Produkt von ca. 77 mg L⁻¹ Fermentationsbrühe. Für die Analyse wurde das Material durch Kieselgel-Flash-Chromatographie mit einem Gradienten von CH₂Cl₂ in Petrolether (PE) gereinigt. Abschließend wurde **1** aus CH₂Cl₂/MeOH, CH₂Cl₂/PE oder reinem CH₂Cl₂ kristallisiert.

Chlorotonil A (**1**) wurde in Form weißer Kristalle isoliert, die bei 197–198 °C schmelzen. Seine Summenformel wurde durch hochauflösende (HR-)ESI-MS des Moleküliions [M+H]⁺ (*m/z*: gef. 479.1762; ber. 479.1756) und sein Isotopenmuster im (+)-DCI-MS-Spektrum^[10] in Übereinstimmung mit den ¹³C-NMR- und ¹³C-DEPT-Spektren zu C₂₆H₃₂Cl₂O₄ bestimmt. Dementsprechend wurden zehn Doppelbindungsäquivalente für **1** berechnet. Während das UV-Spektrum in MeOH nur eine breite Absorptionsbande um 232 nm zeigt, lässt das IR-Spektrum in KBr anhand dreier intensiver, scharfer Banden bei 1755, 1742 und 1714 cm⁻¹ klar auf das Vorhandensein von Ester- oder Ketofunktionen schließen.

Die Löslichkeit von **1** ist in den meisten organischen Lösungsmitteln gering. Da es in Chloroform jedoch ausreichend löslich ist, wurden die NMR-Spektren in CDCl₃ aufgenommen. Alle 26 Kohlenstoffsignale treten getrennt im ¹³C-NMR-Spektrum auf. Gemäß ihren chemischen Verschiebungen wurden drei Signale – bei δ_C = 196.8, 192.0 und 167.9 ppm – zwei Ketofunktionen und einer Ester- oder Lactonfunktion zugeordnet. Auf der Basis des ¹³C-DEPT-Spektrums wurden sieben von acht Signalen zwischen δ = 139.3 und 123.5 ppm olefinischen Methingruppen, das Signal bei δ_C = 70.2 ppm einer Oxymethingruppe und ein Signal bei δ_C = 38.3 ppm einer Methylengruppe zugeordnet. Ein im ¹³C-NMR-Spektrum bei δ_C = 81.5 ppm mit geringer Intensität auftretendes Signal, das jedoch im ¹³C-DEPT-Spektrum fehlte, wurde einem quartären Kohlenstoffatom zugeordnet. Dreißig Protonen konnten eindeutig mit ihren zugehörigen Kohlenstoffatomen durch HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy) korreliert werden. Die Signale der beiden restlichen Protonen waren wegen ihrer Überlappung im ¹H-NMR-Spektrum zwischen δ_H = 2.15 und 2.17 ppm nicht

unterscheidbar; sie wurden den Methinkohlenstoffsignalen bei $\delta_C = 36.8$ und 33.3 ppm zugeordnet. Die ansonsten günstige Auftrennung der ^1H -NMR-Signale ermöglichte die Identifizierung von drei Hauptstrukturelementen **A**–**C** aus starken Vicinal- und schwächeren weitreichenden Korrelationen im COSY-Spektrum (Abbildung 2).

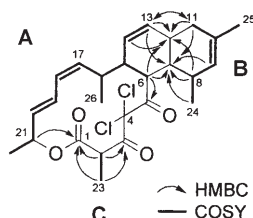


Abbildung 2. Strukturelemente aus ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektren und ausgewählte ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von **1**.

Alle aus dem COSY abgeleiteten Bindungen innerhalb der Strukturelemente **A**–**C** wurden durch HMBC (heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy) bestätigt (Tabelle 1). Darüber hinaus ergaben sich aus dem HMBC-Spektrum die Verknüpfungen dieser Strukturelemente (Abbildung 2). Die Fragmente **A** und **B** sind über Methin-7 und -12 verbunden. Diese müssen selbst miteinander verknüpft sein, da beide Kohlenstoffatome C7 und C12 jeweils eine

HMBC-Korrelation mit den H-7/H-12-Signalen mitten zwischen den symmetrischen Dubletts ihrer jeweils direkten $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen aufweisen. Die relative Orientierung von **A** und **B** kann aus den HMBC-Korrelationen von C7 mit Methyl-24, H-8 und H-9 einerseits und mit H-6 andererseits hergeleitet werden. Kombiniert belegen die HMBC-Korrelationen das Vorhandensein eines ungesättigten Decalinsystems, wie in Abbildung 2 gezeigt. Die HMBC-Korrelation von C5 ($\delta_C = 196.7$ ppm) mit H-6 ermöglicht die Verknüpfung der Ketonfunktion mit Methin-6 und bietet somit eine Erklärung für die chemische Verschiebung des aliphatischen H-6 bei $\delta_H = 3.77$ ppm. Ebenso weist das Carbonyl-C3-Atom ($\delta_C = 192.0$ ppm) HMBC-Korrelationen mit H-2 und H₃-23 auf; dies lässt auf eine Verknüpfung der zweiten Carbonylgruppe mit dem Strukturelement **C** schließen. Weiterhin ist die C1-Position der Ester- oder Lactonfunktion ($\delta_C = 167.9$ ppm) mit H-2 und H₃-23 korreliert und zeigt ein kleines HMBC-Signal zusammen mit H-21, wodurch die Ester/Lacton-Bindung zwischen den Fragmenten **A** und **C** angezeigt wird. Das wird durch die deutliche Acylverschiebung der Allylposition H-21 bei $\delta_H = 5.70$ ppm gestützt. Die letzte, noch nicht zugeordnete C4-Position muss also beide Chlortome tragen und kann in die einzig verbliebene Position zwischen die Ketofunktionen platziert werden, wodurch sowohl ihre chemische Verschiebung von $\delta_C = 81.6$ ppm als auch das Fehlen jeglicher HMBC-Korrelationen eindeutig erklärt werden.

Tabelle 1: NMR-spektroskopische Daten von Chlorotonil **A** (**1**) in CDCl_3 .^[a]

H	δ_H	m	J [Hz]	COSY ^[b]	ROESY ^[b,c]	C	δ_C	m	HMBC ^[d]
–						1			23, 2 > 21
2	4.54	q	7.0	23	–	2	47.0	d	23
–						3			23, 2
–						4			–
–						5			6 > 14
6	3.77	dd	11.8, 6.7 (br.)	12/7 ^[e] > 15 > 11	(15) 12(/7), ^[e] 24	6	49.6	d	14, 12/7 > 15, 16
7				6, 11 > 8 > 14, 13	26, 24, 14, 8	7	36.7	d	24 > 6, 11 α > 13, 9 not 12!
8				24, 9 > 12/7 > 25	> 12/7	8	30.1	d	24 > 9
9	5.38	d	5.3 (br.)	25, 8, 11 β > 11 α > 24	8, 25 > 24	9	128.0	d	25, 24 > 11 > 8
–						10			25, 11 $\alpha\beta$ > 8
11 α	2.03	dd	16.9, 4.1	12/7 > 6, 9 > 13	25, 13	11	38.3	t	25 > 13, 9 > 6 (14)
11 β	1.75	dd	16.9, 9.5 (br.)	12/7, 6 > 9, 8 > 13	–				
12				6, 11 > 8 > 14, 13	26, 24, 14, 8	12	30.3	d	6, 13, 7, 11 > 8, 14
13	5.74	d	10.2 (br.)	14 > 15 > 12/7	11 α , 12(/7)	13	133.1	d	15, 14, 6, 12/7, 11
14	5.50	ddd	10.2, 4.6, 1.9	13, 15 > 12/7	17 > 26	14	123.5	d	13, 16, 15 ((12/7))
15				6, 14 > 13, 16 > 12/7	19 (16, 6)	15	42.7	d	26 > 13, 14, 6 > 18, 16, 17
16				26, 17 > 15, 18	19 (17)	16	33.3	d	26 > 6, 18, 17 > 15, 13, 14
17	5.30	ddq	10.4, 8.4, 0.8	18, 16 > 19	14, 26	17	139.3	d	26, 19, 16 > 21, 20, 15
18	5.87	dd	10.4, 11.2 (br.)	19, 17 > 20	20	18	125.4	d	20, 19 > 21, 16, 26
19	6.05	dddd	15.3, 11.2, 1.8, 1	18, 20 > 21, 17	16, 17 > 21	19	123.9	d	18, 17, 21 > 22, 20
20	5.50	dd	15.3, 2.4 (br.)	19, 21 > 18, 17	18, 23	20	130.2	d	22, 18 > 19
21	5.60	ddq	2.2, 2.4, 6.7 (br.)	22 > 20, 19	> 19	21	70.3	d	22, 19, 20
22	1.32	d	6.5	21	20	22	20.9	q	21, 20 > 19
23	1.65	d	7.0	2	–	23	17.0	q	2
24	0.83	d	7.0	8 > 9	6, 12(/7), 9	24	14.8	q	25, 12/7 > 11, 6 > 8 > 9, 17
25	1.66	ddd	1, 1, 1	9, 11 α , 8	9, 11 α	25	23.2	q	9, 11 α
26	0.95	d	6.5	16	17, (12/7)	26	15.6	q	17 > 15, 16

[a] ^1H -NMR (600 MHz), ^{13}C -NMR (75 MHz); ^{13}C -Multiplizitäten wurden aus dem DEPT-Spektrum entnommen. [b] Die Nummern der Protonen, die mit ^1H -NMR-Signalen korrelieren, sind nach absteigender Intensität sortiert. [c] Einige vicinale NOE-Korrelationen sind in Klammern angegeben. [d] Die Nummern der Protonen, die mit ^{13}C -NMR-Signalen korrelieren, sind in ^{13}C -Reihen nach absteigender Intensität sortiert. [e] Die Signale von H-7 und H-12 überlappen.

Langsames Umkristallisieren von **1** aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ergab für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle (Abbildung 3). Die Analyse wurde auf $R_1 = 0.0497$ ($wR_2 = 0.0939$) verfeinert. Die absolute Konfiguration der acht Stereozentren in **1** lautet demnach 2*S*, 6*R*, 7*R*, 8*R*, 12*R*, 15*S*, 16*R*, 21*S*.^[11,12]

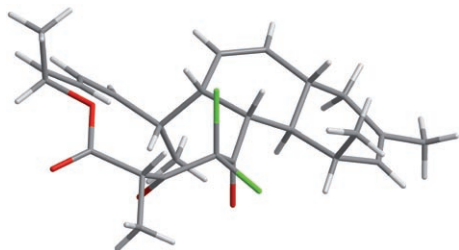


Abbildung 3. Molekülstruktur von Chlorotonil A (**1**) aus der Röntgenstrukturanalyse; rot O, grün Cl, grau C, weiß H.

Für einen Vergleich der Konfiguration in Lösung mit derjenigen im festen Zustand wurden die stereochemischen Informationen der NMR-Daten analysiert. Obwohl H-7 und H-12 im 1D- ^1H -NMR-Spektrum überlappen, konnte die relative Konfiguration des zweifach ungesättigten Decalinsystems aus den 1D- ^1H - und 2D- ^1H - ^1H -ROESY-NMR-Daten abgeleitet werden (Tabelle 1). Der stärkste Kern-Overhauser-Effekt (NOE) von Methyl-24 ist der mit H-6, was belegt, dass beide auf einer Seite des Systems („Oberseite“) angeordnet sind. Demnach befindet sich H-7 entsprechend der *trans*-Axialkopplung $J_{6,7} = 11.8$ Hz auf der gegenüberliegenden Seite („Unterseite“). Die andere starke ROESY-Korrelation beider Gruppen – H-6 und Methyl-24 – mit dem Multiplett H-7/12 wird dann allein durch H-12 verursacht und zeigt die 7,12-*trans*-Konfiguration an, durch die H-6, H-12 und Methyl-24 axial in einem Dreieck auf der Oberseite fixiert werden. Die Vicinalkopplung $J_{6,15} = 6.7$ Hz erfordert eine axial-äquatoriale Beziehung von H-6 mit H-15. Folglich besetzt die Seitenkette an der Position 15 der Decalineinheit eine axiale Position in Richtung der Unterseite des Moleküls. Eine ROESY-Korrelation der α -Methylgruppe an Position 26 mit H-7 ist nur durch deren Drehung in Richtung auf die Decalineinheit möglich, so wie sie in der Molekülstruktur von **1** gefunden wurde (Abbildung 3). Infolge dieser Drehung und der äquatorialen Ausrichtung der C5-C6-Bindung liegt der Hauptteil des Lactonringes fast in einer Ebene mit dem *trans*-Decalinsystem. Im ^1H -NMR-Spektrum kann aus den vicinalen Kopplungskonstanten 10.4 und 15.3 Hz eine $\Delta^{17,18}$ -*cis*- bzw. eine $\Delta^{19,20}$ -*trans*-Konfiguration der Doppelbindungen hergeleitet werden. Eine ungestört planare *s-trans*-Anordnung des Diens wird durch die Kopplungskonstante $J_{18,19} = 11.2$ Hz angezeigt und darüber hinaus durch einen NOE zwischen H-16 und H-19 untermauert, der die cisoidale Anordnung dieser beiden Positionen belegt. Aufgrund der räumlichen Lage von H-2 und Methyl-23 konnte aus den NMR-Daten keine Aussage über ihre relative Orientierung abgeleitet werden. Der Röntgenkristallstruktur zufolge liegt Methyl-23 in der Molekülebene. Die Chloratome zeigen

hingegen zur Oberseite und beide Ketofunktionen zur Unterseite des Moleküls.

Die *gem*-Dichlor-1,3-dionfunktion in Chlorotonil A (**1**) wurde zum ersten Mal als Strukturmerkmal in einem Naturstoff gefunden. Die biosynthetische Herkunft des Polyketids **1** aus *S. cellulorum* macht ein weiteres Mal deutlich, welches Potenzial Myxobakterien als Quelle für vielfältige Sekundärmetabolite aufweisen. Die Position der Δ^{13} -Doppelbindung in **1** lässt darauf schließen, dass das ungesättigte *trans*-Decalinsystem während der Biosynthese stereospezifisch über eine einstufige intramolekulare Diels-Alder-Reaktion eines α -Oxo-6-en-Dienophils mit einem 12,14-Dien-Zwischenprodukt aufgebaut wird (Abbildung 4).^[13] Derzeit finden weitere Untersuchungen zu den biologischen Eigenschaften, den Vorstufen der Biosynthese und der Isolierung von Chlorotonil-Varianten statt.

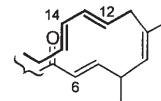


Abbildung 4. Wahrscheinliches Zwischenprodukt vor einer intramolekularen Diels-Alder-Reaktion zu **1**.

Eingegangen am 30. August 2007

Online veröffentlicht am 3. Dezember 2007

Stichwörter: Halogenverbindungen · Myxobakterien · Naturstoffe · Polyketide · Strukturaufklärung

- [1] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlowa, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, 106, 233–253.
- [2] a) N. Bedorf, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1017–1021; b) K. Gerth, N. Bedorf, H. Irschik, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1994**, 47, 23–31.
- [3] a) R. Jansen, V. Wray, H. Irschik, H. Reichenbach, G. Höfle, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 6031–6034; b) H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 7–13; c) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, D. Schomburg, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 111–119; d) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 213–222.
- [4] H. Steinmetz, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, R. Jansen, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 5822–5832.
- [5] a) G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1671–1673; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1567–1569; b) K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 560–563; c) G. Höfle, H. Reichenbach in *Anticancer Agents from Natural Products* (Hrsg.: G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman), CRC, Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2005**, S. 413–450.
- [6] R. Jansen, H. Irschik, H. Meyer, H. Reichenbach, V. Wray, D. Schomburg, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1995**, 867–872.
- [7] R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 759–773.
- [8] a) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 1725–1732; b) D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 4985–4988; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4898–4901.
- [9] K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 71–75.
- [10] (+)-DCI-MS (Isobutan): m/z (%) = 483 (11) 482 (14), 481 (62), 480 (23), 479 (100), 447 (17), 445 (71), 409 (4.9). Ber. für

- $[\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{O}_4 + \text{H}]^+$: m/z (%) = 483 (13), 482 (19), 481 (69), 480 (29), 479 (100).
- [11] R. Jansen, H. Irschik, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Handbook 16. Irseer Naturstofftage der DECHEMA* (Irsee, Deutschland) **2004**, S. 32.
- [12] CCDC 658473 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.
- [13] Siehe auch: Totalsynthese von Chlorotonil A: N. Rahn, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 607–609; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 597–599.
-