

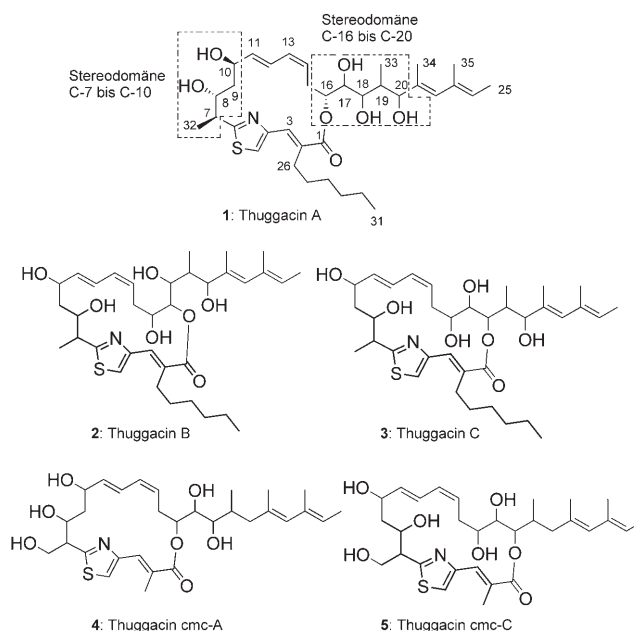
Strukturaufklärung

Bestimmung der relativen und absoluten Konfiguration von Thuggacin A–C, hochaktiven Antibiotika aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum***

Martin Bock, Kathrin Buntin, Rolf Müller und Andreas Kirschning*

Seit die Tuberkulose 1993 von der WHO zum globalen Gesundheitsnotfall erklärt wurde, ist sie wieder in den Blickpunkt der Forschung gerückt. Insbesondere die unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten durch verfügbare Antibiotika, die zunehmende Multiresistenz und das Auftreten von latenten Infektionen machen die Entwicklung von neuen Antibiotika, insbesondere solchen mit neuen Wirkmechanismen, unumgänglich.^[1] Die Thuggacine A (1), B (2) und C (3), polyketidische Naturstoffe, die kürzlich aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert wurden, zeigen eine starke antibiotische Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*. Angriffspunkt ist dabei die bakterielle Zellatmung.^[2] Des Weiteren wurde entdeckt, dass auch das Myxobakterium *Chondromyces cocatus* Cmc5 Thuggacinderivate produziert, nämlich Thuggacin cmc-A (4) und Thuggacin cmc-C (5).

Thuggacin A (1) (Schema 1) ist ein 17-gliedriges Makrolacton mit einem Thiazolring, einer Dien-Einheit (11*E*, 13*Z*), einem α,β -ungesättigten Lacton mit einer Hexylseitenkette an C-2 und einer komplexen Seitenkette an C-16, die drei Hydroxygruppen trägt und eine Dien-Einheit aufweist. Thuggacin B (2) hat die gleichen Strukturmerkmale, abgesehen von der Ringgröße: Das Lacton ist hier über O-17 statt über O-16 geschlossen. Beim Thuggacin C (3) wiederum erfolgt die Makrocyclisierung über O-18. Insgesamt verfügen die Thuggacine über acht stereogene Zentren. Die Konstitution der Thuggacine und erste Ergebnisse zur relativen Konfiguration wurden von Jansen et al. auf Basis von NMR-Daten bestimmt. Die verwendeten Methoden waren dafür



Schema 1. Thuggacin A (1) (relative Konfiguration an C-7, C-8, C-10 und C-16 wie von Jansen et al. publiziert)^[2] und Thuggacin B (2), C (3), cmc-A (4) und cmc-C (5).

geeignet, die starre Konformation des Ringsystems zu analysieren, konnten aber nicht auf die Stereozentren der frei rotierenden Seitenkette angewendet werden.

Um die Konfiguration der stereogenen Zentren in der Seitenkette aufzuklären, führten wir chemische Derivatisierungen in Kombination mit NMR-Analysen und Molecular Modeling durch. Außerdem nutzten wir die bioinformatische Analyse der Biosynthesegene von Thuggacinen als ein wichtiges Verfahren, um die durch chemische Methoden bestimmte absolute Konfiguration zu bestätigen. So wurden zuerst die relativen Konfigurationen der beiden Stereodomanen (C-7 bis C-10 und C-16 bis C-20) bestimmt und anschließend die korrekte Beziehung zwischen den beiden Domänen hergeleitet.

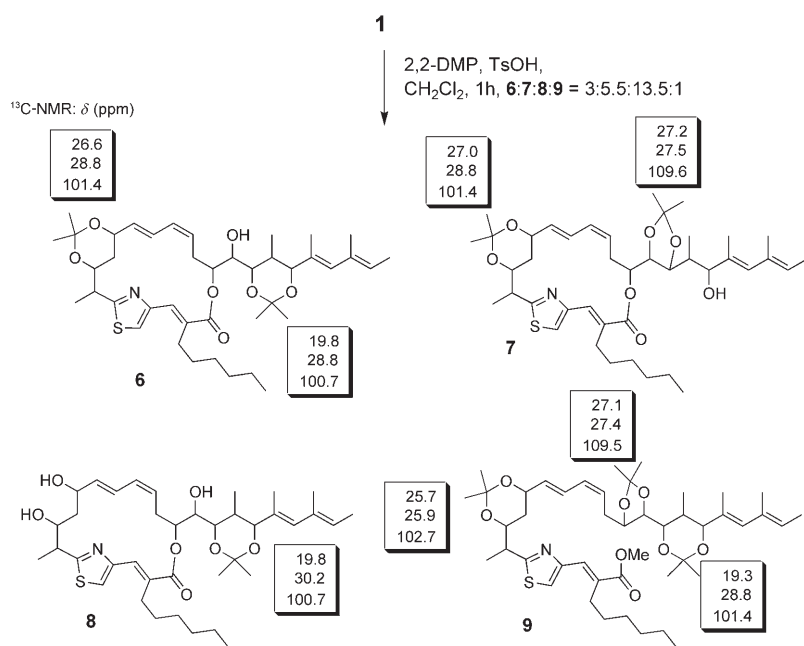
Da sechs der acht Stereozentren eine Hydroxygruppe aufweisen, war es naheliegend, die Versteifung ausgewählter Bereiche des Moleküls durch Schützung von 1,2- und 1,3-Diolen als Acetonide als Derivatisierungsstrategie zu wählen (Schema 2). Die Konstitution der Derivate 6–9 wurde mit ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie, unterstützt durch COSY, HMQC und HMBC und Vergleich mit dem Naturstoff, bestimmt. Zwei chemische Aspekte sind hierbei bemerkenswert: 1) die bevorzugte Bildung des 1,3-Acetonids (C-18/C-

[*] M. Bock, Prof. Dr. A. Kirschning
Institut für Organische Chemie und Biomolekulares
Wirkstoffzentrum (BMWZ), Leibniz-Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
Fax: (+49) 511-762-3011
E-Mail: andreas.kirschning@oci.uni-hannover.de

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

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken H. Irschik (HZI, Braunschweig) für die Fermentation von *Sorangium cellulosum* und R. Jansen (HZI, Braunschweig) für hilfreiche Diskussionen.

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



Schema 2. Bildung der Acetonide **6–9** und charakteristische ^{13}C -NMR-Signale der Acetonid-Kohlenstoffatome; 2,2-DMP = 2,2-Dimethoxypropan, TsOH = *para*-Toluolsulfonsäure.

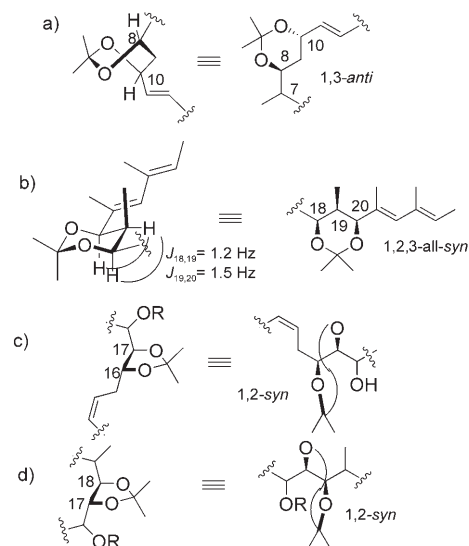
20) gegenüber dem 1,2-Acetonid (C-17/-C-18) und 2) die Bildung des acyclischen Methylesters **9**, der wichtig für die Absicherung der NMR-Daten der makrocyclischen Derivate **6–8** war. Tatsächlich sind die $\delta(^{13}\text{C})$ -Werte der Acetonid-Kohlenstoffatome an C-8/C-10 und C-18/C-20 des Methylesters **9** vergleichbar mit denen der makrocyclischen Derivate **6–8**.

Die gewonnenen Daten belegen eindeutig, dass die Konformationen der Acetonide nicht durch den Makrocyclus verzerrt werden. Somit konnte Rychnovskys Methode^[3,4] zur Bestimmung der relativen Konfiguration von 1,3-Diolen über die jeweiligen 1,3-Dioxane zuverlässig Anwendung finden. So wurde für das 1,3-Diol an C-8/C-10 die *anti*-Konfiguration bestimmt. Unter Einbeziehung der vicinalen Kopplungskonstanten ($^3J_{\text{HH}}$) zwischen 18-H/19-H und 19-H/20-H, die beide etwa 1.5 Hz betragen, kann die relative Konfiguration der Stereotriade C-18–C-20 als all-*syn* bestimmt werden. Des Weiteren liefern die als Dioxolan geschützten 1,2-Diole in **7** und **9** Informationen zur relativen Konfiguration an C-16/C-17 und C-17/C18,^[5,6] die jeweils als 1,2-*syn* bestimmt wurden (Schema 3).

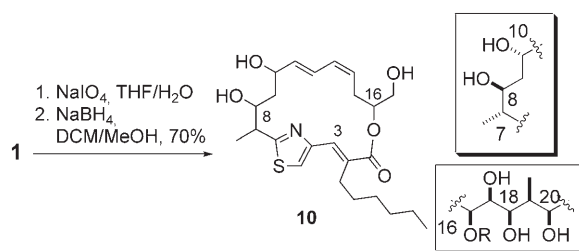
Eine endgültige Zuweisung der relativen Konfiguration aller Stereozentren im Makrocyclus (C-7, C-8, C-10, C-16) konnte nach oxidativer Abspaltung der Seitenkette erreicht werden. Der intermediär erhaltene Aldehyd wurde sofort zum Triol **10** reduziert, um ausreichend gut aufgelöste NMR-Spektren zu erhalten (Schema 4). Neben der Bestimmung von vicinalen Kopplungskonstanten wurden Molecular-Modeling-Studien (Merck-Krafft; MMFF) der vier möglichen Diastereomere, die durch die Variation der C-7- und C-16-Stereozentren in Bezug auf das C-8/C-10-*anti*-Diol von **10** entstehen, durchgeführt.^[7] Um die beobachteten nOe-Kopplungen zwischen den Atompaaren 7-H/10-H, 3-H/12-H und 5-H/26-H zu berücksichtigen, wurden die jeweiligen Abstände

in den Monte-Carlo-Konformationsanalysen auf einen Bereich zwischen 2 und 4.5 Å eingeschränkt. Die berechneten Strukturen aller vier Diastereomere wurden dann auf Widersprüche und Übereinstimmungen zwischen den Strukturen und den gemessenen NMR-Daten untersucht (z.B. vicinale ^1H -Kopplungskonstanten und nOe-Kopplungen).

In beiden C-7-*anti*-Strukturen würde 7-H eine *exo*-Position einnehmen, was jedoch im Widerspruch zu der starken 7-H/10-H-nOe-Kopplung steht (Tabelle 1). Also wird der Methylgruppe an C-7 eine *syn*-Konfiguration in Bezug auf die C-8-Hydroxygruppe zugewiesen. Dies wird weiter durch die beobachtete Kopplungskonstante zwischen 9-H-*exo* und 10-H bestätigt, die bei 10 Hz liegt. Ähnliche Ergebnisse liefert auch die Untersuchung des C-16-Zentrums: 15-Ha besitzt zwei vicinale Kopplungskonstanten von etwa 10 Hz, was jeweils Diederwinkeln von 160–170° entspricht. Der berechnete Diederwinkel 15-Ha, C-15, C-16, 16-H beträgt bei der einen Konfiguration 165° und bei der entgegengesetzten Konfiguration 60° (Tabelle 1).^[8] Dies



Schema 3. Relative Konfigurationen von 1,3-Dioxolanen und 1,3-Dioxanonen.



Schema 4. Glycolspaltung von Thuggacin A (**1**) und die relative Konfiguration beider Stereodomen.

Tabelle 1: Ausgewählte Strukturmerkmale der vier Diastereomere von Triol **10**.

Isomer	7-H	Diederwinkel 15-Ha,C-15,C-16,16-H
10	endo	167°
7- <i>epi</i> - 10	exo	162°
16- <i>epi</i> - 10	endo	62°
7,16- <i>epi</i> - 10	exo	64°

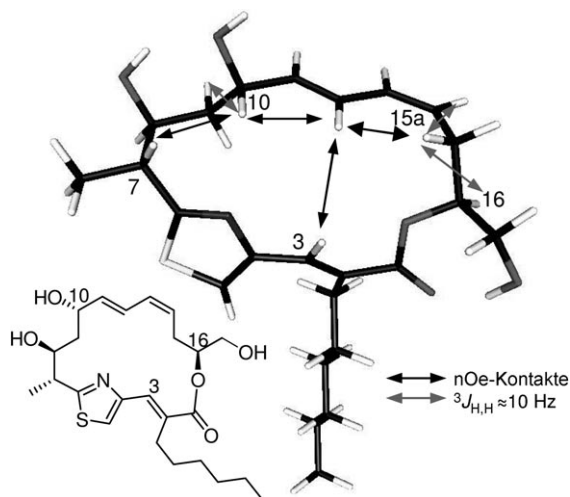
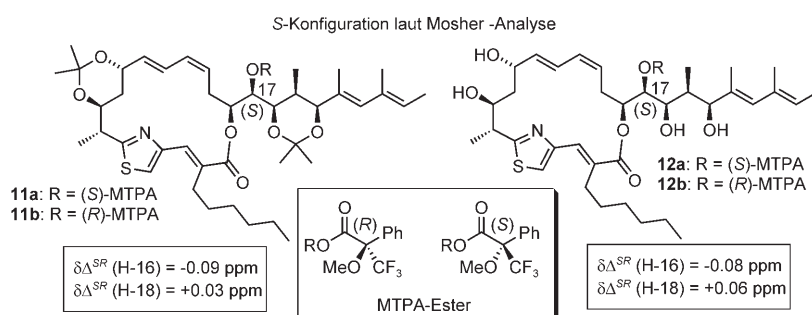


Abbildung 1. Berechnetes Modell von **10** und ausgewählte NMR-Daten; die Nummerierung bezieht sich auf Schema 1.

weist klar auf die in Abbildung 1 gezeigte Konfiguration hin. Tatsächlich sieht die in Abbildung 1 gezeigte Struktur der für Thuggacin A (**1**) berechneten sehr ähnlich.^[2] Durch Kombination aller gesammelten Daten kann die vollständige relative Konfiguration von Thuggacin A (**1**) abgeleitet werden (Schema 4 und Abbildung 1).

Abschließend wurde die absolute Konfiguration durch Überführung von Diacetonid **6**, das eine freie Hydroxygruppe an C-17 aufweist, in die Ester **11a** und **11b** und anschließende Analyse nach Mosher bestimmt (Schema 5).^[9] Aus den berechneten $\Delta\delta$ -Werten konnte die Konfiguration des C-17-Zentrums als *S* bestimmt werden. Gestützt wurde die Bestimmung durch die Analyse der Tetraole **12a** und **12b**, die



Schema 5. Konfigurationsbestimmung von Thuggacin A (**1**) durch Mosher-Derivatisierung von **6**. Der *R*-MPTA-Ester wurde aus dem *S*-MPTA-Chlorid erhalten und umgekehrt, siehe Hintergrundinformationen. MPTA = α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenyllessigsäure.

nach Entfernung der Isopropylidenschutzgruppen erhalten wurden. Die vergleichbaren $\Delta\delta$ -Werte belegen, dass der benachbarte 1,3-Dioxanring die Mosher-Analyse von **11a** und **11b** nicht verfälscht.

Seit kurzem ist es möglich, die Stereochemie, die aus einer Ketoreduktion in der Polyketidbiosynthese resultiert, auf Grundlage einer bioinformatischen Analyse der entsprechenden Domänen in den Polyketidsynthasemodulen vorherzusagen.^[11–13] Diese Methode ist besonders nützlich, wenn der Zugang zum Naturstoff und somit auch der Zugang zu ausreichenden Mengen von Abbaufragmenten für die Konfigurationsanalyse begrenzt ist. Allerdings müssen die Biosynthesegene identifiziert und analysiert werden. Im Laufe dieser Untersuchungen wurde eine Methode zur Geninaktivierung in *Chondromyces crocatus* Cm c5 genutzt, mit der der Gencluster der Chondramidbiosynthese identifiziert werden konnte. Da dieses Myxobakterium auch die Thuggacinderivate Thuggacin cmc-A (**4**) und Thuggacin cmc-C (**5**) produziert, begannen wir aufgrund der Annahme einer hochgradig analogen Biosynthese von Thuggacin A (**1**) und Thuggacin cmc-C (**5**) den zugehörigen Gencluster in *C. crocatus* Cm c5 zu identifizieren. Die Inaktivierung eines Polyketidsynthase-Kandidaten führte tatsächlich zum Verlust der Thuggacin-cmc-C-Produktion in *C. crocatus* Cm c5. Dies ermöglichte die Klonierung und Sequenzierung des gesamten Biosynthesegenclusters, der für einen komplexen Hybriden aus Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthasen codiert. Der Analyse der Ketoreduktasedomänen in der PKS folgte die Bestimmung der Schlüsselaminosäuren zur Vorhersage der absoluten Konfiguration sekundärer Alkohole nach Caffrey und Reid et al.^[11] Dies ermöglichte uns, die Konfiguration an den Positionen C-18, C-16, C-10 und C-8 vorherzusagen (Tabelle 2). Lediglich die Bestimmung von C-10 ist etwas unklar, da die konservierten Aminosäuren nicht vollständig mit dem Konsens übereinstimmen. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf Thuggacin A (**1**) bestätigte die vorhergesagte Konfiguration. Obwohl die durch Cm c5 produzierten Thuggacine keine Hydroxygruppe an C-20 aufweisen, muss in der Biosynthese ein entsprechendes Intermediat gebildet werden, was die Vorhersage von C-20 ebenfalls ermöglicht.

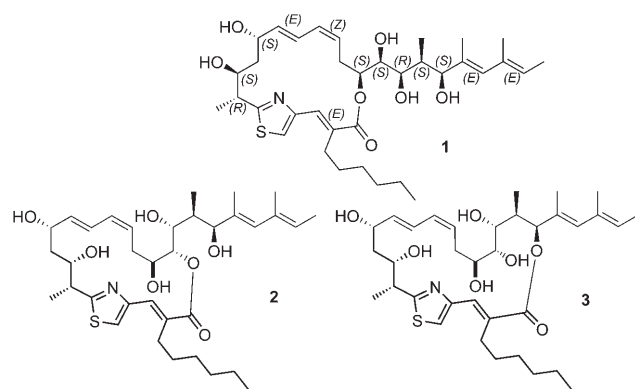
Durch Kombination der hier gegebenen Daten kann die vollständige relative Konfiguration von Thuggacin A (**1**) (Schema 4 und Abbildung 1) abgeleitet werden. Für C-7, C-8, C-10 und C-16 stimmen alle unsere Zuordnungen mit denen von Jansen et al. überein.^[2] Schema 6 fasst die Bestimmung der relativen und absoluten Konfiguration von Thuggacin A (**1**) zusammen. Aufgrund der gemeinsamen Biosynthese und der beobachteten Umlagerung von Thuggacin A (**1**) zu Thuggacin B (**2**) und C (**3**) wurden deren Konfigurationen entsprechend zugeordnet. Diese Annahme stimmt vollständig mit der großen Übereinstimmung der spektroskopischen und physikalischen Daten der Thuggacine A–C überein.^[2]

Zusammenfassend gelang die vollständige stereochemische Zuordnung der antibio-

Tabelle 2: In den Polyketidsynthesedomänen gefundene Ketoreduktase (KR)-Typen, die an der Thuggacin-Biosynthese beteiligt sind, sowie die zugehörigen Stereozentren mit der vorgeschlagenen absoluten Konfiguration (C-20, C-18, C-16, C-10, C-8).^[a]

Ketoreduktase	Typ	Konfiguration
KR1 TugA	B-Typ	DB <i>trans</i>
KR2 TugA	B-Typ	DB <i>trans</i>
KR3 TugA	B-Typ	C-20 (S)
KR1 TugB	B-Typ	C-18 (R)
KR2 TugB	B-Typ	C-16 (S)
KR1 TugC	A-Typ	DB <i>cis</i>
KR2 TugC	B-Typ	DB <i>trans</i>
KR1 TugD	A-Typ	C-10 (S)
KR2 TugD	A-Typ	C-8 (S)
KR3 TugD	B-Typ	DB <i>trans</i>

[a] Den Reaktionen aller anderen Ketoreduktasen folgt Wassereliminierung, was zu Doppelbindungen im Zielmolekül führt. Vorhergesagte Doppelbindungskonfigurationen und absolute Konfigurationen der Alkohole sind angegeben (siehe Hintergrundinformationen).



Schema 6. Absolute Konfiguration der Thuggacine A–C (1–3).

tischen Makrolide Thuggacin A, B und C als 2*E*,7*R*,8*S*,10*S*,11*E*,13*Z*,16*S*,17*S*,18*R*,19*S*,20*S*,21*E*,23*E* auf Grundlage von Hochfeld-NMR-Studien, chemischen Derivatisierungen und Molecular Modeling. Endgültige Sicherheit über die absolute Konfiguration von fünf Stereozentren konnte aus der bioinformatischen Analyse der an der Biosynthese beteiligten Proteine gewonnen werden, wofür diese Arbeit eines der ersten Beispiele ist.^[12,13]

Eingegangen am 22. Oktober 2007,
veränderte Fassung am 26. November 2007
Online veröffentlicht am 14. Februar 2008

Stichwörter: Antibiotika · Genanalyse · Makrolactone · Mosher-Ester · Strukturaufklärung

- [1] J. D. McKinney, *Nat. Med.* **2000**, 6, 1330–1333.
- [2] H. Steinmetz, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, R. Jansen, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 5822–5832.
- [3] S. Rychnovsky, D. J. Skalitzy, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 945–948.
- [4] Prognostizierte $\delta(^{13}\text{C})$ -Werte für die 1,3-*syn*-Konfiguration: $\text{Me}_{\text{ax}} \approx 20$ ppm, $\text{Me}_{\text{eq}} \approx 30$ ppm; 1,3-*anti*: beide Me ≈ 25 ppm. Bisweilen werden auch die $\delta(^{13}\text{C})$ -Werte der quartären C-Atome untersucht: $\delta < 100$ ppm (für 1,3-*syn*) und $\delta > 100$ ppm (für 1,3-*anti*).
- [5] G. Dana, H. Denechpajouh, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1980**, 395–399.
- [6] Prognostizierte $\delta(^{13}\text{C})$ -Werte für die 1,2-*anti*-Konfiguration: $\text{Me}_{\beta} \approx 25$ ppm, $\text{Me}_{\gamma} \approx 28$ ppm; 1,2-*syn*: beide Me ≈ 27 ppm.
- [7] a) 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; b) W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6127–6129.
- [8] Ein erzwungener Diederwinkel 15-Ha,C-15,C-16,16-H von 150–180° in 16-*epi*-**10** ist mit einem Energieanstieg von etwa 10 kcal mol^{−1} verbunden und ist nicht in Einklang mit den gemessenen NMR-Daten (vicinale ¹H-Kopplungskonstanten und nOe-Kopplungen, siehe Hintergrundinformationen).
- [9] a) J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 3732–3738; b) J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2543–2449; c) J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 17–117.
- [10] Ein Nebenprodukt der (S)-Ester-Bildung konnte als Thuggacin-B-Derivat von Diacetonid **6** identifiziert werden. Die NMR-Daten stimmen mit der Konfiguration überein, die aus den Acetalisierungsexperimenten abgeleitet wurde (siehe Hintergrundinformationen).
- [11] a) 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; b) P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, 4, 654–657.
- [12] a) D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 4985–4988; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4898–4901.
- [13] D. W. Udway, L. Zeigler, R. N. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P. R. Jensen, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 10376–10381.
- [14] Eine Analyse der Ketoreduktasedomänen findet sich in den Hintergrundinformationen.