

# Isolierung und Totalsynthese der Icumazole und Noricumazole – antimykotische Antibiotika und Kationenkanalblocker aus *Sorangium cellulosum*\*\*

Jenny Barbier, Rolf Jansen, Herbert Irschik, Stefan Benson, Klaus Gerth, Bettina Böhlendorf, Gerhard Höfle, Hans Reichenbach, Jens Wegner, Carsten Zeilinger, Andreas Kirschning\* und Rolf Müller\*

Myxobakterien sind bereits als gute Quelle für zahlreiche Sekundärmetabolite bekannt,<sup>[1]</sup> wobei die Gattung *Sorangium* die größte Anzahl neuer Substanzen lieferte.<sup>[2]</sup> Im Zuge unseres laufenden bioaktivitätsgeleiteten Screeningprogramms wurde ein bislang unbekanntes antimykotisches Spektrum von Aktivitäten im Extrakt von *S. cellulosum* So ce701 nachgewiesen. Dies führte schließlich zur Isolierung der einzigartigen Isochromanon- und Oxazol-enthaltenden Icumazole (**1a–c**).<sup>[3]</sup> Nachträglich konnten charakteristische Strukturelemente auch in den Noricumazolen (**2a–b**) wiederentdeckt werden.

Hier beschreiben wir umfassend die Icumazole (**1a–c**) und Noricumazole (**2a–c**), ihre Isolierung und Strukturaufklärung und auch Studien zu den jeweiligen Bioaktivitäten. Dabei wählten wir ein breites Spektrum verschiedener Methoden und Strategien, welche auf unterschiedlichen spektroskopischen Verfahren und der chemischen Ermittlung der jeweiligen relativen und absoluten Konfigurationen durch Derivatisierung, Abbau und Fragmentsynthese beruhen. Schließlich beweisen wir die Strukturzuweisung eindeutig durch die Totalsynthese von Noricumazol A (**2a**). Zusätzlich belegen wir unter Anwendung eines neuartigen Screeningkonzepts für oligomere Ionenkanäle einen Ionenkanalblockierenden Effekt von Noricumazol A (**2a**).

Zur Produktion der Icumazole (**1a–c**) wurde *S. cellulosum*, Stamm So ce960 bei 30 °C für 14 Tage in einem 100-L-Fermenter kultiviert, und die Icumazole wurden wie in den Hintergrundinformationen beschrieben isoliert. Die Icumazole (**1a–c**) konnten leicht anhand von UPLC-DAD-UV-Analysen über ihre UV-Spektren erkannt werden. Die Spektren zeigten eine intensive Hauptabsorption bei 302 nm mit Nebenbanden bei 290 und 316 nm, was charakteristisch für solche konjugierten kurzen Polyene ist. Das per HR-ESIMS bestimmte Molekül-Ion  $M^+$  des Signals bei  $R_t = 15.37$  min wies auf die molekulare Formel von  $C_{33}H_{45}NO_7$  für Icumazol A (**1a**) hin, welche mit den NMR-Daten übereinstimmte (Hintergrundinformationen, Tabelle S1). Die 33 im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum detektierten C-Atome wurden entsprechend ihres DEPT-Spektrums klassifiziert, einschließlich der drei Heteroatom-gebundenen austauschbaren Protonen, welche in den  $^1H$ -NMR-Spektren in  $[D_4]Methanol$  nicht sichtbar waren. Alle Protonen in den  $^1H$ -NMR-Spektren konnten eindeutig über  $^1H,^{13}C$ -HMQC-Spektren zu den zugehörigen Kohlenstoffatomen zugeordnet werden. Die Korrelationen im  $^1H,^1H$ -COSY-Spektrum lieferten vier Hauptdomänen (A–D; Abbildung 1). Das verbleibende ungesättigte Methin-Singulett (H19,  $\delta_{H/C} = 7.80/138.0$  ppm) wurde

[\*] Dr. R. Jansen,<sup>[4]</sup> Dr. H. Irschik, Dr. K. Gerth, B. Böhlendorf,<sup>[5]</sup> Prof. Dr. G. Höfle, Prof. Dr. H. Reichenbach, Prof. Dr. R. Müller  
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)  
Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe  
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)  
E-Mail: rom@mx.uni-saarland.de

J. Barbier,<sup>[4]</sup> Dr. S. Benson, J. Wegner, Prof. Dr. A. Kirschning  
Institut für Organische Chemie und Zentrum für Biomolekulare  
Wirkstoffe (BMWZ), Leibniz-Universität Hannover  
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)  
E-Mail: andreas.kirschning@oci.uni-hannover.de

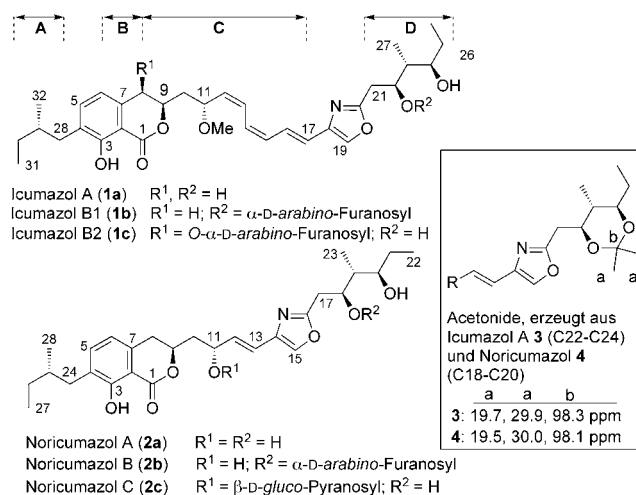
Dr. C. Zeilinger  
Institut für Biophysik, Leibniz Universität Hannover  
Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover (Deutschland)

[<sup>5</sup>] Derzeitige Adresse: DSM Nutritional Products Ltd., R&D Human  
Nutrition and Health, 4002 Basel (Schweiz)

[<sup>†</sup>] Diese Autoren trugen in gleichem Umfang zu diesem Projekt bei.

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch den Fonds der Chemischen Industrie finanziert (Stipendium für J.W.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106435> zu finden.



**Abbildung 1.** Icumazole A–B2 (**1a–c**), Noricumazole A–C (**2a–c**) und Acetonide **3** und **4** mit relevanten  $^{13}C$ -NMR-Daten und Aufklärung der relativen Konfigurationen. Die Nummerierung wurde aus Verständnisgründen so gewählt und ist nicht IUPAC-konform; A–D bezeichnen NMR-Domänen.

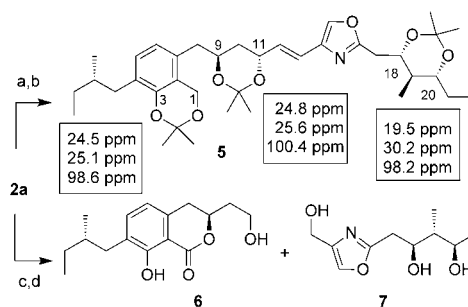
aufgrund seiner großen  $^1J_{\text{HC}}$ -Kopplungskonstante von 209 Hz als Teil eines heteroaromatischen Rings zugeordnet. Einschließlich der quartären Kohlenstoffatome C18 und C20 neben einem Stickstoff- bzw. einem Sauerstoffatom bildet dieses Methin-Kohlenstoffatom an C19 einen Oxazolring, der die Domänen C und D, wie durch ihre  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Korrelationen angedeutet, verknüpft (Tabelle S1 mit Abbildung). Die Ethergruppe an Position C11 in Domäne C ließ sich durch die HMBC-Korrelationen zwischen dem Oxymethin C11 und der Methoxygruppe C33 begründen. Das Isochromanonsystem konnte basierend auf den HMBC-Korrelationen der Strukturelemente A, B und C sowie den verbleibenden quartären Kohlenstoffatomen festgelegt werden. Obwohl ein direkter Beweis für einen Ringschluss zwischen C1 und C9 aus dem HMBC-Spektrum nicht zu erbringen ist, lässt einzig ein Lacton-Ring die Tieffeldverschiebung von H9 ( $\delta = 4.83$ ) und die chemische Verschiebung von C1 ( $\delta = 172.1$ ) begründen. Die (*Z,Z,E*)-Konfiguration der Trien-Einheit in **1a** wurde durch die vicinalen Kopplungskonstanten  $J_{12,13}$  und  $J_{14,15} = 11\text{--}12\text{ Hz}$  und  $J_{16,17} = 15.2\text{ Hz}$  hergeleitet. Eine ROESY-Korrelation zwischen H17 und H19 zeigte die cisoidale stereochemische Beziehung der Oxazol-Methin- und Trien-Methin-Kohlenstoffatome an C19 bzw. C17.

Zusätzlich konnten, neben substantiellen Mengen von Carolacton,<sup>[4]</sup> zwei stärker polare Icumazole entdeckt werden, die durch die charakteristischen UV-Spektren während der HPLC-UV-MS-Analyse der Extrakte auffielen. Die Elementarzusammensetzung  $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$  der Icumazole B1 (**1b**) ( $R_t = 14.0\text{ min}$ ) steht für eine zusätzliche  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ -Einheit, welche die Anwesenheit eines Pentosyl-Restes nahelegt. Auf Grundlage eines Vergleichs von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **1b** (Tabelle S2) mit den Literaturwerten, schlagen wir einen  $\alpha$ -arabino-Furanosylrest vor.<sup>[5]</sup> Details zur Strukturklärung von **1b** und **1c** sind in den Hintergrundinformationen zusammengefasst.

Im Unterschied zu den Icumazolen (**1a–c**), deren Oxazol-Trien-Chromophor im UV-Spektrum eine charakteristische Bande bei 290, 302 und 316 nm aufweisen, zeichnet sich Noricumazol A (**2a**) durch die Abwesenheit dieser Banden aus. Die Elementarzusammensetzung  $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{NO}_7$  wurde mittels HR-ESIMS anhand des  $[M+H]^+$ -Ionenclusters bei  $m/z$  502.2797 (berechnet: 502.2799) aufgeklärt. Die NMR-Daten des Isochromanons und der Oxazol-Einheiten in **2a** stimmten mit den für Icumazol A (**1a**) gemessenen überein (Tabelle S4). Dennoch offenbarte die kleinere Masse von 66 Da (entsprechend  $\text{C}_5\text{H}_6$ ) in Metabolit **2a** verglichen zu **1a** den Ersatz der Methoxy- durch eine Hydroxygruppe und den Verlust beider *Z*-Doppelbindungen. Die ROESY-Korrelation H13/H15 der cisoidalen Konformation zwischen dem Proton H13 der letzten *E*-Doppelbindung und des Oxazol-Protons H15 ähnelt der von **1a–c**. Analog zu den Icumazolen wurden neben Noricumazol A (**2a**) ( $R_t = 12.6\text{ min}$ ) zwei stärker polare Derivate isoliert. Noricumazol B (**2b**) ( $R_t = 11.4\text{ min}$ ) wurde als das zu Icumazol **1b** gehörige 18*O*- $\alpha$ -arabino-Furanosid identifiziert (Tabelle S5). Bei Noricumazol C (**2c**) ( $R_t = 10.9\text{ min}$ ) handelt es sich jedoch um ein 11*O*- $\beta$ -gluco-Pyranosid (für Details siehe die Hintergrundinformationen und Tabelle S6).<sup>[6]</sup>

Weder Icumazol A (**1a**) noch Noricumazol A (**2a**) lieferten geeignete Kristalle zur röntgenkristallographischen Analyse. Aus diesem Grund waren wir gezwungen, die Stereochemie aller stereogenen Zentren durch einen chemischen Ansatz zu bestimmen. Da es sich bei Noricumazol A (**2a**) im Vergleich zum Trien **1a** um den chemisch stabileren Naturstoff handelt, wurde die chemische Synthese von **2a** in Angriff genommen.

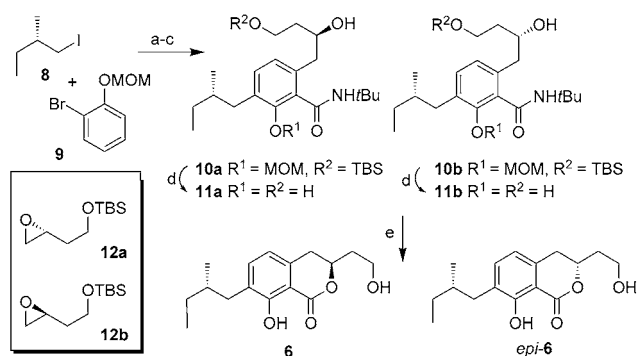
Zunächst wurde die relative Konfiguration der 1,3-Diol-Einheit durch Synthese der Acetonide **3** (**1a**, 2,2-Dimethoxypropan, *p*TsOH, RT, 60 min, 73 %) bzw. **4** (**2a**, 2,2-Dimethoxypropan, *p*TsOH, RT, 15 min, 67 %) mithilfe der Rychnovsky-Methode aufgeklärt (Abbildung 1).<sup>[7]</sup> Die Bestimmung der relativen Konfiguration erfolgte durch Analyse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten und der relevanten  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Kopplungskonstanten ( $J_{22,23} = 10.3\text{ Hz}$  und  $J_{23,24} = 10.1\text{ Hz}$  für **3** und  $J_{18,19} = 10.4\text{ Hz}$  und  $J_{19,20} = 10.0\text{ Hz}$  für **4**<sup>[8]</sup>) zu *anti,anti* (C22–C24 in **3** und C18–C20 in **4**). Infolgedessen schussfolgerten wir, dass die relative Konfiguration in der Stereotriade von Icumazol A (**1a**) und Noricumazol A (**2a**) identisch ist. Im nächsten Schritt wurde Noricumazol A (**2**) über eine Serie von Standardtransformationen in das Triacetamid **5** und in die Fragmente **6** und **7** überführt (Schema 1). Das Derivat **5** bestätigte



**Schema 1.** Synthese des Acetonids **5**, relevante  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten und Synthese der Fragmente **6** und **7** von Noricumazol A (**2a**). Reagentien und Bedingungen: a) **2a**,  $\text{LiBH}_4$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , 10 min; b) 2,2-Dimethoxypropan, *p*TsOH, RT, 10 h, 18 % (über zwei Stufen); c) **2a**, NMO,  $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , *t*BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$  bis RT, 4 h, 45 %; d) 1.  $\text{NaIO}_4$ , THF, 1.5 h; 2.  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (3:1), RT, 1 h, 32 % ausgehend von **6**, 98 % ausgehend von **7**. NMO = *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid, Ts = Tosyl.

die relative Konfiguration von Noricumazol A (**2a**) an C18–C20 (**2a**) und begründet die *anti*-Orientierung des Diols an C9 und C11. Anschließend wurden die Fragmente **6** und **7** unabhängig voneinander synthetisiert und mit authentischen Proben, erhalten aus der oxidativen Fragmentierung, verglichen. Dies ermöglichte den Nachweis der absoluten Konfiguration aller stereogenen Zentren, einschließlich dem an C25. Da die stereogenen Zentren zwischen C25 und C9 weit auseinander liegen, war eine Synthese beider diastereomeren Westfragmente **6** und *epi-6* notwendig.

Der phenolische Vorläufer **9** wurde zunächst über drei aufeinanderfolgende metallorganische Transformationen modifiziert, um die drei C-Substituenten einzuführen (Schema 2). Die  $\text{sp}^3$ - $\text{sp}^2$ -Kreuzkupplung mit dem (*S*)-Iodid **8**<sup>[9]</sup> erforderte die Lithiierung des Bromids und gelang idealerweise per MOM-Schätzung der phenolischen Gruppe. Nach

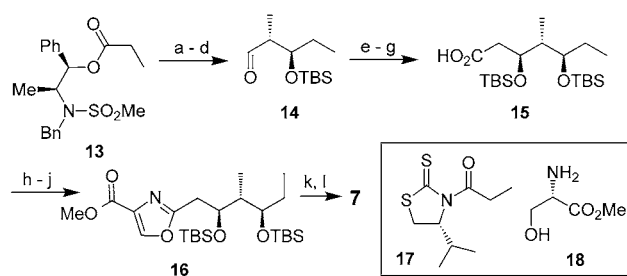


**Scheme 2.** Synthese der Westfragmente **6** und *epi-6*. Reagentien und Bedingungen: a) 1. (S)-**8**, Mg, THF,  $\Delta$ , 1 h, 2. **9**, HMTA, TMEDA, [Fe(acac)<sub>3</sub>], 0°C, 1.5 h, 98%; b) 1. *n*BuLi, TMEDA, Et<sub>2</sub>O, –30°C, 2 h, dann 3 h bei –5°C, 2. *t*BuNCO (10 Äquiv.), RT, 14 h, 94%; c) *n*BuLi (3 Äquiv.), TMEDA (3 Äquiv.), Et<sub>2</sub>O, –78°C → –40°C, 2 h, dann Zugabe von (S)-**12** (2 Äquiv.), –78°C → –40°C, 14 h, **10a**: 73% (99% basierend auf zurückgewonnenem Ausgangsmaterial); die gleiche Umsetzung über **12b** liefert **10b**: 81%; d) HCl<sub>konz.</sub>, EtOH, 50°C, 2.5 h, **11a**: 89%, **11b**: 94%; e) *p*TsOH, Toluol,  $\Delta$ , 30 min, **6**: 89%, *epi-6*: 95%. acac = Acetylacetonat; HMTA = Hexamethylentetramin; MOM = Methoxymethyl; TMEDA = Tetramethylethylendiamin.

erheblichen Optimierungen für die Eisen-katalysierte Variante<sup>[10,11]</sup> der Kumada-Reaktion<sup>[12]</sup> konnte das Kreuzkuppelungsprodukt in ausgezeichnete Ausbeute erhalten werden. Die zweite *ortho*-Position wurde anschließend wiederum durch Lithiierung gefolgt von einer Behandlung mit *tert*-Butylisocyanat funktionalisiert. Das resultierende Amid diente zur Dirigierung der nächsten *ortho*-Lithiierung gefolgt von Alkylierung. Hierbei wurden beide antipodalen Oxirane **12a,b**<sup>[13,14]</sup> eingesetzt, wodurch unabhängig voneinander die Addukte **10a** und **10b** erhalten wurden. Die Synthese der  $\delta$ -Lactone **6** und *epi-6* erfolgte nach Entfernung aller *O*-Schutzgruppen.

Die resultierenden Phenole **11a** und **11b** wurden anschließend unter sauren Bedingungen cyclisiert. Interessanterweise ist zu diesem Zeitpunkt der Synthese eine Unterscheidung der C24-Protonensignale beider Epimere **6** und *epi-6* im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum möglich. Dieses ist ein diagnostisches Kriterium für die Aufklärung der relativen Konfiguration zwischen C25 und C9.<sup>[15]</sup> Ein Vergleich (NMR- und CD-Spektroskopie; siehe Abbildung S1) mit Fragment **6**, welches durch oxidative Fragmentierung von Noricumazol A (**2a**) erhalten wurde, bewies die Identität des vom natürlichen und synthetischen Noricumazol A abgeleiteten Fragments **6** und belegt die absolute Konfiguration der stereogenen Zentren an C25 und C9 als (*S*). Folglich konnten wir bezugnehmend auf Acetonid **5** die Konfiguration an C11 als (*R*) festlegen. Setzt man die stereochemische Identität von Icumazol A (**1a**) und Noricumazol A (**2a**) voraus, lässt sich aus den gesammelten analytischen Daten das zusätzliche stereogene Zentrum an C8 in **1c** als (*R*) zuordnen.

Die Stereotriade im Ostfragment **7** wurde mithilfe der Masamune-Antialdolreaktion<sup>[16]</sup> und der Nagao-Acetat-Aldolreaktion<sup>[17]</sup> hergestellt (Schema 3). Das Propionat **13** und Propanal lieferten den Aldehyd **14** nach einer Reihe von Standardreaktionen. In der Nagao-Aldolreaktion wird das

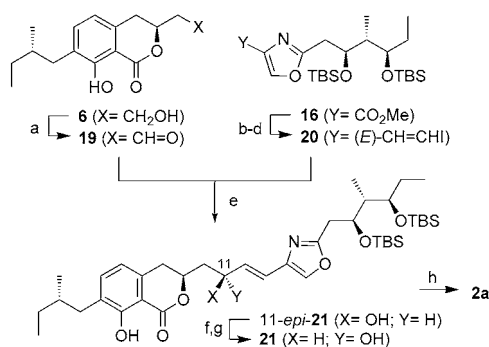


**Scheme 3.** Synthese des Ostfragments **7**. Reagentien und Bedingungen: a) *c*-HexBOTf, NEt<sub>3</sub>, Propionaldehyd, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C, 2 h, 91%, d.r. > 20:1; b) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C → RT, 50 min, quant.; c) DIBAL-H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C, 30 min, 91%; d) Dess-Martin-Periodinan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 1 h; e) **17**, TiCl<sub>4</sub>, *i*Pr<sub>2</sub>EtN, –40°C → –78°C, 1.5 h; f) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C, 30 min, 91% über drei Stufen; g) 1 M LiOH, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, THF/H<sub>2</sub>O 4:1, 0°C → RT, 12 h, 99%; h) **18**, HOBT, TBTU, *i*Pr<sub>2</sub>EtN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 12 h, 97%; i) DAST, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C, 3 h, 78% (88% basierend auf zurückgewonnenem Ausgangsmaterial); j) DBU, BrCCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → RT, 6 h, 85%; k) DIBAL-H (2 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C, 1 h, quant.; l) BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 0°C, 7 h, 72%. DAST = Diethylaminoschwefeltrifluorid; DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; Hex = *n*-Hexyl; HOBT = Hydroxybenzotriazolhydrat; TBSOTf = *tert*-Butyldimethylsilyltriflat; TBTU = *O*-Benzotriazolyl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluoroborat.

Thioxothiazolidin **17** eingesetzt; sie ergab nach *O*-Silylierung und hydrolytischer Abspaltung des chiralen Auxiliars die Carbonsäure **15**. Diese wurde mit Serinmethylester **18** gekuppelt und durch eine DAST-vermittelte Cyclisierung und Aromatisierung in guter Gesamtausbeute in den Methylester **16** überführt. Schließlich wurde der Ester **16** in das gewünschte Triol **7** überführt und die relative Konfiguration und Identität durch Vergleich der NMR-Daten mit dem natürlichen Abbauprodukt **7** bewiesen (Abbildung S2a). Weiterhin wurden die absoluten Konfigurationen (1*S*,19*R*,20*R*) über die optischen Drehungen (natürliches Fragment: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = –22.5, *c* = 0.2, MeOH; synthetisches Fragment: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = –20.8, *c* = 0.2, MeOH) und per CD-Spektroskopie belegt (siehe Abbildung S2).

Die Struktur von Noricumazol A (**2a**) konnte abschließend eindeutig durch Totalsynthese bestätigt werden (Schema 4). Dazu wurde Vinyljodid **20** mit dem Aldehyd **19** (erhalten aus dem Westfragment **6** unter strikt säure- und wasserfreien Bedingungen) über das entsprechende Vinylzink-Intermediat vereinigt. Die Bildung des Intermediats erfolgte durch Transmetallierung des lithiierten Vinyljodids durch Zugabe von Me<sub>2</sub>Zn. Das erwünschte Produkt **21** und dessen Epimer 11-*epi-21* erhielten wir in einem Diastereomerenverhältnis von d.r. = 1:1.<sup>[18]</sup> Methylester **16** konnte aus dem Vinyljodid **20** zugänglich gemacht werden. Dazu wurde dieses zunächst einer Reduktion unterzogen und der gebildete Aldehyd per Seyferth-Gilbert-Homologisierung<sup>[19]</sup> unter Verwendung des Bestmann-Ohira-Reagens in das Alkin überführt.<sup>[20]</sup> Dieses wurde einer *syn*-Hydrozirkonierung<sup>[21]</sup> mit darauffolgender Iodierung unterzogen.

Nach chromatographischer Trennung beider Diastereomere konnte das unerwünschte 11-*epi-21* durch eine Mitsunobu-Inversion<sup>[22]</sup> gefolgt von einer Esterhydrolyse direkt in **21** überführt werden. Diese Sequenz erhöhte die Ausbeute



**Scheme 4.** Abschluss der Totalsynthese von Noricumazol A (**2a**). Reagentien und Bedingungen: a) Dess-Martin-Periodinan, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 45 min, 85%; b) DIBAL-H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78°C, 1 h, quant.; c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Bestmann-Ohira-Reagens, MeOH, 0°C→RT, 86%; d) Schwartz-Reagens, THF, 0°C, 1 h, dann NIS, –78°C, 25 min, 94%; e) *t*BuLi, **20**, Et<sub>2</sub>O, –78°C, 1 h, dann Me<sub>2</sub>Zn, –78°C, 15 min, dann **19**, Et<sub>2</sub>O, –78°C, 2.5 h, 74%, d.r. = 1:1 (**21**:11-*epi*-**21**); f) 11-*epi*-**21**, PPh<sub>3</sub>, *p*-Nitrobenzoesäure, DEAD, THF, 0°C→RT, 3 h, 90%; g) NaOH, H<sub>2</sub>O, THF/MeOH (2:1), 0°C, 12 h, 92%; h) **21**, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 0°C, 12 h, 90%. DEAD = Diethoxycarbonyldiazan; NIS = *N*-Iodsuccinimid.

des erwünschten Kupplungsprodukts **21** auf 68%. Der Abschluss der Synthese wurde durch eine Lewis-Säure-vermittelte TBS-Entschützung<sup>[23]</sup> erreicht. Noricumazol A (**2a**) wurde über 15 Stufen (längste lineare Sequenz) in einer Gesamtausbeute von 15% (einschließlich der Mitsunobu-Inversion: 17 Stufen und 26% Gesamtausbeute) erhalten. Die durch Totalsynthese erhaltenen physikalischen und analytischen Daten des Produkts stimmen mit denen für das authentische Noricumazol A (**2a**) überein.<sup>[24]</sup> Auf diese Weise wurde die absolute Konfiguration aller in Abbildung 1 gezeigten stereogenen Zentren von Noricumazol A (**2a**) ermittelt. Die chemischen und biochemischen Betrachtungen lassen erwarten, dass diese Zuordnung auf die Stereochemie der Icumazole (**1a–c**) übertragbar ist.

Untersuchungen der biologischen Eigenschaften von Icumazol A (**1a**) ergab Aktivitäten (minimale Hemmkonzentrationen (MIC) in µg mL<sup>–1</sup>) gegenüber zahlreichen Pilzen, z. B. *Mucor hiemalis* (1.25), *Botrytis cinerea* (0.04), *Pythium debaryanum* (0.3) und *Sclerotinia sclerotiorum* (1.25) (ausgewählt aus Tabelle S7) sowie gegenüber dem hefeähnlichen Organismus *Rhodotorula glutinis* (0.3). Experimente mit vereinzelt wachsenden *R. glutinis* zeigten bei Einsatz von **1a** Inhibition des Wachstums. Allerdings wurde auch beim Einsatz einer zehnfachen Konzentration der MIC keine fungizide Wirkung beobachtet (Abbildung S3).<sup>[25]</sup> DNA-, RNA- und Proteinsynthesen wurden allerdings unmittelbar nach Zugabe von Icumazol A (**1a**) blockiert. Voraussichtlich tritt dabei die Blockierung des Grundstoffwechsels auf. Infolgedessen wurde der Einfluss von **1a** auf die Oxidation von NADH in zellfreien Präparationen von Mitochondrien von *R. glutinis* studiert. Diese Untersuchungen zeigten eine maximale Inhibition der NADH-Oxidation von 60–70% bei einer Konzentration von etwa 5 ng mL<sup>–1</sup> (Abbildung S4). Ein ähnliches Verhalten konnte bei Myxothiazol beobachtet werden, welches an den Membranen von *Paracoccus denitrificans* wirkt.<sup>[25b]</sup> Grundsätzlich trat keine vollständige Inhibition auf, da mehrere redundante Wege für die Oxidation

von NADH in Pilzen existieren, wie dies beispielsweise für *Histoplasma capsulatum* und andere Pilze beschrieben ist.<sup>[26]</sup>

Demgegenüber zeigt Noricumazol A (**2a**) keine deutliche antibiotische Aktivität. Interessanterweise entdeckten wir aber, dass Noricumazol A (**2a**) die bemerkenswerte Fähigkeit hat, temperaturabhängig die tetramere Form des Kaliumkanals (KcsA) zu stabilisieren. Etwa die Hälfte aller tetramerer KcsA-Ionenkanäle dissoziieren in Monomere bei einer Temperatur von 82°C.<sup>[27]</sup> Hingegen wurden in Anwesenheit von Noricumazol A (**2a**) KcsA-Tetramere und sogar Oligomere bei niedrigeren Temperaturen gebildet (50–80°C). Diese waren bis zu einer Temperatur von 90°C stabil, was eine SDS-PAGE-Analyse belegt (siehe Abbildung S5). Nach unserem Kenntnisstand handelt es sich hier um das erste Beispiel, in dem ein Naturstoff eine solche Stabilisierung der KcsA-Architektur hervorruft. Es ist bereits bekannt, dass NaCl auf die Ionenkanalararchitektur in ähnlicher Weise wirkt, während KCl den KcsA-Kanal stabilisiert.<sup>[28,29]</sup>

Um diese außergewöhnliche Aktivität von Noricumazol A (**2a**) mit einer biologischen Funktion verknüpfen zu können, wurde ein Fluoreszenz-Assay auf der Basis eines Kalium-erkennenden Fluoreszenzfarbstoffs (PBFI) entwickelt. Dieser Farbstoff wurde genutzt, um den Kaliumtransport in rekonstituierten biologischen Systemen zu detektieren.<sup>[30]</sup> Zunächst wurden dazu Liposomen mit PBFI beladen und die gereinigten Ionenkanäle aus KcsA in die künstliche Membran zum „Channelosom“ integriert. In Anwesenheit von KCl (1M dem Assay zugefügt, um eine Endkonzentration von 0.5M zu erhalten) wurden Kaliumionen in diese „Channelosome“ hinein transportiert und das Fluoreszenzsignal verfolgt (siehe Abbildung S6A). In Abwesenheit von KcsA zeigten Kontroll-Liposomen eine nur schwache Reaktion auf die Anwesenheit der Kaliumionen (siehe Abbildung S6A). Addition von Noricumazol A (**2a**) zu den „Channelosomen“ führte zu einer Verkleinerung des Fluoreszenzsignals. Dieser Effekt ist dosisabhängig (siehe Abbildung S6A).<sup>[31]</sup> Der konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt (IC<sub>50</sub>) von Noricumazol A (**2a**) auf den Ionenkanal KcsA betrug 4 µM, während die IC<sub>50</sub>-Werte für NaCl 85 mM und NiCl<sub>2</sub> 190 mM sind (siehe Abbildung S6C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Noricumazol A (**2a**) den Aufbau von KcsA stabilisiert und den Transport von Kaliumionen durch den Ionenkanal hemmt. Letzteres Ergebnis wurde zusätzlich durch elektrophysiologische Messungen verifiziert, bei denen Noricumazol A (**2a**) die einzelne Kanalaktivität bei einer Konzentration von 1 µM vollständig hemmte (Abbildung S7).<sup>[32]</sup> Dieser Wert ist vergleichbar mit anderen spezifischen Ionenkanal-Inhibitoren. Einer dieser Ionenkanal-Inhibitoren ist das von Skorpionen produzierte und isolierte Charybdotoxin, welches eine 10- bis 100fach höhere Affinität für humane Kaliumkanäle besitzt. Weitere etablierte Kanalblocker wie TBA (Tetrabutylammonium), TEA (Tetraethylammonium) oder Ba<sup>2+</sup> erfordern höhere Konzentrationen zur Inhibition des KcsA-Kanals als Noricumazol A (**2a**).

Wir konnten zeigen, dass es sich bei Icumazol A (**1a**), Noricumazol A (**2a**) sowie den beiden glycosylierten Analoga um neuartige Oxazol- und Isochromanon-haltige Metabolite aus verschiedenen *S.-cellulosum*-Stämmen handelt. Die



Aglykone in **1a** und **2a** unterscheiden sich ausschließlich durch die Anwesenheit einer Methoxy- oder Hydroxygruppe an C11 und in der Länge ihrer zentralen Trien- oder Monoen-Einheit bei wahrscheinlich gleicher absoluter Konfiguration. Die absolute Konfiguration von Noricumazol A (**2a**) konnte eindeutig durch die Totalsynthese des Moleküls bewiesen werden. Erste Experimente deuten darauf hin, dass Icumazol A (**1a**) auf die Atmungskette wirkt, während Noricumazol A (**2a**) einen starken Einfluss auf die Aktivität von Kaliumkanälen besitzt. Diese Eigenschaft hängt bemerkenswerterweise mit den die KcsA-Architektur stabilisierenden Eigenschaften zusammen.

Eingegangen am 11. September 2011

Online veröffentlicht am 23. Dezember 2011

**Stichwörter:** Antibiotika · Ionenkanalblocker · Myxobakterien · Naturstoffe · Strukturaufklärung · Totalsynthese

- [1] S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, *12*, 220–230.
- [2] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlowa, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
- [3] H. Reichenbach, G. Höfle, B. Böhlendorf, H. Irschik, Ger. Pat 4 305 486A1, **1994**; CA **1994**, *121*, 3000667v.
- [4] R. Jansen, H. Irschik, V. Huch, D. Schummer, H. Steinmetz, M. Bock, T. Schmidt, A. Kirschning, R. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1284–1289.
- [5] a) S. Ek, H. Kartimo, S. Mattila, A. Tolonen, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9834–9842; b) R. C. Beier, B. P. Mundy, *J. Carbohydr. Chem.* **1984**, *3*, 253–266.
- [6] G. J. Gerwig, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 349–357.
- [7] R. D. Rychnovsky, B. N. Rogers, T. I. Richardson, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *31*, 9–17.
- [8] Die absolute Konfiguration des Carbinols an C11 von **4** konnte nicht durch die Mosher-Methode bestimmt werden, da unter den Veresterungsbedingungen Epimerisierung auftrat: H. Dale, S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2143–2147.
- [9] Iodid **7** wurde aus dem entsprechenden Alkohol hergestellt: V. Martischonok, G. G. Melikyan, M. Alfred, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann, *Synthesis* **1991**, 560–564.
- [10] G. Cahiez, V. Habiak, C. Duplais, A. Moyeux, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4442–4444; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4364–4366.
- [11] W. M. Czaplik, M. Mayer, M. A. von Wangelin, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 616–620; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 607–610.
- [12] Übersicht: A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1390–1393; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1364–1367.
- [13] J. A. Frick, J. B. Klassen, A. Bathe, J. M. Abramson, H. Rapoport, *Synthesis* **1992**, 621–623.
- [14] K. Mori, M. Ikunaka, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3471–3479.
- [15] Zusätzlich zeigten beide Epimere unterschiedliche optische Drehungen: **6**  $[\alpha]_D^{20} = -33.0$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) und *epi-6*  $[\alpha]_D^{20} = +15.2$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).
- [16] T. Inoue, J.-F. Liu, D. C. Buske, A. Abiko, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5250–5256.
- [17] Andere asymmetrische Varianten unter Einsatz chiraler Liganden scheiterten aufgrund mangelnder Diastereokontrolle (d.r. nicht besser als 1:1.5) (siehe auch Hintergrundinformationen).
- [18] Y. Nagao, Y. Hagiwara, T. Kumagai, M. Ochiai, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2391–2393.
- [19] J. C. Gilbert, U. Weeresooriya, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4997–4998.
- [20] S. Müller, B. Liepold, G. J. Roth, H. J. Bestmann, *Synlett* **1996**, 521–522.
- [21] D. W. Hart, J. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8115–8116.
- [22] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
- [23] S. A. King, B. Pipik, A. S. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4563–4566.
- [24] NMR-Messungen von Gemischen aus synthetischem und natürlichem **2a** finden sich bei den Hintergrundinformationen.
- [25] Ein ähnlicher Effekt wurde für das antimykotische Myxothiazol beobachtet: a) G. Thierbach, H. Reichenbach, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *19*, 504–507; b) G. Thierbach, H. Reichenbach, *Arch. Microbiol.* **1983**, *134*, 104–107.
- [26] B. Maresca, A. M. Lambowitz, G. S. Kobayashi, G. Medoff, *J. Bacteriol.* **1979**, *138*, 647–649.
- [27] D. M. Cortes, E. Perozo, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10343–10352.
- [28] F. I. Valiyaveetil, Y. Zhou, R. MacKinnon, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10771–10777.
- [29] M. L. Renart, F. N. Barrera, M. L. Molina, J. A. Encinar, J. A. Poveda, A. M. Fernández, J. Gómez, J. M. González-Ros, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29905–29915.
- [30] P. Jezek, F. Mahdi, K. D. Garlid, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10522–10526.
- [31] Die Ionenkanalaktivität von Icumazol A (**1a**) konnte aufgrund seiner geringen chemischen Stabilität und der teilweisen Zersetzung nicht geprüft werden.
- [32] C. Zeilinger, M. Steffens, H.-A. Kolb, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2005**, *1720*, 35–43.