

Isolierung, Strukturaufklärung und biologische Untersuchung von Maltepoliden: bemerkenswerte Makrolide aus Myxobakterien**

Herbert Irschik, Peter Washausen, Florenz Sasse, Jörg Fohrer, Volker Huch, Rolf Müller und Evgeny V. Prusov*

Bodenlebende und marine Mikroorganismen sind eine reiche Quelle für polyketidartige Naturstoffe, die durch eine hohe strukturelle Diversität und eine große Bandbreite von biologischen Aktivitäten charakterisiert sind.^[1] Solche Verbindungen sind für die Entwicklung von neuen Antiinfektiva und Krebsmedikamenten besonders wichtig.^[2] Abgesehen davon stellen die Naturstoffe interessante Ziele für die Totalsynthese dar, und sie tragen damit zur Entwicklung von neuen Synthesemethoden bei.^[3]

Im Zuge unserer Suche nach neuen Wirkstoffen in Gliederten Bakterien wurde eine Gruppe von 20-gliedrigen Makrolactonen in *Sorangium cellulosum* So ce1485 (Abbildung 1) entdeckt und in Anerkennung der Insel Malta als Herkunftsland des Bakterienstamms als Maltepolide benannt. Diese Verbindungen stellen eine neue Grundstruktur von bakteriellen Isolaten dar und zeichnen sich durch das Vorliegen einer THF-Einheit (Maltepolide A–D und F) oder eines vinylischen Epoxids (Maltepolid E) im Makrocyclus aus. Hier berichten wir über die Isolierung, Strukturaufklärung und biologische Untersuchung dieser Verbindungen.

Anfängliche Fermentierungen lieferten wechselnde Gemische der Maltepolide A–D. Die Verfolgung durch HPLC zeigte, dass das Verhältnis, in dem die Maltepolide entstehen, vom pH-Wert des Mediums abhängig ist. In Kulturen unter

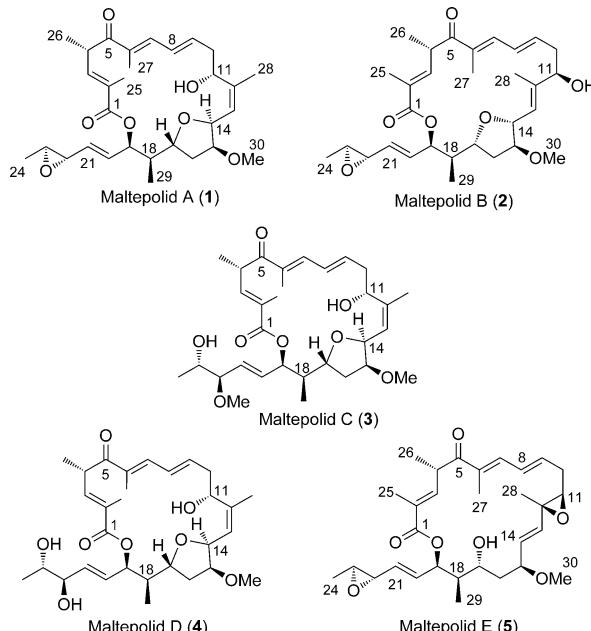


Abbildung 1. Mitglieder der Maltepolid-Familie.

leicht basischen Bedingungen (7.5–7.8) bilden sich bevorzugt die Maltepolide A (**1**) und B (**2**). Wurde aber der pH-Wert während der Fermentierung konstant und neutral gehalten, so war es möglich, eine weitere Substanz mit gleichem UV-Spektrum und Summenformel zu isolieren, die als Maltepolid E (**5**) charakterisiert wurde. Das deutete darauf hin, dass Maltepolid E die Stammverbindung der gesamten Familie sein könnte, und dass andere Mitglieder durch extrazelluläre Umwandlungen wie die Addition von Lösungsmittel oder Wasser (Maltepolid C bzw. D) entstehen.

Für die Herstellung von ausreichenden Mengen der Maltepolide wurde unseres allgemeinen Isolierungsverfahrens^[4] geändert, um die empfindliche Epoxideinheit durch minimalen Einsatz von protischen Lösungsmitteln zu schonen.^[5] Nachdem genügende große Mengen an Maltepolid E verfügbar waren, bestätigten wir in einer Reihe von extrazellulären Experimenten, dass sich Maltepolid E bei pH < 6.5 und pH > 7.5 in eine Mischung von Maltepolid A und B umwandelt (Schema 1). In Gegenwart von stärkeren Säuren wie Pyridinium-*p*-toluolsulfonat öffnet sich auch das zweite Epoxid in der Seitenkette.

Als Summenformel für Maltepolid A, B und E wurde C₃₀H₄₂O₇ ermittelt; dies entspricht 10 Doppelbindungsäquivalenten (DBEs). Die Summenformel von Maltepolid C stimmte mit der Addition eines Methanol-Moleküls überein.

[*] Dr. H. Irschik, Dr. P. Washausen, Dr. F. Sasse, Prof. Dr. R. Müller, Dr. E. V. Prusov
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: evgeny.prusov@helmholtz-hzi.de

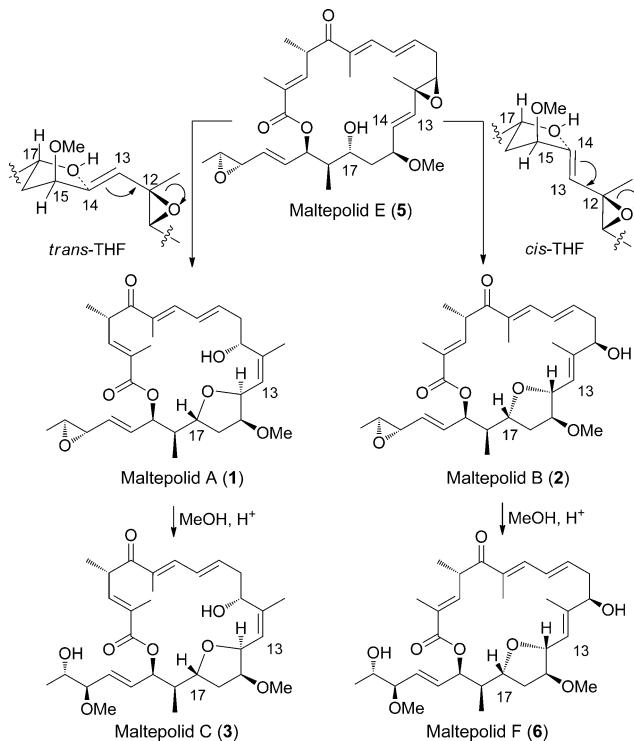
Dr. J. Fohrer
Abteilung NMR-Spektroskopie
Institut für Organische Chemie, Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)

Dr. V. Huch
Institut für Anorganische Chemie, Universität des Saarlands
Campus, Gebäude B 2.2, 66123 Saarbrücken (Deutschland)

Prof. Dr. R. Müller
Abteilung Mikrobielle Wirkstoffe, Helmholtz-Institut für
Pharmazeutische Forschung (HIPS) und
Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlands
Campus C2 3, 366123 Saarbrücken (Deutschland)

[**] Wir danken A. Meier und T. Hirsch für Beiträge zur experimentellen Isolierung von Maltepoliden, der HZI-Biotechnologie-Einheit für Unterstützung bei Maltepolid-Fermentierungen sowie Dr. R. Jansen und Dipl.-Ing. H. Steinmetz für die LC/MS-Aufnahmen und C. Kakkochke für die speziellen NMR-Messungen. Wir bedanken uns außerdem bei Prof. Dr. G. Höfle für die zahlreiche Diskussionen und bei Dr. F. Surup und C. Brünjes für einige wichtige Vorschläge.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201210113> zu finden.



Schema 1. Bildung von *cis*- und *trans*-THF-Ringen durch intramolekulare S_2' -Epoxidöffnung.

in den ^1H , ^1H -COSY- und HMBC-Spektren aller Maltepolide wurden drei Spinsysteme identifiziert.^[6] Das kürzeste Spinsystem reicht vom α -Methylacrylsäureester bis zum ungesättigten Keton und enthält eine CH-Me-Verzweigung. Das zweite Spinsystem besteht aus einem α -Me- $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ -ungesättigten Keton, einer Methylengruppe und einem oxygenierten Kohlenstoffatom. Das längste Spinsystem umfasst sechs oxygenierte Kohlenstoffatome, zwei Doppelbindungen und eine Methylgruppe. In Maltepolid A und B sind zweite und dritte Spinsysteme durch eine dreifach substituierte Doppelbindung getrennt, während in Maltepolid E die Unterbrechung an einem mit der *E*-Doppelbindung verbundenen oxygenierten Kohlenstoffatom stattfindet. Das Vorliegen des terminalen Epoxids wurde aus charakteristische Verschiebungen für die entsprechenden Protonen ($\delta = 2.82, 3.05 \text{ ppm}$) sowie aus der Bildung von Artefakten durch Lösungsmitteladdition abgeleitet. Die vicinale Kopplungskonstante von 2.5 Hz für H22 und H23 und eine NOE-Beziehung zwischen der Methylgruppe und H22 weist auf eine *trans*-Konfiguration des Epoxids hin. Ein breites Dublett bei 5.25 ppm im ^1H -NMR-Spektrum und eine zugehörige ^{13}C -Resonanz bei 78 ppm sprechen für das Vorliegen eines Makrolactons. Anhand dieser Daten wurden 2D-Strukturen für Maltepolid A, B und E vorgeschlagen.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration von beiden Epoxideinheiten wurde die Ringöffnungsprodukte nach der Mosher-Methode analysiert (Abbildung 2).^[7] Für die C17-Hydroxygruppe war die Synthese des Mosher-Esters aufgrund von sterischer Hinderung nicht möglich, deshalb wurde die absolute Konfiguration des Stereozentrums an C17 durch die Bildung der α -Methoxyphenylsäureester ermittelt.^[8]

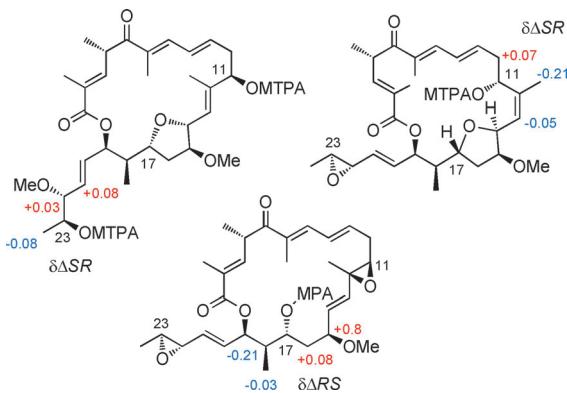


Abbildung 2. Bestimmung der absoluten Konfiguration der Stereozentren an C11, C17 und C23. MPA = (*R*)- oder (*S*)- α -Methoxyphenylsäure, MTPA = (*R*)- oder (*S*)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylsäure.

Die relative Konfiguration der C17-Hydroxygruppe und des C11-C12-Epoxids stimmen gut überein mit der Bildung von *trans*- und *cis*-Tetrahydrofuran-Ringen in Maltepolid A und B. Die Konfiguration der THF-Ringe wurde anhand von NOE-Beziehungen in NOESY-Spektren ermittelt (Abbildung 3). Anscheinend ist das makrocyclische Gerüst von

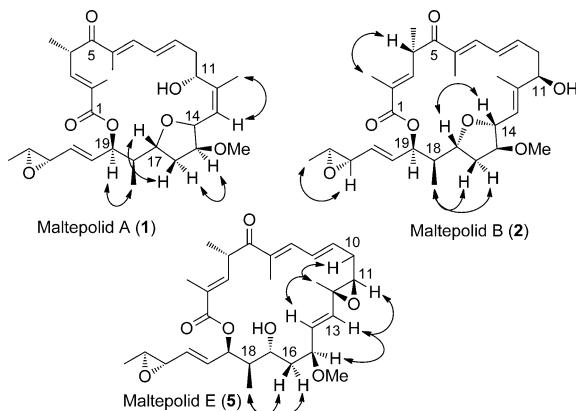


Abbildung 3. Ausgewählte NOE-Beziehungen in Maltepolid A, B und E.

Maltepolid E so flexibel, dass die C17-Hydroxygruppe von beiden Seiten der C13-C14-Doppelbindung angreifen kann (Schema 1).

Da alle Versuche, die absolute Konfiguration des Stereozentrums an C19 durch nucleophile Öffnung des Makrolactons zu ermitteln, lediglich zu Eliminierungsprodukten mit C18-C19-Doppelbindung führten, erfolgte die Aufklärung der stereochemischen Konfiguration in diesem Segment unter der Anwendung von Murata-Methode^[9] durch Bestimmung der relativen Anordnung von benachbarten OR/H- und Me/H-Substituenten anhand von $^2J_{\text{CH}}$ - und $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten.^[10] Die benötigten Kopplungskonstanten wurden aus HR-HMBC-3-Spektren von Maltepolid C und E abgeleitet.^[11] Die $^3J_{\text{CH}}(\text{C}29, \text{H}19)$ -Kopplungskonstante von 3 Hz wies auf eine *gauche*-Anordnung hin, und die $^3J_{\text{CH}}(\text{C}17, \text{H}19)$ -Kopplungskonstante von 7 Hz sprach für eine antiperiplanare Konformation (Abbildung 4). Diese Befunde werden auch

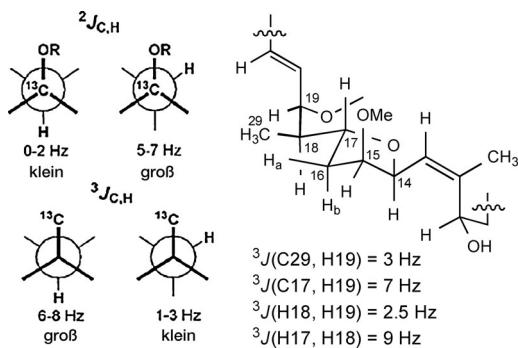


Abbildung 4. Bestimmung der relative Konfiguration in dem C17–C19-Fragment.

durch $^3J_{HH} = 2.5$ Hz für H18 und H19 sowie $^3J_{HH} = 9$ Hz für H17 und H18 gestützt. Die $^2J(C17, H18)$ - und $^2J(C19, H18)$ -Kopplungskonstanten konnten nicht gemessen werden, da die Signale von C17 und C19 im ^{13}C -NMR-Spektren sehr nahe beieinander liegen.

Als nächstes wurde eine Konformationssuche für alle möglichen Diastereomere an C18 und C19 mithilfe von Molekülmodellierungen durchgeführt.^[12] Unter Berücksichtigung zusätzlicher Randbedingungen aus NOESY/ROESY-Spektren wurde von uns eine *syn-anti*-Stereotriade für das Segment C17–C19 vorgeschlagen, da diese Anordnung perfekt mit den experimentellen Daten in Einklang ist (Abbildung 4). Die Konformationssuche wurde für zwei mögliche Konfigurationen des Stereozentrums C4 wiederholt, und anhand der Makrocyclusgeometrie und NOE-Beziehungen wurde die *S*-Konfiguration des Stereozentrums zugeordnet.^[13]

Beim Versuch, ein offenkettiges Derivat von Maltepoliden herzustellen, fiel der Bis-TBS-Ether von Maltepolid F (**6**) als Feststoff auf (TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl). Die Röntgenstrukturanalyse eines aus Methanol gewonnenen Kristalls bestätigte unseren Strukturvorschlag dann endgültig (Abbildung 5).^[14]

Die Maltepolide zeigten moderate zytostatische Wirkung gegen Mausfibroblasten (Tabelle 1).^[15] Zudem, verursachen Maltepolid A und E eigenartige morphologische Änderungen in sich teilenden PtK₂-Zellen (Abbildung 6). Da dieser Phänotyp zur Wirkung von Monastrol, einem bekannten Kinesin-Eg5-Hemmer,^[16] sehr ähnlich ist, vermuten wir, dass Maltepolid A und E auch Kinesin-Inhibitoren sein könnten.

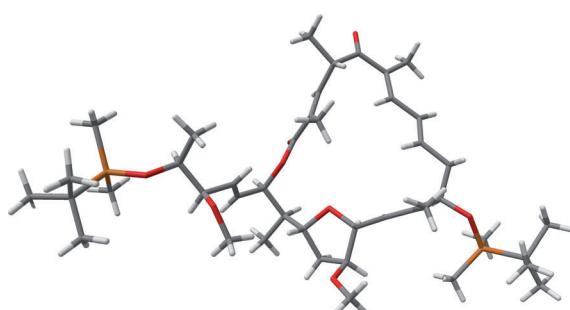


Abbildung 5. Röntgenstrukturanalyse von Maltepolid-F-Bis-TBS-Ether.^[14]

Tabelle 1: Zytostatische Wirkung von Maltepoliden in L929-Mausfibroblasten.

Verbindung	IC ₅₀
Maltepolid A	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (39 μM)
Maltepolid B	15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (39 μM)
Maltepolid C	2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4.6 μM)
Maltepolid E	3.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (6.8 μM)

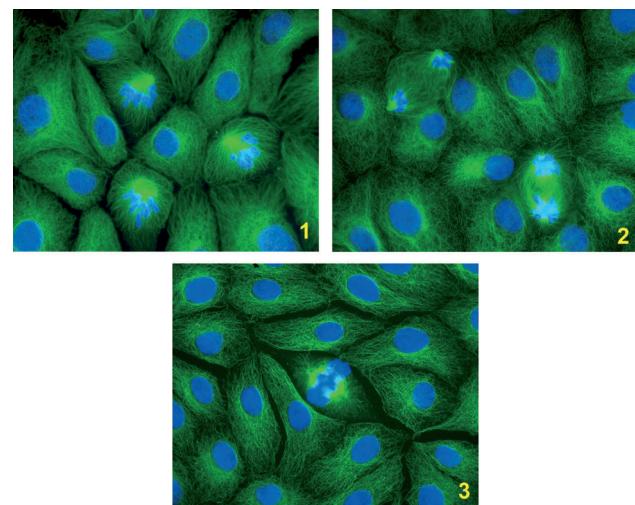
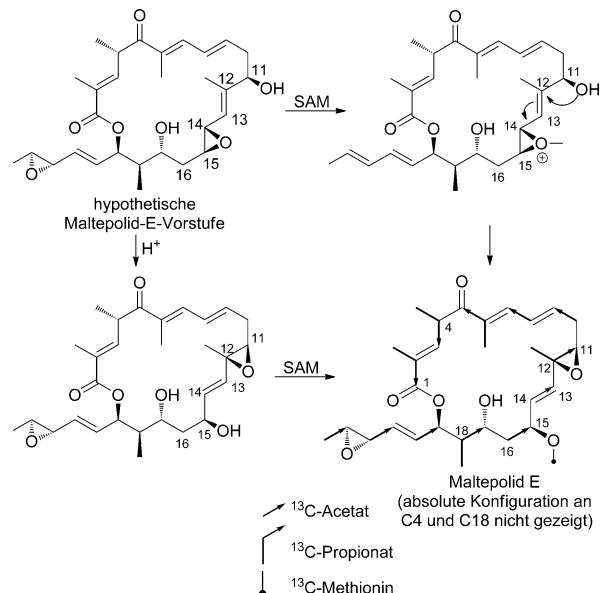


Abbildung 6. 1,2) Wirkung von Maltepolid A ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) auf sich teilende PtK₂-Zellen. 3) Kontrolle.

Die Biosynthese von Maltepolid E wurde mithilfe von ^{13}C -markierten Vorstufen untersucht. Die Analyse von ^{13}C -NMR-Spektren (Schema 2) bestätigte die Einbindung von sieben Acetat- (über Malonyl-CoA) und fünf Propionat-Einheiten (über Methylmalonyl-CoA). Der OMe-Substituent an C15 wurde auf S-Adenosylmethionin (SAM) zurückge-



Schema 2. Vorschlag für die Biosynthese von Maltepolid E.

führt. Die ungewöhnliche Position der C13-C14-Doppelbindung (entlang der Acetateinheit) könnte durch eine weitere Epoxid-Umwandlung in der hypothetischen Maltepolid-E-Vorstufe erklärt werden. Das zuerst entstehende C14-C15-Epoxid ginge dabei unmittelbar nach der Methylierung mit SAM eine vinyloge Payne-Umlagerung ein. Alternativ könnte Maltepolid E durch Brønsted-Säure-katalysierte Epoxid-Umlagerung gefolgt von einer SAM-Methylierung des gebildeten Alkohols entstehen.^[17] Weitere Arbeiten, unter anderem eine DNA-Sequenzanalyse von entsprechenden PKS-Clustern des So-ce1485-Stamms, könnten eine ausführlichere Erklärung geben.^[18]

Wir haben eine Gruppe von bakteriellen Sekundärmetaboliten entdeckt, die seltene transannulare Epoxid-Umwandlungen eingehen. Die vollständige Strukturaufklärung von Maltepoliden durch Analyse von $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten und mithilfe von Molekülmödellierungen wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse bestätigt. Schließlich haben wir einen möglichen Biosyntheseweg für Maltepolid E vorgeschlagen. Weitere Studien zur Totalsynthese von Maltepolid E und zur Aufklärung seines Zielproteins sind im Gange.

Eingegangen am 18. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 16. April 2013

Stichwörter: Biologische Wirkung · Biosynthesen · Molekülmödellierung · Naturstoffe · Strukturaufklärung

- [1] a) K. Weissman, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1276–1295;
b) S. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1385–1407;
c) K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
- [2] a) W. H. L. Jesse, J. C. Vederas, *Science* **2009**, *325*, 161–165;
b) A. Ganeshan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 306–317.
- [3] K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P. S. Baran, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 46–126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 44–122.
- [4] Siehe zum Beispiel: J. Niggemann, N. Bedorf, U. Flörke, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5013–5018.
- [5] Eine detaillierte Beschreibung der Fermentierung und Isolierung von Maltepoliden ist in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [6] Die vollständige Charakterisierung der Maltepolid A, B und E, einschließlich tabellarische Auswertung und Kopien von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren, ist Teil der Hintergrundinformationen.
- [7] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512–519.
- [8] Eine Übersicht zu Derivatisierungsreagentien: J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17–117.
- [9] N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.
- [10] Eine Übersicht zu Methoden der Strukturaufklärung von Polyketiden: D. Menche, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 905–918.
- [11] K. Furihata, M. Tashiro, H. Seto, *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 179–183.
- [12] Weitere Einzelheiten zur Molekülmödellierung sind in den Hintergrundinformationen angegeben.
- [13] Weitere Beispiele: a) J. Hassfeld, F. Christophe, H. Steinmetz, T. Carlonagno, D. Menche, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4751–4754; 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; c) D. Menche, F. Arikian, O. Perlova, N. Horstmann, W. Ahlbrecht, S. C. Wenzel, R. Jansen, H. Irschik, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14234–14243.
- [14] Kristallstrukturanalyse von Maltepolid-F-Bis-TBS-Ether, kristallisiert aus Methanol: $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{O}_8\text{Si}_2$, $M = 775.20$, $T = 130(2)$ K, monoklin, Raumgruppe $C2$; $a = 41.24(2)$, $b = 7.121(3)$, $c = 29.20(1)$ Å; $\beta = 105.506(7)$ °; $V = 9417(6)$ Å 3 , $Z = 8$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.094$ g cm $^{-3}$, $\mu = 0.121$ mm $^{-1}$, $R = 0.099$ für 13212 unabhängige Reflexe ($R_{\text{int.}} = 0.15$) und $wR2 = 0.18$ mit $I > 2\sigma_i$. Eine TBS-Gruppe ist fehlgeordnet. Die Daten wurden an einem X8-Apex-Bruker-AXS-Diffraktometer ($\text{MoK}\alpha$ -Strahlung) aufgenommen. CCDC-915998 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.
- [15] Beschreibung von biologischen Untersuchungen: S. Shaaban, R. Diestel, B. Hinkelmann, Y. Muthukumar, R. P. Verma, F. Sasse, C. Jacob, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 192–205.
- [16] T. M. Kapoor, T. U. Mayer, M. L. Coughlin, T. J. Mitchison, *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 975–988.
- [17] Dieser Biosyntheseweg wurde von einem Gutachter vorgeschlagen. Wir bedanken uns für diesen Vorschlag.
- [18] Siehe zum Beispiel: R. Dehn, Y. Katsuyama, A. Weber, K. Gerth, R. Jansen, H. Steinmetz, G. Höfle, R. Müller, A. Kirschning, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3968–3973; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3882–3887.