

Naturstoffe

DOI: 10.1002/ange.200602840

Photochemische Herkunft der Immunsuppressiva SNF4435C/D und Bildung von Orinocin durch „Polyen-Splicing“***Markus Müller, Björn Kusebauch, Guangxin Liang,
Christopher M. Beaudry, Dirk Trauner* und
Christian Hertweck*

Polyketide umfassen eine große Gruppe von Sekundärmetaboliten mit unterschiedlichen Strukturen und zahlreichen pharmakologisch bedeutsamen Aktivitäten.^[1] Ungeachtet ihrer vielfältigen Kohlenstoffgerüste werden alle Verbindungen über wiederholte Claisen-Kondensationen von aktivierten Acetat- oder Propionat-Bausteinen in Analogie zur

Fettsäurebiosynthese gebildet.^[2] Je nach Grad der Prozessierung der β -Ketogruppen entstehen Polyphenole, Polyene oder hoch reduzierte Polyketide. Bekanntlich gehen aus Polyensystemen abgeleitete Polyketide, besonders solche mit starken Chromophoren, leicht lichtinduzierte Photoisomerisierungen ein. Auf diese Weise können Reaktionskaskaden eingeleitet werden, die in einer Vielzahl von umgelagerten Kohlenstoffgerüsten resultieren.^[3,4]

Spectinabilin (Neo-aureothin, **1**)^[5,6] und Aureothin (**2**) repräsentieren ungewöhnliche Nitroaryl-substituierte Poly-enmetabolite, die von *Streptomyces thioluteus* bzw. von *Streptomyces spectabilis* gebildet werden. Biosynthesestudien auf chemischer, biochemischer und genetischer Ebene ergaben, dass diese cytotoxischen Metaboliten aus Nitrobenzolat,^[7–11] Malonat und Methylmalonat^[12] durch modulare Polyketidsynthasen aufgebaut^[13,14] und danach weiter modifiziert werden (Schema 1).^[15,16] Offensichtlich wird die Dien-Einheit von Aureothin aus zwei Propionat-Einheiten zusammengesetzt, während vier Propionat-Einheiten das Tetraen-System von **1** ergeben. Die Entdeckung der strukturell reizvollen Konstitutionsisomere von **1**, der Immunsuppressiva SNF4435C (**3a**) und SNF4435D (**3b**)^[17–19] aus *S. spectabilis* (siehe Schema 2), gab den Anlass für zahlreiche Synthesestudien.^[20–26] Auf der Basis biosynthetischer Betrachtungen und biomimetischer Modelle wurde vorgeschlagen, dass die ungewöhnlichen Bicyclo[4.2.0]octadiene aus einem Isomer von Tetraen **1** über eine 8π - 6π -Elektrocyclisierungskaskade entstehen (Schema 2).^[20,21,25,26] Die tatsächliche Herkunft dieser mutmaßlichen biogenetischen Vorstufe, eines *E,Z,Z,Z*-Tetraen-Intermediats, konnte bislang allerdings nicht geklärt werden.

Aus diesem Grund haben wir das metabolische Profil von *S. orinoci*, einem Spectinabilin-Produzenten, erneut unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Mithilfe einer synthetischen Referenz von **3a** stellten wir fest, dass die diastereomeren Bicyclo[4.2.0]octadiene nur dann gebildet werden ($0.1\text{--}0.3\text{ mg L}^{-1}$), wenn die Kultur Tageslicht ausgesetzt wird (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen); werden Fermentation und Aufarbeitung dagegen im Dunkeln durchgeführt, wird keine Bildung von **3a/b** beobachtet. Dieser Befund bedeutet, dass das Spectinabilin-Isomer nicht enzymatisch gebildet wird, sondern aus einer photoinduzierten *E/Z*-Isomerisierung resultiert. Wir konnten diese Beobachtung untermauern, indem wir reines Spectinabilin, das aus *S. orinoci* isoliert worden war, in vitro Tageslicht und künstlichem Licht aussetzten. Im HPLC-Profil von Proben, die dem Ansatz entnommen wurden, konnte das Entstehen zahlreicher Isomere und die anschließende Bildung von **3a/b** eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

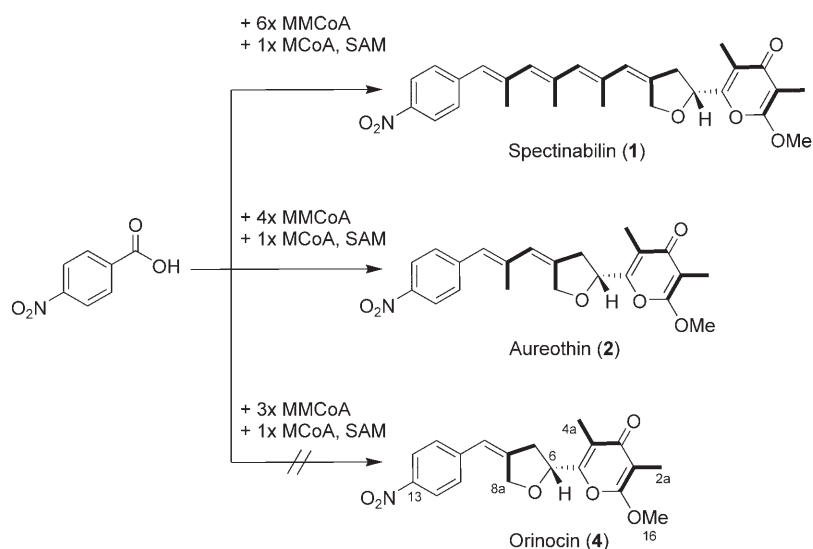
Diese Befunde demonstrieren unzweifelhaft, dass **3a** und **3b** Derivate von Spectinabilin sind und infolge einer nicht-enzymatischen, photoinduzierten Isomerisierungs-Elektrocyclisierungs-Sequenz entstehen (siehe Schema 2). Erstaunlicherweise ist die elektrocyclische 8π - 6π -Umlagerung aber noch nicht das Ende dieser Reaktionskaskade.

HPLC-MS-Analysen ergaben, dass Spuren (0.3 mg mL^{-1}) eines weiteren Nitroaryl-substituierten Metaboliten (**4**) mit *m/z* 357 gebildet werden. Diese neue Verbindung, genannt

[*] M. Müller, B. Kusebauch, Prof. Dr. C. Hertweck
Abt. für Biomolekulare Chemie
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, HKI
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-656-705
E-Mail: christian.hertweck@hki-jena.de
G. Liang, C. M. Beaudry, Prof. Dr. D. Trauner
Department of Chemistry
University of California, Berkeley
Berkeley, CA 94720-1460 (USA)
Fax: (+1) 501-643-9480
E-Mail: trauner@berkeley.edu

[**] Dieses Projekt wurde großzügig von der DFG im Schwerpunktprogramm SPP1152 „Evolution metabolischer Diversität“ (HE3468/2 für C.H.) und von den NIH (R01 GM067636 für D.T.) unterstützt.

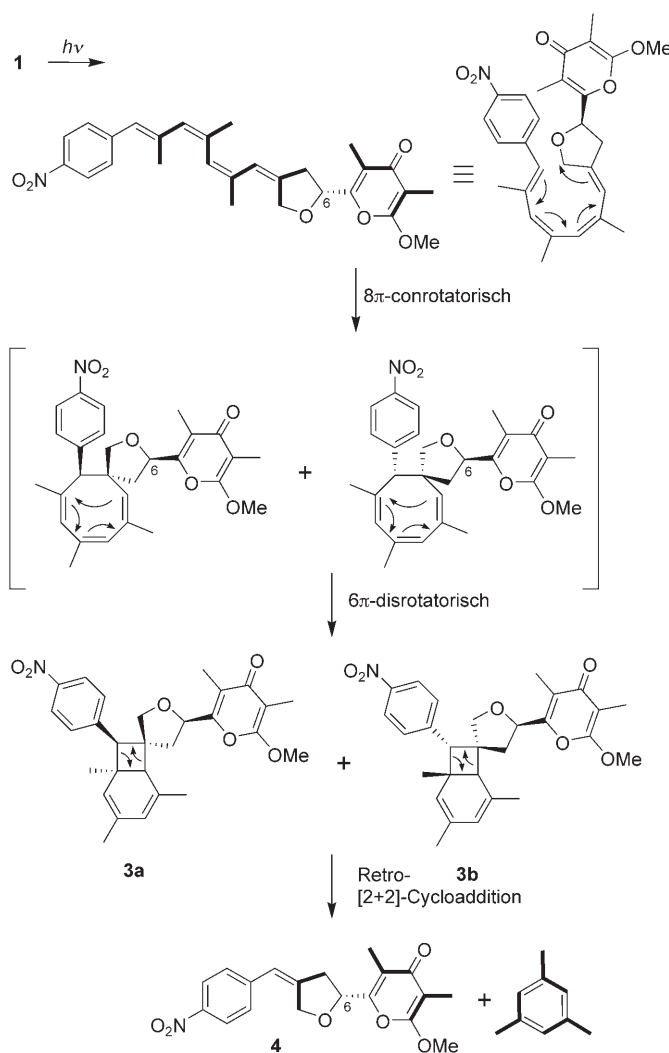
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



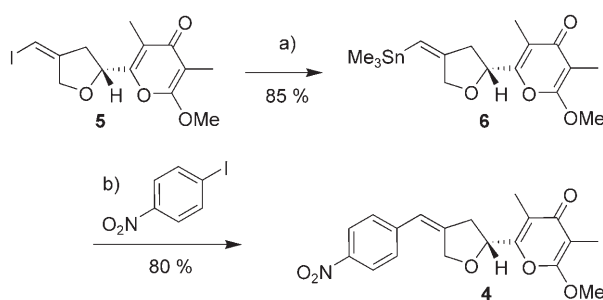
Scheme 1. Bildung Nitroaryl-substituierter Pyronmetaboliten von *Streptomyces* sp; CoA = Coenzym A, M = Malonyl, MM = Methylmalonyl, SAM = S-Adenosylmethionin.

Orinocin, fand sich überraschenderweise hauptsächlich in Fraktionen, die **3a** und **3b** enthielten. Die Struktur von **4** wurde vollständig durch 1D-NMR- und 2D-NMR-Spektroskopie sowie NOESY-Experimente aufgeklärt, wobei sich **4** als ein verkürztes Homologes von **1** und **2** entpuppte.^[27] Außer durch spektroskopische Methoden wurde die Struktur von **4** auch über den Vergleich mit einer synthetischen Referenz eindeutig bestimmt. Unsere Totalsynthese von racemischem Orinocin erfolgte ausgehend vom Vinylidid-Baustein **5** (Schema 3), der bereits für die Synthese von Aureothin und verwandten Polyketiden eingesetzt worden war.^[28] Ein Iod-Zinn-Austausch, gefolgt von einer Stille-Kupplung mit *p*-Iodnitrobenzol, ergab reines (\pm)-**4** (siehe *Experimentelles*).

Die Struktur von Orinocin macht eine Biogenese analog zu der von **1** und **2** wahrscheinlich. Anders als die Biosynthese seiner höheren Homologen, die fünf oder sieben Claisen-Kondensationen umfasst, sollte die Biosynthese von Orinocin nur vier Elongationszyklen erfordern. Das gemeinsame Auftreten von **4**



Scheme 2. Photoinduzierte electrocyclische Umlagerungskaskade von **1** zu **4** über **3**.



Scheme 3. De-novo-Synthese von Orinocin. a) 10 Mol-% [Pd(PPh₃)₄], Me₃Sn–SnMe₃, THF, 80 °C; b) 25 Mol-% [Pd₂(dba)₃], THF, 50 °C. dba = *trans,trans*-Dibenzylidenacetone.

und **3** ließ uns allerdings auch an eine alternative Route denken, die über eine Fragmentierung der Bicyclo[4.2.0]octadiene verlaufen würde. Diese Hypothese wurde bestätigt, indem natürliches und synthetisches **3** unter Fermentationsbedingungen untersucht wurden (Tageslicht, 28 °C). Wie aus dem HPLC-MS-Profil ersichtlich ist (Abbildung 1), entsteht **4** direkt aus **3a**. Eine Fragmentierung von **3** im Sinne einer Retro-[2+2]-Cycloaddition sollte zur gleichzeitigen Bildung eines Nebenproduktes führen, das aus drei Propionat-Einheiten zusammengesetzt ist: Mesitylen. Das Auftreten dieses eher ungewöhnlichen „Polyketids“ konnte tatsächlich durch GC-MS nachgewiesen werden. In den GC-Profilen der Methanol-Lösung von **3a** und einer Mesitylen-Referenz wurden Peaks mit identischer Retentionszeit und *m/z* 121 sowie den charakteristischen Fragmentierungsmustern beobachtet, woraus geschlossen werden kann, dass Mesitylen direkt aus **3** freigesetzt wird. Es ist anzumerken, dass diese Reaktion ebenfalls photoinduziert ist und im Dunkeln nicht abläuft. Dies ist in völliger Übereinstimmung mit den Woodward-Hoffmann-Regeln, nach denen thermische Retro-[2+2]-Cycloadditionen symmetrieverboten sind.^[29] Die Reaktionskaskade mit alternierenden photochemischen und thermischen

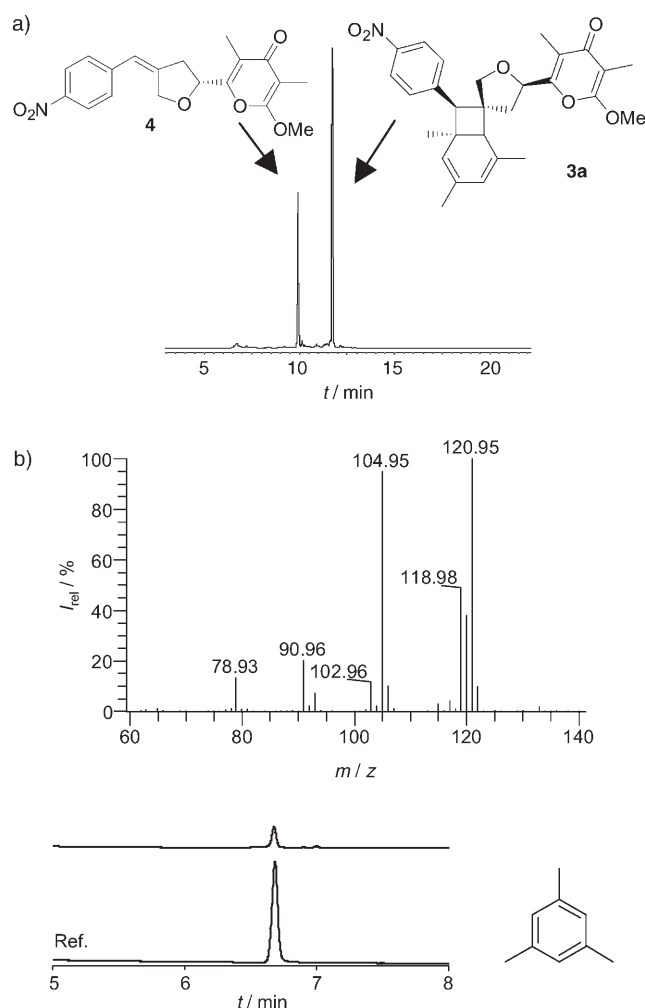


Abbildung 1. Analyse der Bildung von Orinocin (**4**) und Mesitylen aus **3**. a) HPLC-Profil; b) oben, Mitte: GC-MS-Nachweis von Mesitylen aus SNF4435C (**3a**), unten: Mesitylen-Referenz; m/z 121 entspricht $[M+H]^+$, entstanden durch hohe Fragmentierungsenergie.

pericyclischen Schritten erinnert an die Vitamin-D-Biosynthese.^[3] Die hier beschriebene Sequenz, die zu einem kettenverkürzten Polyketid-Rückgrat über den Verlust von inneren Ketideinheiten führt, ist der erste Fall eines Prozesses, den wir „Polyen-Splicing“ nennen wollen.

Wir haben zum ersten Mal *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass die Bildung von **3a** und **3b** aus **1** über eine 8π - 6π -elektrocyclische Umlagerungskaskade^[30] durch eine photoinduzierte Isomerisierung initiiert wird. Dieser Nachweis bestätigt auch die Richtigkeit der neuen Zuordnung der absoluten Konfiguration an C6 von **3a** und **3b**, die bereits auf der Grundlage von biosynthetischen Betrachtungen^[31] und Synthesestudien getroffen worden war.^[23,24]

Des Weiteren haben wir Orinocin (**4**) als ein neues Mitglied der Aureothin/Spectinabilin-Familie aus *S. orinoci* isoliert und identifiziert und seine Struktur durch eine Total-synthese bestätigt. Die überraschendste Entdeckung ist, dass dieser neue Metabolit nicht das unmittelbare Produkt einer Polyketidsynthese ist, sondern aus **1** über das Ausschneiden von drei Propionat-Einheiten entsteht. LC- und GC-MS-

Analysen ergaben, dass **4** aus **3** über eine [2+2]-Cycloreversion gebildet wird, bei der gleichzeitig Mesitylen freigesetzt wird. Die gesamte Sequenz, die wir als „Polyen-Splicing“ bezeichnen, ist für Naturstoffe völlig neuartig und bietet ein wichtiges Beispiel für die Bildung struktureller Diversität durch nichtenzymatische Downstream-Prozesse. Schließlich stellen wir eine Biosyntheseroute zu Mesitylen vor, das bislang noch nicht als Naturstoff beschrieben wurde. Unsere Befunde belegen, dass das Aren aus drei Propionat-Einheiten aufgebaut ist – und somit ein Polyketid darstellt.

Experimentelles

Fermentation von *S. orinoci*: Kulturen von *S. orinoci* (21×0.5 L, jeweils mit 2.5 g Adsorberharz XAD4 supplementiert) wurden 5 d analog zum literaturbekannten Verfahren fermentiert.^[15] Ein Kolben (Referenz) wurde mit Aluminiumfolie umhüllt und unter striktem Lichtausschluss inkubiert.

Isolierung von **1** und **4**: Geerntetes Myzel und Adsorberharz wurden erschöpfend mit Ethanol extrahiert. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Essigester/Hexan ($v/v = 1:1$) und präparative HPLC mit einer Kromasil-C18-Säule (250×20 mm) und MeOH/H₂O ($v/v = 70:30$) als Eluent bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 mL min^{-1} aufgereinigt. Ausbeute: 450 mg **1**.

4 wurde über wiederholte präparative Umkehrphasen-HPLC an Kromasil-C18 mit Acetonitril/Wasser 40:60 und 60% MeOH als Eluent erhalten. Ausbeute: 3.2 mg.

MS (ESI⁺): 736.9 $[2M+Na^+]$, 380 $[M+Na^+]$, 358.2 (100, $M+H^+$); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) siehe Tabelle 1; ¹³C-NMR

Tabelle 1: ¹H-NMR-Daten (δ [ppm]) von isoliertem und synthetischem **4**.

	isoliertes 4 (J in Hz)	synthetisches 4 (J in Hz)
C12, C14	8.21 (d, 8.8, 2 H)	8.23 (d, 8.8, 2 H)
C11, C15	7.25 (d, 8.8, 2 H)	7.26 (d, 8.8, 2 H)
C9	6.59 (m, 2.2, 1 H)	6.61 (m, 2.2, 1 H)
C6	5.21 (dd, 7.2, 6.5, 1 H)	5.23 (dd, 7.3, 6.4, 1 H)
C8a	4.86 (d, 14.3, 1 H)	4.88 (d, 14.5, 1 H)
C8a	4.76 (d, 14.3, 1 H)	4.78 (d, 14.4, 1 H)
C16	3.81 (s, 3 H)	3.83 (s, 3 H)
C7	3.17 (br. dd, 16.3, 7.6, 1 H)	3.20 (m, 1 H)
C7	3.05 (br. dd, 16.5, 6.1, 1 H)	3.07 (m, 1 H)
C4a	2.03 (s, 3 H)	2.04 (s, 3 H)
C2a	1.83 (s, 3 H)	1.84 (s, 3 H)

(125 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.9$ (CH₃, C2a), 9.5 (CH₃, C4a), 38.4 (CH₂, C7), 55.2 (CH₃, C16), 70.3 (CH₂, C8a), 73.5 (CH, C6), 100.2 (C, C2), 120.2 (CH, C9), 120.3 (C, C4), 124.1 (CH, C12, C14), 128.3 (CH, C11, C15), 143.0 (C, C8), 145.2 (CH, C10), 146.4 (C, C13), 154.4 (C, C5), 162.1 (C, C1), 180.5 ppm (C, C3); IR (ATR, fest): $\tilde{\nu} = 2924, 1665, 1594, 1342 \text{ cm}^{-1}$; UV (MeOH): $\lambda = 215, 315 \text{ nm}$; HR-MS (EI) ber. für C₁₉H₂₀NO₆ $[M+H]^+$: 358.1291; gef.: 358.1318.

Bildung von **4** und Mesitylen aus **3**: **4** wurde über HPLC/MS (HPLC-System Agilent 1100 Series, gekoppelt an eine LC/MSD-Ionenfalle, mit zusätzlicher UV-Detektion über einen DAD, 254 nm) detektiert. Eine Zorbax-Eclipse-XDB-C18-Säule (5μ , $150 \times 4.6 \text{ mm}$) wurde als stationäre Phase verwendet. Eluent: MeOH/H₂O 0–10 min: 20:80 bis 100:0; 10–20 min: 100:0. Mesitylen wurde über GC/MS [TRACE GC ULTRA (Thermo) mit einer BPX 50-Kapillarsäule (SGE, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm ID}$), parallel gekoppelt an einen CTC-Analytics-FID-Detektor und einen POLARIS-Q-(Thermo)-Quadrupol-Massendetektor] nachgewiesen. GC-Parameter: Injektion im Splitless-Modus, Trägergas: He, konstante Strömungsgeschwindigkeit

1.0 mL min⁻¹, $T = 40^{\circ}\text{C}$ (0.0–1.0 min), $40\text{--}280^{\circ}\text{C}$ (1.0–17.0 min, 15.0 K min⁻¹), 280°C (17.0–18.0 min). MS-Parameter: CI, Reaktantgas: Methan, Strömungsgeschwindigkeit: 0.7 mL min⁻¹, Ionenquelle 200°C .

Synthese von **4**: siehe Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 17. Juli 2006

Stichwörter: Elektrocyclische Reaktionen · Naturstoffe · Polyene · Polyketide · Streptomyceten

- [1] D. O'Hagan, *The Polyketide Metabolites*, Ellis Horwood, Chichester, **1991**.
- [2] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
- [3] C. M. Beaudry, J. P. Malerich, D. Trauner, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4757.
- [4] A. K. Miller, D. Trauner, *Synlett* **2006**, *14*, 229.
- [5] G. Cassinelli, A. Grein, P. Orezzi, P. Pennella, A. Sanfilippo, *Arch. Microbiol.* **1967**, *55*, 358.
- [6] K. Kakinuma, C. A. Hanson, K. L. Rinehart, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 217.
- [7] J. He, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3694.
- [8] R. Winkler, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4152; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4083.
- [9] M. Ziehl, J. He, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4443; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1202.
- [10] R. Cardillo, C. Fuganti, D. Ghiringhelli, D. Giangrasso, P. Grasselli, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 4875.
- [11] R. Cardillo, C. Fuganti, D. Ghiringhelli, D. Giangrasso, P. Grasselli, A. Santopietro-Amisano, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 459.
- [12] M. Yamazaki, Y. Maebayashi, H. Katoh, J.-I. Ohishi, Y. Koyama, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 569.
- [13] J. He, C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1225.
- [14] J. He, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 908.
- [15] J. He, M. Müller, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16742.
- [16] M. Müller, J. He, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 37.
- [17] K. Takahashi, E. Tsuda, K. Kurosawa, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 548.
- [18] K. Kurosawa, K. Takahashi, E. Tsuda, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 541.
- [19] K. Kurosawa, K. Takahashi, N. Fujise, Y. Yamashita, N. Washida, E. Tsuda, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 71.
- [20] C. M. Beaudry, D. Trauner, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2221.
- [21] J. E. Moses, J. E. Baldwin, R. Marquez, R. M. Adlington, A. R. Cowley, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3731.
- [22] J. E. Moses, J. E. Baldwin, S. Bruckner, S. J. Eade, R. M. Adlington, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3670.
- [23] K. A. Parker, Y. H. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15968.
- [24] C. M. Beaudry, D. Trauner, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4475.
- [25] M. F. Jacobsen, J. E. Moses, R. M. Adlington, J. E. Baldwin, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1675.
- [26] M. F. Jacobsen, J. E. Moses, R. M. Adlington, J. E. Baldwin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2473.
- [27] **4** isomerisiert leicht, wobei eine *E/Z*-Mischung im Verhältnis 1:1 entsteht.
- [28] G. Liang, I. B. Seiple, D. Trauner, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2837.
- [29] R. B. Woodward, R. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 797; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 781.
- [30] Pionierarbeiten auf dem Gebiet der 8π - 6π -Elektrocyclisierungen: a) R. Huisgen, A. Dahmen, H. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7130; b) W. M. Bandaranayake, J. E. Banfield, S. S. C. Black, G. D. Fallon, B. M. Gatehouse, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 162; c) K. C. Nicolaou, N. A. Petasis, J. Uenishi, R. Zipkin, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 555.
- [31] K. A. Parker, Y. H. Lim, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 161.