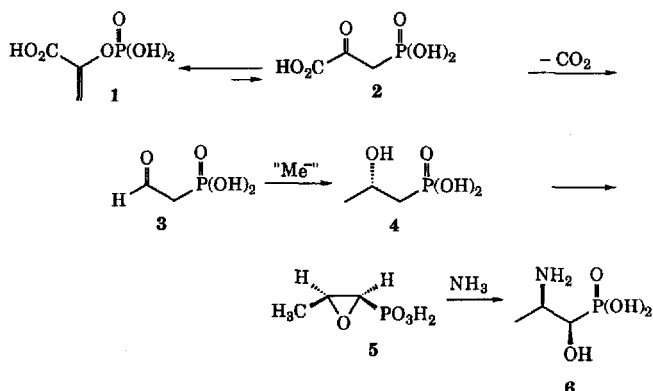


Einbau von L-[Methyl-²H₃]methionin und 2-[Hydroxy-¹⁸O]hydroxyethylphosphonsäure in Fosfomycin in *Streptomyces fradiae* – ein ungewöhnlicher Methyltransfer **

Friedrich Hammerschmidt*

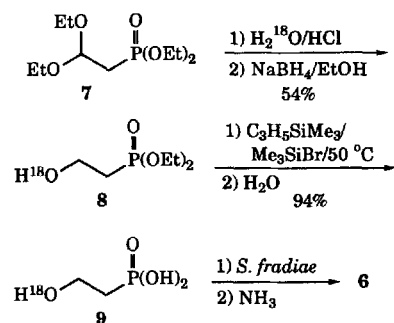
Fosfomycin **5** ist ein klinisch eingesetztes Antibiotikum, das zur Gruppe der Naturstoffe mit einer P-C-Bindung gehört^[1]. Seine Biosynthese weist mit der Verlängerung einer P-C₂-Einheit um eine C₁-Einheit und der Oxiranbildung zwei höchst interessante Reaktionsschritte auf. Die Biogenese beginnt mit der Isomerisierung^[2] von Phosphoenolbrenztraubensäure **1** zu Phosphonobrenztraubensäure **2**, die vermutlich zu Phosphonoacetaldehyd **3** decarboxyliert^[3] und anschließend zu (S)-2-Hydroxypropylphosphonsäure **4** methyliert wird^[3-5]. Diese wird in Fosfomycin **5** übergeführt, wobei der Sauerstoff der Hydroxygruppe zum Oxiransauerstoff wird^[4]. Dieser Beitrag soll weitere experimentelle Hinweise für die schon früher geäußerte Vermutung^[6] bringen, daß bei der Umwandlung von **3** zu **4** eine Methylgruppe als CH₃⁻ an den Carbonylkohlenstoff von **3** addiert wird – ein Schritt, für den es in der Biosynthese keinen Präzedenzfall gibt^[7].



Sowohl die Methylgruppe^[3] von [Methyl-¹⁴C]methionin als auch 2-Hydroxy-[2,2-²H₂]ethylphosphonsäure (vgl. **9**)^[6,8] werden in Fosfomycin eingebaut. Letztere wird unter Erhaltung eines Deuteriums über die postulierte, im Gesamtkontext der Biosynthese von Naturstoffen mit einer P-C-Bindung aber plausible Aldehydzwischenstufe^[5,6,8] inkorporiert, womit eine Umpolung der C=O-Funktion über ein Thiaminpyrophosphataddukt ausscheidet. Es wurde daher ein Fütterungsexperiment mit L-[Methyl-²H₃]methionin (300 mg L⁻¹) mit *Streptomyces fradiae* durchgeführt, um zu prüfen, ob die Methylgruppe intakt, d. h. ohne Ersatz eines Deuteriums durch ein Protium, übertragen wird. Das gebildete Fosfomycin (8 mg L⁻¹) wurde in die leicht isolierbare (markierte) 2-Amino-1-hydroxypropylphosphonsäure **6** übergeführt^[9]; sie wurde isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht. Das ¹H-NMR-Spektrum (400.1 MHz, D₂O) zeigt aufgrund der Signalmuster und der Integration, daß das so erhaltene **6** aus 19% nichtmarkierter und 81% trideute-

rierter Verbindung besteht, ableitbar aus dem scharfen Dublett (³J(H,H) = 7.0 Hz) bei δ = 1.54 für 3-H und aus dem Triplett (³J(P,H) = ³J(H,H) = 5.0 Hz) bei δ = 3.72 für 2-H. Im ¹³C{¹H}-NMR-Spektrum (100.6 MHz, D₂O, DSS) wird dieses Ergebnis durch Satellitendubletts (isotopeninduzierte β- und γ-Shifts)^[10] bei höherem Feld für C-1 (δ = 72.917, ¹J(P,C) = 155.0 Hz, Δδ = 0.04) und C-2 (δ = 53.314, ²J(P,C) = 4.5 Hz, Δδ = 0.16) für die markierte Verbindung gestützt. Die Anwesenheit einer mono- oder dideuterierten Spezies ist auszuschließen. Sie müßten sich im ¹H-NMR-Spektrum durch zusätzliche Dubletts für 3-H, die durch Kopplung mit einem bzw. zwei Deuteriumatomen zumindest stark verbreitert wären, und weitere Satellitendubletts für C-2 im ¹³C-NMR-Spektrum zu erkennen geben. Die Methylgruppe wird somit intakt übertragen.

Um zu prüfen, ob Phosphonoacetaldehyd **3** selbst oder eine andere, bisher noch unbekannt Verbindung als Acceptor für die Methylgruppe dient, wurde 2-[Hydroxy-¹⁸O]hydroxyethylphosphonsäure **9** aus dem Acetal **7** synthetisiert und dem Nährmedium (470 mg L⁻¹) zugefügt. **9** wird von einer Dehydrogenase zum Aldehyd dehydriert und so in den Biosyntheseweg eingeschleust. Die leichte Austauschbarkeit von Sauerstoff in Aldehyden ließ [Formyl-¹⁸O]phosphonoacetaldehyd (vgl. **3**) als Substrat ungeeignet erscheinen. Die Halbwertszeit für den Austausch des Sauerstoffs in Acetaldehyd beträgt in neutraler wäßriger Lösung ca. 1 min^[11]. In der Zelle sollte der in situ erzeugte [Formyl-¹⁸O]phosphonoacetaldehyd rasch methyliert werden, noch bevor ein vollständiger Austausch des ¹⁸O stattgefunden hat. Zur Synthese von **9** wurde 2,2-Diethoxyethylphosphonsäurediethylester **7**^[12] in H₂¹⁸O (95% ¹⁸O) mit HCl, hergestellt durch Zugabe von Chlortrimethylsilan, hydrolysiert. Nach drei Tagen wurde das Gemisch (Molverhältnis von Aldehyd **3**/Acetal **7** = 1:1 nach zwei Tagen; ¹H-NMR) in wasserfreiem Ethanol mit NaBH₄ reduziert. Das ¹⁸O-markierte Hydroxyphosphonat **8** stimmte in Dünnschichtchromatogramm, Siedepunkt, ¹H-NMR- und IR-Spektrum mit der nichtmarkierten Verbindung überein, die nach dem gleichen Verfahren, jedoch durch Hydrolyse von **7** mit H₂O anstelle von H₂¹⁸O, erhalten wurde. Das



EI-Massenspektrum von **7** zeigte, daß ¹⁶O der P=O-Bindung nicht gegen ¹⁸O ausgetauscht worden war. Laut FD-Massenspektrum betrug der Markierungsgrad mindestens 92%. Das ¹³C{¹H}-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) weist für die markierte Verbindung **8** für C-2 ein zu höherem Feld verschobenes Dublett (δ = 56.417, ²J(C,P) = 4.6 Hz, Δδ = 0.018) auf. **8** wurde mit Bromtrimethylsilan/Allyltrimethylsilan^[9,13] und anschließende Hydrolyse in die freie Phosphonsäure **9** umgewandelt, die dem Nährmedium zugesetzt wurde (470 mg L⁻¹). Das gebildete markierte Fosfomycin (10 mg L⁻¹) wurde wiederum in 2-Amino-1-hydroxypropylphosphonsäure übergeführt, die isoliert wurde. Ihr ¹H-NMR-Spektrum

[*] Doz. Dr. F. Hammerschmidt

Institut für Organische Chemie der Universität
Währingerstraße 38, A-1090 Wien (Österreich)
Telefax: Int. +1/3196312

[**] Biosynthese von Naturstoffen mit einer P-C-Bindung, 11. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte 8671 und 6537C) gefördert. – 10. Mitteilung: F. Hammerschmidt, H. Kählig, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 1201–1203.

(400.1 MHz, D₂O) ist identisch mit dem der nichtmarkierten Verbindung **6**. Das nach Zugabe^[9] von NaOD (30%) in D₂O aufgenommene ¹³C{¹H}-Spektrum zeigt neben dem Dublett ($\delta = 78.885$, $^1J(\text{P,C}) = 144.7$ Hz) für C-1 von **6** ein um $\Delta\delta = 0.025$ zu höherem Feld verschobenes Satellitendublett gleicher Intensität für ¹⁸O-markiertes **6**, was einem Markierungsgrad von 50% entspricht. Damit ist gezeigt, daß der markierte Phosphonoacetaldehyd in der Zelle nur eine kurze Lebensdauer hat. Nach diesen beiden Experimenten dürfte die Methylgruppe formal als CH₃⁻ übertragen werden, womit aber L-Methionin und S-Adenosylmethionin (liefert in biologischen Systemen formal CH₃⁺) als unmittelbare Donoren für die CH₃⁻-Einheit ausscheiden^[14]. Es wird daher angenommen, daß die Methylgruppe von L-Methionin zur Umpolung möglicherweise auf ein Corrin übertragen wird (Umkehr der Bildung^[15] von L-Methionin aus Methylcobalamin und Homocystein?) und von dort als CH₃⁻ auf Phosphonoacetaldehyd **3**. Seto et al. zeigten, daß die Methylgruppe von [Methyl-¹⁴C]methylcobalamin von einer wachsenden Kultur von *Streptomyces wedmorensis* in Fosfomycin eingebaut wird^[5]. Damit ist aber keineswegs bewiesen, daß dieses der unmittelbare Donor für die Methylgruppe ist.

Die beiden beschriebenen Experimente stützen zusätzlich die Vermutung, daß bei der Biosynthese des Fosfomycins tatsächlich eine von L-Methionin stammende Methylgruppe über einen bisher unbekanntem Umpolungsschritt als CH₃⁻ an die Carbonylgruppe von Phosphonoacetaldehyd addiert wird. Es sind Untersuchungen im Gange, ob eine chirale Methylgruppe unter Retention oder Inversion der Konfiguration übertragen wird.

Experimentelles

8: Eine Lösung von 5.08 g (20 mmol) **7** in 1.0 g (50 mmol) H₂¹⁸O (95% ¹⁸O) wurde mit 0.51 mL (4 mmol) Chlortrimethylsilan versetzt und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Mischung in 40 mL wasserfreiem Ethanol (mit Na behandelt) aufgenommen, portionsweise mit 0.756 g (20 mmol) NaBH₄ (exotherm) und nach 1 h mit 0.57 mL (10 mmol) Eisessig versetzt. Die Lösung wurde eingengt. Der Rückstand wurde in 30 mL Wasser gelöst, mit 4.0 g Mannit versetzt und 2 h kontinuierlich mit Ethylacetat extrahiert, durch Flashchromatographie (zuerst Ethylacetat, dann Ethylacetat/EtOH = 10/1; R_f (**8**) = 0.49 (in 10/1), Anfärben mit I₂) und Kugelrohrdestillation (90–100°C/0.5 Torr; Lit. [16] 122–124°C/8 Torr) gereinigt; 2.0 g (54% Ausb.), farblose Flüssigkeit. IR (Film) [cm⁻¹]: $\nu = 3374$ (OH); ¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 4.12$ (m, 4H; 2 × POCH₂), 3.88 (dt, ³J(P,H) = 18.7 Hz, ³J(H,H) = 6.4 Hz, 2H; CH₂OH), 3.48 (br. s, 1H, OH), 2.07 (dd, ²J(P,H) = 17.7 Hz, ³J(H,H) = 6.4 Hz, 2H; PCH₂), 1.34 (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 6H; 2 × CH₃); ¹³C{¹H}-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 61.694$ (d, ²J(P,C) = 6.5 Hz; POCH₂), 56.435 (d, ²J(P,C) = 4.6 Hz, C-¹⁸O); um $\Delta\delta = 0.018$ zu höherem Feld verschobenes d für C-¹⁸O), 29.069 (d, ¹J(P,C) = 138.0 Hz; PCH₂), 16.259 (d, ³J(P,C) = 3.0 Hz; CH₃).

9: Eine Lösung von 1.83 g (10 mmol) **8**, 5.2 mL (40 mmol) Bromtrimethylsilan und 3.2 mL (20 mmol) Allyltrimethylsilan in 20 mL wasserfreiem CCl₄ wurde 3 h bei 50°C unter Feuchtigkeitsausschluß erhitzt. Flüchtige Anteile wurden im Vakuum (0.2 Torr, bis 40°C) entfernt. Der Rückstand wurde mit 15 mL Ethanol und 15 mL Wasser versetzt und nach 10 min eingengt. Es wurde noch zweimal Wasser zugegeben und eingengt. Zuletzt wurde der Rückstand in 30 mL Wasser gelöst und lyophilisiert; 1.2 g (94% Ausb.) zähes Öl, das direkt für die Fütterungsexperimente verwendet wurde. ¹H-NMR (400.1 MHz, D₂O): $\delta = 3.95$ (dt, ³J(P,H) = 12.3 Hz, ³J(H,H) = 7.4 Hz, 2H; CH₂OH), 2.20 (dt, ³J(P,H) = 18.2 Hz, ³J(P,H) = 7.4 Hz, 2H; PCH₂).

Das Fütterungsexperiment mit L-[Methyl-²H]₃methionin (300 mg L⁻¹, 99% D) und die Isolierung von markiertem **6** wurden nach Lit. [9] durchgeführt. Es wurden sechs 1-L-Erlenmeyerkolben mit je 220 mL Medium verwendet. **6** wurde durch Ionenaustauschchromatographie isoliert (Dowex 50, H⁺; Dowex 50, H⁺; Dowex 1, OAc; Dowex 50, H⁺, 1 N HCO₂H). Ausb. nach Umkristallisieren: 5.5 mg.

Fütterungsexperiment mit **9**: Die freie Säure wurde der Hauptkultur vor dem Autoklavieren zugesetzt (470 mg L⁻¹); 2 × sechs Erlenmeyerkolben; die Eluate von der ersten Dowex-50, H⁺-Säule wurden vereinigt und gemeinsam weiter aufgearbeitet; Ausb.: 8 mg markiertes **6**.

Eingegangen am 5. Juli,
veränderte Fassung am 9. August 1993 [Z 6189]

[1] T. Hori, M. Horiguchi, A. Hayashi, *Biochemistry of Natural C-P Compounds*, Maruzen, Kyoto Branch Publishing Service, 1984.

[2] W. A. Warren, *Biochim. Biophys. Acta* 1968, 156, 340–346; E. Bowman, M.

McQueney, R. J. Barry, D. Dunaway-Mariano, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 5575–5576; H. M. Seidel, S. Freeman, C. H. Schwalbe, J. R. Knowles, *ibid.* 1990, 112, 8149–8155; T. Hidaka, H. Iwakura, S. Imai, H. Seto, *J. Antibiot.* 1992, 45, 1008–1010.

- [3] T. O. Rogers, J. Birnbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1974, 5, 121–132.
 [4] F. Hammerschmidt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1991, 1993–1996.
 [5] T. Kuzuyama, T. Hidaka, K. Kamigiri, S. Imai, H. Seto, *J. Antibiot.* 1992, 45, 1812–1814.
 [6] F. Hammerschmidt, H. Kählig, *J. Org. Chem.* 1991, 56, 2364–2370.
 [7] Bei der Biosynthese von Thienamycin wird eine chirale Methylgruppe von Methionin möglicherweise als CHDT⁻, gebildet durch Umpolung, an ein Zwischenprodukt unbekannter Struktur unter Retention der Konfiguration addiert [17].
 [8] S. Imai, H. Seto, H. Ogawa, A. Satoh, N. Otake, *Agric. Biol. Chem.* 1985, 49, 873–874.
 [9] F. Hammerschmidt, G. Bowermann, K. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* 1990, 1055–1061.
 [10] J. C. Vederas, *Nat. Prod. Rep.* 1987, 4, 277–337.
 [11] P. Greenzaid, Z. Luz, D. Samuel, *J. Am. Chem. Soc.* 1967, 89, 756–759.
 [12] J. M. Varlet, G. Fabre, F. Sauveur, N. Collignon, *Tetrahedron* 1981, 37, 1377–1384.
 [13] A. H. Schmidt, *Aldrichimica Acta* 1981, 14, 31–38.
 [14] Der direkte Ersatz eines Wasserstoffs an C-2 der 2-Hydroxyethylphosphonsäure durch eine Methylgruppe kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber mechanistisch noch schwerer vorstellbar als die Addition einer Methylgruppe an den Carbonyl-Kohlenstoff des Phosphonoacetaldehyds **3**.
 [15] R. G. Metthews in *Folates and Pterins, Vol. 1* (Hrsg.: R. L. Blakley, S. J. Benkovic), Wiley, New York, 1984, S. 497.
 [16] A. N. Padovik, B. E. Ivanov, *Izv. Akad. Nauk SSSR Otd. Khim. Nauk* 1952, 947–955 [*Chem. Abstr.* 1953, 47, 10464c].
 [17] D. R. Houck, K. Kobayashi, J. M. Williamson, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 5365–5366.

Neuartige fünffach koordinierende Polythioether – eine Alternative zu makrocyclischen Chelatbildnern**

John M. Desper und Samuel H. Gellman*

Polythioether sind als Liganden für späte Übergangsmetalle von Bedeutung^[1]. Wirksame Chelatbildner sind Polythioether dann, wenn sie statt acyclischer Grundgerüste makrocyclische Grundgerüste aufweisen^[2–5]. Vor kurzem haben wir gezeigt, daß durch Substituenten in der Peripherie eines makrocyclischen Tetrathioethers die Bindung an das Metall-Ion verstärkt wird^[6]. Wir stellen nun ein alternatives Konzept vor, nach dem die Präorganisation eines Pentathioethergerüsts ohne makrocyclische Strukturelemente gelingt.

Oligomere Ethylensulfide wie **1** sind wegen der stark bevorzugten *anti*-Konfiguration der SC-CS-Bindungen, der nur geringfügigen Präferenz der CS-CC-Bindungen für die *gauche*-Konformation und wegen der starken Flexibilität der acyclischen Struktur als mehrzählige Liganden wenig geeignet^[7]. Die beiden letztgenannten Probleme sollten jedoch bei Einführung einer Thian- oder Thiepaneinheit in die Grundstruktur, d. h. beim Übergang zu Systemen wie **2** bzw. **3**, in den Hintergrund treten. Die Konfiguration der exocyclischen C-S-Bindungen in diesen Zielstrukturen ist von entscheidender Bedeutung, da nur

*] Prof. S. H. Gellman, Dr. J. M. Desper
Department of Chemistry, University of Wisconsin
1101 University Avenue, Madison, WI 53706 (USA)
Telefax: Int. + 608/265-4534

**] Diese Arbeit wurde von der US National Science Foundation (Presidential Young Investigator Award an S. H. G.), Eastman-Kodak, Procter & Gamble sowie Rohm und Haas gefördert. J. M. D. dankt dem US Department of Education für ein Stipendium im Rahmen des Graduate Assistance in Areas of National Need Program.