



Doctoral Thesis

Zum stereochemischen Verlauf der C-Methylierungsschritte in der Biosynthese von Bottromycin

Author(s):

Kellenberger, Johannes Laurenz

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001738573> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 12058

**Zum stereochemischen Verlauf der C-Methylierungsschritte
in der Biosynthese von Bottromycin**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

JOHANNES LAURENZ KELLENBERGER

Dipl. Chem. ETH

geboren am 25. Mai 1967

von Rehetobel (AR) und Riehen (BS)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. D. Arigoni, Referent
Prof. Dr. B. Jaun, Korreferent

Zürich Januar 1997

Zusammenfassung

Bottromycin (**I**), ein antibiotisch wirksamer Metabolit aus *Streptomyces bottropensis*, enthält eine Reihe ungewöhnlicher Aminosäurebausteine von denen sich vier durch das gemeinsame Strukturmerkmal einer Methylgruppe in β -Stellung auszeichnen. Frühere Arbeiten von Holmes belegen, dass diese Methylgruppen aus Methionin stammen. Weiter konnte er zeigen, dass Ketoisovaleriansäure ein Vorläufer für die zwei Methylvalin-Einheiten des Peptidantibiotikums ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mehr über die Biosynthese dieser ungewöhnlichen Aminosäurekomponenten in Erfahrung zu bringen und insbesondere den sterischen Verlauf der Methylierungsschritte abzuklären. Innerhalb dieser Problemstellung wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

1) Der Nachweis einer (S)-Konfiguration der zwei Methylvalin-Einheiten von Bottromycin konnte mit HPL-chromatographischen Methoden (chirale Phase) erbracht werden.

2) In einem Verfütterungsexperiment mit $[1-^{13}\text{C}]$ -(S)-Valin konnte gezeigt werden, dass dieser Vorläufer mit einer spezifischen Einbaurrate von rund 20% in die Valin-Einheit sowie die zwei Methylvalin-Einheiten von Bottromycin eingebaut wird.

3) Um mehr über den Zeitpunkt der zu den Methylvalin-Einheiten führenden Methylierungen zu erfahren, wurden die beiden Verbindungen $[4-^{13}\text{C}]$ -3-Methylvalin (**II**) und $[4-^{13}\text{C}]$ -3,3-Dimethyl-2-oxo-buttersäure (**III**) in mehrstufigen Synthesen hergestellt und verfüttert. In keinem Fall konnte ein signifikanter Einbau in die Methylvalin-Einheiten beobachtet werden. Mit dem im Fall von negativen Ergebnissen angebrachten Vorbehalt sprechen diese Befunde, zusammen mit dem erwiesenen Vorkommen von weniger methylierten Analoga von Bottromycin, für eine Methylierung der Aminosäurebausteine erst nach der Bildung der Peptidkette.

4) In einem weiteren Experiment wurde $[2-^2\text{H}]$ -(S)-Valin (**IV**) hergestellt und verfüttert. Die Analyse des aus der Kulturlösung isolierten Bottromycins zeigt, dass beim Einbau des Substrates sowohl in die Valin-Einheit als auch in die Methylvalin-Einheiten ein Anteil von ca. 65% der Deuteriummarkierung erhalten bleibt, was gegen eine Beteiligung von Pyridoxalphosphat im Methylierungsschritt spricht.

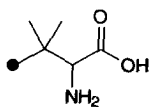
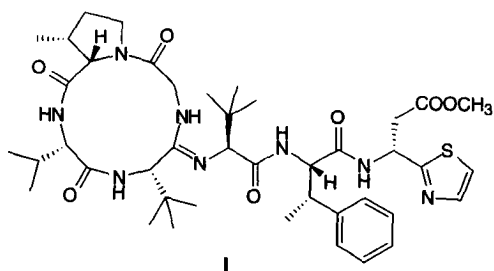
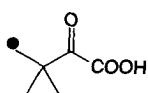
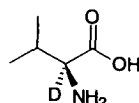
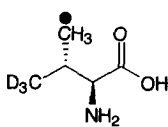
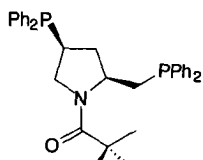
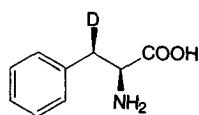
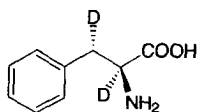
5) Zur Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der zu den Methylvalin-Einheiten führenden Methylierungsschritte wurde in einer mehrstufigen Synthese das in den Methylgruppen stereospezifisch mit Deuterium und ^{13}C markierte $[\text{CD}_3, ^{13}\text{CH}_3]$ -(2S, 3R)-Valin (V) hergestellt. Die Verfütterung dieses Substrates an *S.bottropensis* führte zu einer in den *tert*-Butylgruppen chiral markierten Form von I. Der darauffolgende oxidative Abbau lieferte eine doppelt markierte, chirale Pivalinsäure. Die am Derivat VI NMR-spektroskopisch bestimmte, überwiegende (S)-Konfiguration der *tert*-Butylgruppe belegt, dass die Methylierungen unter Inversion am Alkylierungszentrum verlaufen.

6) Zur Klärung der Biosynthese der Methylphenylalanin-Einheit von Bottromycin wurde $[1-^{13}\text{C}]$ -(S)-Phenylalanin verfüttert, welches mit einer spezifischen Einbaurate von 20% in den Metaboliten eingebaut wird. Die Verfütterung von $[3,3-^2\text{H}_2]$ -(S)-Phenylalanin führte zu einem in der benzyllischen Methinposition mit Deuterium markierten Bottromycin.

7) Zur Bestimmung des stereochemischen Verlaufs des zur Methylphenylalanin-Einheit führenden Methylierungsschrittes wurden die beiden in der Methylen-Gruppe stereospezifisch mit Deuterium markierten Phenylalanine VII und VIII synthetisiert. Die Resultate der Inkubationsexperimente belegen, dass die Methylierung ebenfalls unter Inversion am Alkylierungszentrum erfolgt.

8) Zur Untersuchung des stereochemischen Schicksals der Methylgruppe von Methionin im Verlauf der Uebertragung auf die β -Position der Aminosäure-Einheiten von Bottromycin wurde $[\text{methyl}-(^2\text{H}, ^3\text{H})]$ -(2S, methyl-R)-Methionin verfüttert. Der oxidative Abbau des erhaltenen Metaboliten lieferte nebst Essigsäure (aus der Methylphenylalanin-Einheit und der Methylprolin-Einheit) eine Pivalinsäure, welche in einem weiteren Schritt ebenfalls zu Essigsäure abgebaut wurde. Die stereochemische Analyse dieser chiral markierten Essigsäuren belegten, dass die Methylgruppe von Methionin bei den vier C-Methylierungsschritten in jedem Fall unter pauschaler Retention übertragen wird.

Diese Befunde stimmen nicht mit denjenigen überein, die früher für den formal ähnlichen Fall der Bildung von β -Methyltryptophan in *Streptomyces griseus* in der Gruppe von Floss gesichert worden sind und verleiten zur Aufstellung eines in seinen Grundzügen vom Normalfall abweichenden Reaktionsmechanismus', welcher unter Beteiligung eines Vitamin B₁₂-ähnlichen Cofaktors über Radikal-zwischenstufen abläuft.

**II****III****IV****V****VI****VII****VIII**

● = ^{13}C

Summary

Bottromycin (**I**), an antibiologically active metabolite from *Streptomyces bottropensis* contains a set of unusual amino acid moieties bearing a methyl group in the β -position as a common feature. Previous investigations by Holmes demonstrated that these methyl groups are derived from methionine. In subsequent experiments he was able to prove the role of ketoisovaleric acid as a precursor of the two methylvaline moieties of the antibiotic.

In an attempt to cast further light on the biosynthesis of the unusual amino acid moieties, and especially to determine the stereochemical course of the methylation steps, the following results were established in this thesis:

1) The (S)-configuration was established for the two methylvaline moieties of bottromycin using HPL-chromatographic methods (chiral phase).

2) In a feeding experiment, [1- ^{13}C](S)-valine was incorporated into the valine moiety and the two methylvaline moieties with a high specific incorporation rate of about 20%.

3) To cast more light on the methylation event leading to the methylvaline moieties, the two compounds [4- ^{13}C]-3-methylvaline (**II**) and [4- ^{13}C]-3,3-dimethyl-2-oxo-butyric acid (**III**) were synthesised and fed to cultures of *S. bottropensis*. In both experiments no significant incorporation of label was detected. While bearing in mind that negative incorporations must be interpreted with appropriate caution these results, together with the proved existence of less methylated analogues of bottromycin, suggest that the methylations occur after incorporation of the amino acids into the peptide chain.

4) In a further experiment [2- ^2H](S)-valine (**IV**) was synthesised and fed to cultures of *S. bottropensis*. The analysis of the isolated bottromycin revealed that about 65% of the deuterium label is retained during incorporation not only into the valine moiety but also into the methylvaline moieties. From these results it seems likely that the critical methylation step is not catalysed by pyridoxal phosphate.

5) With the aim of determining the stereochemical course of the methylation steps leading to the methylvaline moieties the [CD $_3$, $^{13}\text{CH}_3$](2S, 3R)-valine (**V**) isotopomer, in which one methyl group is labelled by ^{13}C and the other by

deuterium was stereospecifically synthesised in a multistep procedure and fed to cultures of *S. bottropensis*. This led to the isolation of a bottromycin chirally labelled in its *tert*-butyl groups. The subsequent oxidative degradation of the metabolite provided doubly labelled chiral pivalic acid. The configuration of the *tert*-butyl groups was determined by NMR-spectroscopy after derivatisation of the pivalic acid to VI and found to be mainly (S). Thus, the methylation occurs with inversion at the alkylation centre.

6) In a feeding experiment, [1-¹³C]-(S)-phenylalanine was incorporated into the methylphenylalanine moiety with a specific incorporation rate of 20%. Furthermore, feeding of [3,3-²H₂]--(S)-phenylalanine led to bottromycin labelled with deuterium in its benzylic methine position.

7) To determine the stereochemical course of the methylation step leading to the methylphenylalanine moiety the two stereospecifically deuterium labelled phenylalanines VII and VIII were synthesised and fed to cultures of *S. bottropensis*. The results of the incorporation experiments proved that this methylation also occurs with inversion.

8) To determine the stereochemical fate of the methyl group of methionine in the course of the transfer to the β-position of the amino acid moieties, [methyl-(²H,³H)]-(2S, methyl-R)-methionine was fed to cultures of *S. bottropensis*. After oxidative degradation acetic acid (from the methylphenylalanine moiety and the the methylproline moiety) and pivalic acid were isolated. The pivalic acid was further degraded to acetic acid. Stereochemical analysis of the chirally labelled acetic acids showed that the transfer of the methyl group of methionine occurs with net retention in all four cases.

The stereochemical results for the methylation reaction contrast with those found by Floss and coworkers for the similar case of the formation of β-methyltryptophan in *Streptomyces griseus* and are best explained by invoking a radical mechanism involving a metalorganic intermediate of the B₁₂ type.