

ZUR STRUKTUR DES ANTIBIOTIKUMS MOENOMYCIN A

Franz-Josef Witteler, Peter Welzel* und Helmut Duddeck

Abteilung für Chemie der Ruhr-Universität

Postfach 102148, D-4630 Bochum

Gerhard Höfle

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim

Werner Riemer

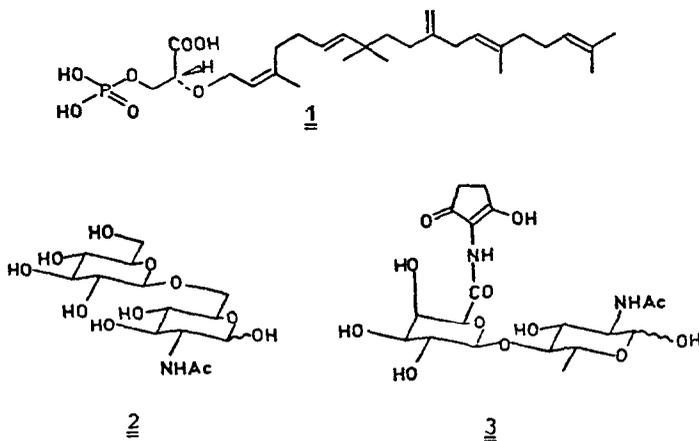
Institut für Strahlenchemie, Mülheim-Ruhr

Herbert Budzikiewicz

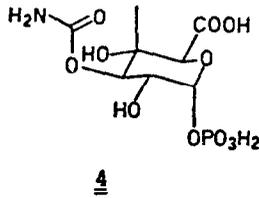
Institut für Organische Chemie der Universität Köln

Summary. Degradation products 4 and 5 of the antibiotic moenomycin A have been identified. Partial structures 3 and 6 of moenomycin A can now be formulated, connection of these units will probably provide the complete structure of the antibiotic.

Moenomycin A gehört zur Gruppe der Phosphoglycolipid-Antibiotika¹⁾, die in die Zellwandbiosynthese eingreifen, indem sie die Bildung der linearen Polysaccharidketten des Mureins aus einer Disaccharid-Zwischenstufe hemmen²⁾. Bei in-vitro-Versuchen zählen sie zu den aktivsten Hemmsubstanzen der Mureinbiosynthese³⁾. Von keiner dieser Verbindungen, die mit Molmassen von 1600-2100 relativ groß sind, ist die Struktur bekannt. Durch chemischen Abbau wurde nachgewiesen, daß Moenomycin die Bausteine 1⁴⁾, 2^{1c,5,6}, 3⁷⁾, sowie D-Moenuronsäure (4-C-Methyl-D-glucuronsäure)⁸⁾ enthält. - Wir beschreiben im folgenden die Strukturaufklärung der beiden Phosphorsäureester 4 und 5, die nach Abbau von Moenomycin A mit Trifluoressigsäure/2-Propanol^{1c,6)} und anschließender Ionenaustauschchromatographie (Dowex 1x4, Pyridiniumacetat-Gradient) erhalten wurden. - Nach Totalhydrolyse von 4 (2N HCl) wurden Phosphorsäure und 4,5-



Dihydroxy-3-methyl-2-cyclopentenon, ein Abbauprodukt der Moenuronsäure⁸⁾, chromatographisch nachgewiesen. Auch das ¹³C-NMR-Spektrum ließ sofort erkennen, daß 4 ein Derivat der Moenuronsäure sein und an C-1 eine Phosphatgruppe tragen muß. Durch Kopplung mit dem Phosphor über 2 bzw. 3 Bindungen lieferten C-1



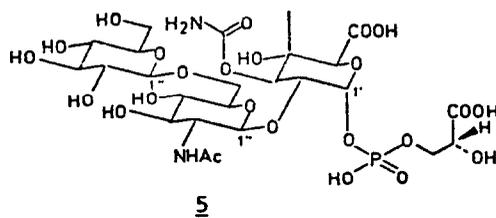
$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$	
1-H	5.63 (dd, $J_{1,2}=3.5\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}}=6.9\text{ Hz}$)	C-1	95.4 ($^2J_{\text{CP}}=6.1\text{ Hz}$)
2-H	3.81 (m, $J_{2,1}=3.5\text{ Hz}$, $J_{2,3}=10.4\text{ Hz}$)	C-2	69.6 ($^3J_{\text{CP}}=8.6\text{ Hz}$)
3-H	5.00 (d, $J_{3,2}=10.4\text{ Hz}$)	C-3	77.9
5-H	4.48 (s)	C-4	74.1
4-CH ₃	1.25 (s)	C-5	74.3
		C-6	174.2
		4-CH ₃	15.0
		OC(=O)NH ₂	160.2

Tab. 1 $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ Daten von 4

und C-2 im rauschentkoppelten Spektrum Dubletts (s. Tab. 1) ⁹⁾. Das C-4-Signal war im off-resonance-entkoppelten Spektrum als Singulett ebenfalls leicht zuzuordnen. Auffallend war das im off-resonance-entkoppelten Spektrum als Singulett auftretende Signal bei $\delta = 160.2$. Chemische Verschiebungen in diesem Bereich sind von Kohlensäurederivaten bekannt ¹⁰⁾. Im Falle von 4 zeigt dieses Signal eine Urethangruppierung an ¹¹⁾; dies ergab sich

aus dem FD-Massenspektrum mit dem Molekülpeak bei m/z 331. Verglichen mit den chemischen Verschiebungen von C-2 und C-3 bei α -D-Glucopyranosylurono-1-phosphat ($\delta_{\text{C-2}}$ und $\delta_{\text{C-3}}$ ca. 73.5 ¹²⁾) absorbiert bei 4 C-3 bei deutlich tieferem, C-2 bei deutlich höherem Feld. Man kann daraus schließen ¹³⁾, daß die Urethangruppierung in 4 an C-3 sitzt. - Zwischen 2-H und 3-H von 4 besteht laut 270 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine Spin-Spin-Kopplung von 10.4 Hz. Die Verbindung ist folglich pyranoid gebaut und liegt in der $^4\text{C}_1$ (D)-Konformation vor; aus $J_{1,2} = 3.5\text{ Hz}$ ergibt sich damit, daß die Phosphatgruppe an C-1 α -ständig ist. Die Werte von $J_{1,2}$ und $J_{1,p}$ entsprechen auch den bei α -D-Glucopyranosyl-1-phosphat gefundenen ⁹⁾. 3-H absorbiert - verglichen mit α -D-Glucopyranose ($\delta_{3\text{-H}} = 3.7$ ¹⁴⁾) - bei ziemlich tiefem Feld. Nach Untersuchungen von Golding und Rickards an der Noviose und an verwandten Zuckern ist die Überführung einer OH- in eine Urethangruppierung mit einer paramagnetischen Verschiebung des geminalen Protons um ca. 1 ppm verbunden ¹⁵⁾: Die 3-O-Stellung der Carbamoylgruppe in 4 ist damit bestätigt.

Nach Totalhydrolyse von 5 mit 2N HCl wurden gaschromatographisch (nach O-Silylierung und N-Acetylierung ¹⁶⁾) Glucose, 2-Amino-2-desoxyglucose und Phosphoglycerinsäure nachgewiesen. Spaltung von 5 mit 2 proz. ethanolischer HCl ergab Ethyl- β -D-moenofuranosidurono-6,3-lacton ⁸⁾, das (nach Silylierung) gaschromatographisch durch Vergleich mit einer authent. Probe identifiziert wurde. Diese Informationen wurden durch das FD-Massenspektrum bestätigt, in dem der 5 entsprechende Molekülpeak bei m/z 784 auftrat. Das 270 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5 ist so kompliziert, daß nur die Signale des Moenuronsäureteils durch Vergleich mit 4 und anhand von Entkopplungsexperimenten zugeordnet werden konnten (s. Tab. 2). Man kann erkennen, daß auch bei 5 an C-3' der Moenuronsäure-Einheit die Urethan- und an C-1' die α -ständige Phosphatgruppe sitzt. - Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum waren die Signale der Carboxylgruppen, des Urethankohlenstoffs,



$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$		
1.22	$\text{CH}_3\text{-4' (s)}$	16.3	$4'\text{-CH}_3$	
2.03	$\text{NHCOCH}_3\text{ (s)}$	23.8		NHCOCH_3
3.8-4.0	$2'\text{-H}$	74.3	C-4'	
4.43	$5'\text{-H}$	74.5		
5.02	$3'\text{-H (d, } J_{2,3}=10\text{ Hz)}$	95.9	$\text{C-1' (d, } ^2J_{\text{C,P}}=5.9\text{ Hz)}$	
5.78	$1'\text{-H (dd, } J_{1,2}=3\text{ Hz, } ^3J_{\text{H,P}}=6.5\text{ Hz)}$	103.8		C-1''
		104.7		C-1''''
		159.8	OCONH_2	
		174.1	C-6'	
		175.8		NHCOCH_3
		177.6	C-1	

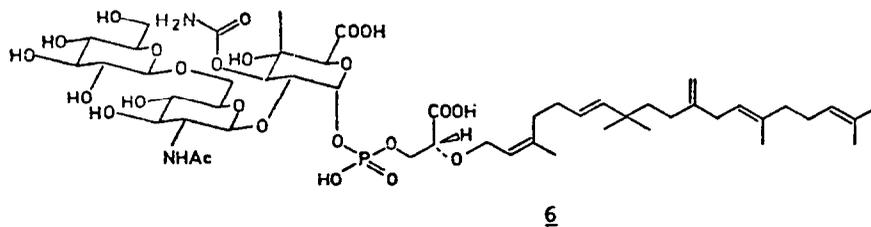
Tab. 2 $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ Daten von 5

der $4'\text{-CH}_3$ - und der N-Acetylgruppe, sowie der anomeren C-Atome zweifelsfrei zu identifizieren (s. Tab. 2). Die chemischen Verschiebungen von C-1'' und C-1'''' zeigen, daß die beiden glycosidischen Bindungen in 5 β -ständig sind ^{14,17}).

Aus diesen Befunden, verknüpft mit den früher abgeleiteten Moenomycin-A-Partialstrukturen 1, 2 und 4, läßt sich folgern, daß das geschilderte Moenomycinabbauprodukt entweder Formel 5 besitzt oder ein Strukturisomeres ist, bei dem die Disaccharideinheit aus Glucosamin und Glucose an C-4' des Moenuronsäureteils sitzt. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten wurde $^{13}\text{C-NMR}$ -spektroskopisch unterschieden: Die Alkylierung einer OH-Gruppe mit einem einfachen Alkyl- oder mit einem Glycosylrest ist im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum mit einer Tieffeldverschiebung des die Sauerstoff-Funktion tragenden C-Atoms (8-11 ppm) verbunden ¹⁷).

Da C-4' des Moenuronsäureteils als Singulett im teilentkoppelten Spektrum prinzipiell erkennbar ist, wurde untersucht, ob dieses Signal im Bereich von 74 ppm wie bei 4 zu finden oder nach tieferem Feld verschoben ist. Gerade dieser Teil des Spektrums ist jedoch außerordentlich kompliziert, und weder im routinemäßig aufgenommenen off-resonance-entkoppelten noch im protonengekoppelten Spektrum waren wegen Überlappungen einzelner Signalteile eindeutige Aussagen möglich. Durch off-resonance-Entkopplungsexperimente mit verschiedenen Frequenzen und gleichbleibender kleiner Sendeleistung (wobei die Restkopplungen umso kleiner sind, je näher man dem Absorptionsbereich der zu entkoppelnden Kerne kommt ¹⁸) konnte man eindeutig feststellen, daß das Singulettsignal von C-4' bei $\delta = 74.5$ liegt, also im Vergleich zu 4 nicht verschoben ist. Daraus kann man schließen, daß die Disaccharideinheit nicht an der

4-Position des Moenuronsäureteils haften kann, sondern in der 2-Position angeknüpft sein muß.



Die Strukturauflösung des Moenomycin A ist damit weitgehend abgeschlossen. Ergebnis aller bisherigen Strukturuntersuchungen sind die

beiden Partialformeln 3 und 6; lediglich ihre Verknüpfung ist noch nicht bekannt.

Wir danken Herrn K.Hobert für die Gaschromatogramme, der Hoechst AG und dem Fonds der Chemischen Industrie für großzügige finanzielle Förderung.

Literatur und Anmerkungen

- 1) Zusammenfassungen: ^{1a)} W.A.Slusarchyk, *Biotechnol. and Bioeng.* 13, 399 (1971); ^{1b)} G.Huber in F.E.Hahn (Herausg.), *Antibiotics*, Bd. 5, Springer, im Druck; ^{1c)} P.Welzel, *Proceedings of the 11th International Symposium on Chemistry of Natural Products*, Vol. 4, Part 2, S. 394, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia 1978
- 2) V.van Heijenoort, M.Derrien und J.van Heijenoort, *F.E.B.S. Letters* 89, 141 (1978)
- 3) P.E.Linett und J.L.Strominger, *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 231 (1973)
- 4) P.Welzel, F.-J.Witteler und D.Müller, *Tetrahedron Letters* 1665 (1976)
- 5) R.Tschesche und J.E.Moch, *Tetrahedron Letters*, im Druck
- 6) P.Welzel, G.Knupp, F.-J.Witteler, Th.Schubert, H.Duddeck, D.Müller und G.Höfle, *Tetrahedron*, im Druck
- 7) P.Welzel, F.-J.Witteler, L.Hermsdorf, R.Tschesche, H.Buhlke, P.Michalke, J.Simons, H.-W.Fehlhaber, J.Blumbach, G.Huber und W.Riemer, *Tetrahedron*, im Druck
- 8) N.Langensfeld und P.Welzel, *Tetrahedron Letters* 1833 (1978)
- 9) vgl. T.R.Thieme und C.E.Ballou, *Biochemistry* 10, 4121 (1971)
- 10) E.Pretsch, Th.Clerc, J.S.Seibl und W.Simon in F.L.Boschke (Herausg.), *Tabellen zur Strukturauflösung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden*, S. C 185, Springer, Berlin 1976
- 11) Auf diese Möglichkeit wies uns erstmals Herr Dr. F.L.Weisenborn, Squibb Institute for Medical Research, hin
- 12) Ch.Naydowski, Diplomarbeit Bochum 1979
- 13) D.R.Bundle, H.J.Jennings und I.C.P.Smith, *Canad.J.Chem.* 51, 3812 (1973)
- 14) St.J.Perkins, L.N.Johnson, D.C.Phillips, *Carbohydr. Res.* 59, 19 (1977)
- 15) B.T.Golding und R.W.Rickards, *Chem. and Ind.* 1963, 1081
- 16) S.Hara und Y.Matsushima, *J. Biochem. (Tokyo)* 71, 907 (1972)
- 17) T.Usui, N.Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H.Sugiyama, *J.C.S. Perkin Trans. I* 2425 (1973); P.Colson und R.R.King, *Carbohydr. Res.* 47, 1 (1976); dort weitere Lit.
- 18) R.R.Ernst, *J.Chem.Phys.* 45, 3845 (1966)

(Received in Germany 13 June 1979)