

Umwandlungen von Phenazinen in *Pseudomonas aureofaciens* [1]

Transformations of Phenazines in *Pseudomonas aureofaciens*

A. Römer and E. Lange

Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41

Z. Naturforsch. **38c**, 539–543 (1983); received April 19, 1983

Phenazines, *Pseudomonas aureofaciens*, Biosynthesis, Deuterium Labelling

Transformation of phenazines in *Pseudomonas aureofaciens* were investigated with deuterated phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1,6-dicarboxylic acid, methyl phenazine-1-carboxylate, dimethyl phenazine-1,6-dicarboxylate, and its mono methyl derivative. It was shown that hydroxylation and decarboxylation of phenazine-1-carboxylic acid gave rise to the variety of phenazines isolated from this strain.

Einige Bakterien, insbesondere Spezies der Gattung *Pseudomonas*, vermögen eine Vielzahl von Phenazinderivaten zu synthetisieren [2–5]. Untersuchungen über die Biosynthese dieser Verbindungen beschäftigten sich u. a. mit dem Aufbau des Phenazingerundgerüsts. Dieses wird, wie an verschiedenen Phenazinderivaten unterschiedlicher Bakterien gezeigt wurde, aus zwei Shikimisäuremolekülen gebildet [6–9], die Stickstoffatome stammen vorrangig aus dem Amidstickstoff des Glutamins [10]. Über die metabolischen Beziehungen der Phenazine untereinander war relativ wenig bekannt: 5-Methylphenazinium-1-carbonsäure (**1**) fungiert für Aeruginosin A (**2**) und B (**3**) sowie für Pyocyanin (**4**) als Vorläufer in der Biosynthese [11–13]. Aus Phenazin-1-carbonsäure (**5**) werden Pyocyanin (**4**), 2-Hydroxyphenazin (**6**) und 2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (**7**) gebildet [13]. Weiterhin scheint in *Brevibacterium* die Oxidation der Stickstoffatome die letzte Stufe der Biosynthese des Iodinins zu sein. Als weiterer Vorläufer wurde 6-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (**8**) gefunden [14].

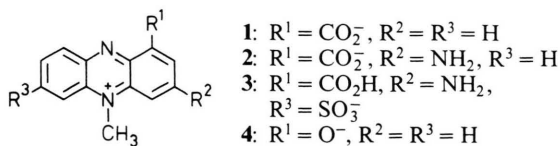
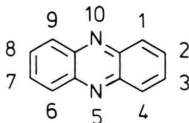


Abb. 1. Phenazine aus *Pseudomonas aeruginosa*.

Phenazin-1.6-dicarbonsäure (**9**) wurde als Schlüsselmetabolit, von dem sich die anderen Phenazinderivate ableiten, vorgeschlagen [14]. Mit dieser

Substanz durchgeführte Einfütterungsexperimente gelangen aber lediglich bei *Streptomyces lomodensis*, wo sie in das zwei Kohlenstoff-Substituenten enthaltende Lomofungin umgewandelt wurde [15], sowie bei mit Ether behandelten Zellen von *Pseudomonas aureofaciens* [17]. Als Erklärung für das Mißlingen entsprechender Versuche bei anderen *Pseudomonaden* und *Brevibacterium* bieten sich Probleme der Zellwandpermeabilität an [15–17].



Tab. I.

Verbindung	Art und Stellung der Substituenten						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-6	C-7	C-9
5	COOH						
6		OH					
7	COOH	OH					
8	COOH				OH		
9	COOH				COOH		
10	OH						
11	COOH	OH	OH				
12	COOH			OH			
13	COOH						OH
14	COOH	OH			COOH		
15	COOH	OH	OH		COOH	OH	

Im Verlauf unserer Untersuchungen wurde [6.7.8.9- $^2\text{H}_4$]-Phenazin-1-carbonsäure, [6.8- $^2\text{H}_2$]- bzw. [7.9- $^2\text{H}_2$]-2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure, [$^2\text{H}_6$]-Phenazin-1.6-dicarbonsäure und [$^2\text{H}_6$]-Phenazin-1-carbonsäure-6-carbonsäuremethylester in Stämme von *Pseudomonas aureofaciens* eingefüttert.

Sonderdruckanforderungen an Dr. A. Römer.

0341-0382/83/0700-0539 \$0.10/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Die Zugabe der markierten Verbindungen erfolgte in zwei Portionen zu Beginn sowie während der Phenazinproduktion der Bakterienkultur (s. Abb. 2).

Zur Identifizierung der nach Methylierung der Extrakte isolierten Phenazinderivate und Feststellung ihres Markierungsgrades diente die Massenspektrometrie. Damit ließen sich auch die auftretenden Isomere eindeutig unterscheiden [18].

Als Folgeprodukte der Phenazin-1-carbonsäure (5) wurden neben 2-Hydroxyphenazin (6), 1-Hydroxyphenazin (10) und 2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (7) auch 2,3-Dihydroxyphenazin-1-carbonsäure (11) sowie 4-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (12) und 6-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (8) gefunden. Bei Di-(2-hydroxyphenazinyl-1)methan [3], das gleichfalls Markierung aufwies (85% $^2\text{H}_4$), könnte es sich eventuell um ein Artefakt handeln. Bis auf 6-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (8) (Verlust eines ^2H -Atoms) enthalten alle genannten Verbindungen noch die vier Deuteriumatome der eingefütterten [6.7.8.9- $^2\text{H}_4$]-Phenazin-1-carbonsäure. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, daß die Oxidationen bzw. oxidativen Decarboxylierungen über ein Arenoxid als Zwischenstufe ablaufen [13]. Die Markierungsgrade der Folgemetaboliten der Phenazin-1-carbonsäure sind in Tab. II angegeben.

Da sich somit auch die Hydroxysäuren 8 und 12 von der Phenazin-1-carbonsäure ableiten lassen, scheint eine Oxidation an allen α -C-Atomen stattfinden zu können, denn bei *Pseudomonas phenazinium* wurde bereits gezeigt, daß 9-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (13) aus dem gleichen Vorläufer

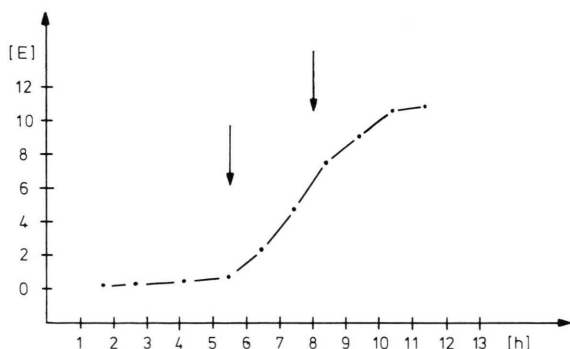


Abb. 2. Phenazinproduktion in *Pseudomonas aureofaciens*. Extinktionswerte bei $\lambda = 370$ nm der Chloroformextrakte wurden in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Start der Produktionskultur aufgetragen. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Zugabe von markierten Phenazinen an.

Tab. II. (Angabe ist der Markierungsgrad in Prozent bezogen auf die Gesamtmenge des isolierten Phenazinderivats.)

Verbindung	6	7	10	11	12	8
A:	87	87	87	83	88	92
B:	59			47		

A = Einfütterung der $^2\text{H}_4$ -Phenazin-1-carbonsäure.

B = Einfütterung der $^2\text{H}_2$ -Hydroxyphenazin-1-carbonsäure.

stammt [5]. Von der 6-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (8) nahm man bisher an, daß sie durch oxidative Decarboxylierung nur unmittelbar aus der Phenazin-1.6-dicarbonsäure (9) gebildet wird [5, 16].

Phenazin-1.6-dicarbonsäure (9) sowie ihre Hydroxyderivate 2-Hydroxyphenazin-1.6-dicarbonsäure (14) und 2.3.7-Trihydroxyphenazin-1.6-dicarbonsäure (15) enthielten in Übereinstimmung mit oben diskutierten, früheren Ergebnissen kein Deuterium.

Einfütterungsexperimente der markierten 2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (7) belegten durch den Nachweis deuterierter 2,3-Dihydroxyphenazin-1-carbonsäure (11) (s. Tab. II), daß die Hydroxylierung der Phenazin-1-carbonsäure in zwei Schritten erfolgt. Als weiteres Folgeprodukt von 7 wird durch Decarboxylierung 2-Hydroxyphenazin (6) gebildet.

Bei Einfütterungsversuchen von [6.7.8.9- $^2\text{H}_4$]-Phenazin-1-carbonsäuremethylester und [6.8- $^2\text{H}_2$] (bzw. [7.9- $^2\text{H}_2$])-2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäuremethylester konnte keine Metabolisierung dieser Verbindungen beobachtet werden.

Das gilt ebenso für [2.3.4.7.8.9- $^2\text{H}_6$]-Phenazin-1.6-dicarbonsäure sowie [2.3.4.7.8.9- $^2\text{H}_6$]-Phenazin-1-carbonsäure-6-carbonsäuremethylester. Letztere Substanz, die zur Umgehung einer bei 9 diskutierten Zellwandimpermeabilität eingefüttert wurde, bewirkte allerdings im Unterschied zu den anderen zugegebenen Phenazinderivaten eine drastische Verminderung der Phenazinproduktion, so daß die Untersuchung erschwert wurde.

Diskussion

Bei der natürlichen Umwandlung der Phenazine in *Pseudomonas aureofaciens* handelt es sich überwiegend um Hydroxylierungen einmal gebildeter Phenazincarbonsäuren. Im Fall der als Hauptpigment vorkommenden Phenazin-1-carbonsäure fin-

den die Oxidationen in dem die Carboxylgruppe enthaltenden Ring statt. Dabei wird die Position C-2 bevorzugt. In sehr geringem Ausmaß wird auch 6-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure gebildet, von der bisher angenommen wurde, sie entstünde durch oxidative Decarboxylierung direkt aus der Phenazin-1.6-dicarbonsäure. Bei Mehrfachhydroxylierungen werden die phenolischen Funktionen sukzessive eingeführt und führen über die 2-Hydroxy-, 2.3-Dihydroxy- schließlich zur 2.3.4-Trihydroxyphenazin-1-carbonsäure [3]. Phenazincarbonsäuremethylester werden nicht metabolisiert, was auf deren Unlöslichkeit in Wasser oder auf das Fehlen einer Esterase zurückzuführen ist. Abweichend davon verhält sich der Halbester der Phenazin-1.6-dicarbonsäure, der die Synthese der sonst häufig vorkommenden Phenazine unterbindet.

Dank

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert. Wir danken auch Herrn Prof. Budzikiewicz für seine wohlwollende Unterstützung.

Experimenteller Teil

Massenspektren (EI): CH7A (70 eV), z. T. mit Datensystem SS 200.

¹H-NMR-Spektren: Varian EM 390 und Bruker WP 60, die δ -Werte sind in ppm angegeben, als innerer Standard diente TMS.

UV-Absorption: Beckman Modell 25.

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Merck).

DC: Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator auf Al-Folien (Merck).

HPLC: Polygosil 60-D 10 (Macherey & Nagel).

Die Mischungsverhältnisse der chromatographischen Laufmittel sind in Volumeneinheiten angegeben.

Bakterienstämme. *Pseudomonas aureofaciens* INO 4₃ und dessen Varianten „N5M“ und „Hof“ aus der Stammsammlung des Hygiene-Instituts der Universität zu Köln.

Einfütterungsexperimente

Die Beimpfung des Nährmediums (pro l Wasser 5 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O, 5 g (NH₄)₂SO₄, 10 g Na-glutamat und 10 mg Fe(III)-nitrat, pH = 7,4)

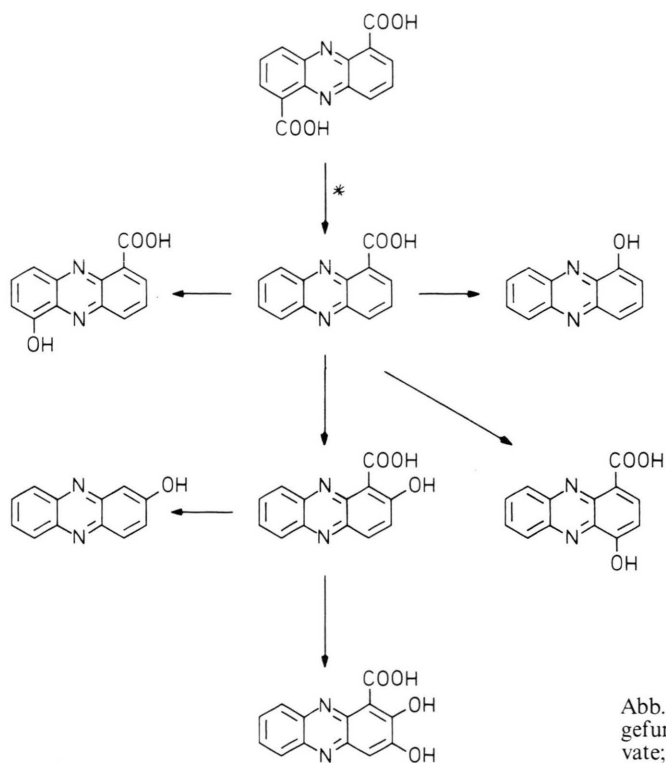


Abb. 3. Übersicht über die bei *Pseudomonas aureofaciens* gefundenen metabolischen Beziehungen der Phenazinderivate; *hypothetisch.

erfolgte mit einer 40 h alten Startkultur (Medium: 2% Pepton, 1% Glucose, 1% „Speakman's solution“, pH: 7,7). Die 100 ml-Kulturen wurden unter Rühren bei Raumtemperatur bebrütet. Zur Verfolgung der Phenazinproduktion wurde je 1 ml der Kultur entnommen, mit HCl auf pH 2 gebracht, mit dem gleichen Volumen CHCl_3 ausgeschüttelt und die Extinktion bei 370 nm gemessen. Zur Zugabe der markierten Phenazinderivate vgl. Abb. 3.

Konzentration der eingefütterten Phenazine:

$[\text{}^2\text{H}_4]$ -Phenazin-1-carbonsäure	50 mg/l
$[\text{}^2\text{H}_4]$ -Phenazin-1-carbonsäuremethylester	20 mg/l
$[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure	100 mg/l
$[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäuremethylester	20 mg/l
$[\text{}^2\text{H}_6]$ -Phenazin-1.6-dicarbonsäure	80 mg/l
$[\text{}^2\text{H}_6]$ -Phenazin-1-carbonsäure-6-carbonsäuremethylester	60 mg/l

Extraktion und Aufarbeitung

Nach ca. 12 h Wachstum wurden die Kulturen mit HCl auf pH \sim 2 angesäuert; das Zellmaterial trennte man größtenteils durch Zentrifugieren ab. Das Zentrifugat wurde zweimal mit dem gleichen Volumen CHCl_3 ausgeschüttelt, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Den Rohextrakt löste man in CH_3OH /Äther und veresterte mit Diazomethan.

Die Auftrennung der Substanzen erfolgte mittels HPLC mit Hexan/Isopropanol (30:1, 10:1, 5:1) als Laufmittel.

Synthese der markierten Verbindungen

a) $[\text{}^6,7,8,9\text{}^2\text{H}_4]$ -Phenazin-1-carbonsäure [13]

Markierungsgrad: 97%, Ausgangsmaterial $^2\text{H}_5$ -Anilin (99% $^2\text{H}_5$, Aldrich Chemical Company).

b) $[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure

Deuterierung von 2-Nitroanilin an C-4 und C-6: 2,1 g 2-Nitroanilin wurden mit 60 ml D_2O und 10 ml 20%iger DCl ca. 20 h zum Rückfluß erhitzt; der Rücktausch der Aminoprotonen erfolgte in Methanol.

Massenspektrum (m/z): 140 (M^+ , Basispeak), 123, 110, 94, 82, 67; ^1H -NMR (CD_3COCD_3 , TMS): 8,05 s (H-3), 7,41 s (H-5); 6,9 breites s ($-\text{NH}_2$); $[\text{}^2\text{H}_2]$ -

Markierungsgrad: 95%; Oxidation von 4,6- $^2\text{H}_2$ -Nitroanilin zu $[\text{}^4,6\text{}^2\text{H}_2]$ bzw. $[\text{}^5,7\text{}^2\text{H}_2]$ -Benzofurazanoxid analog [19]. Fp. 72 °C; hellgelbe Kristalle. Massenspektrum (m/z): 138 (M^+ , Basispeak), 122, 108, 92, 80, 78; ^1H -NMR (CD_3COCD_3 , TMS): 7,64 s (H-4 bzw. H-7); 7,48 s (H-5 bzw. H-6); $[\text{}^2\text{H}_2]$ -Markierungsgrad: 95%; Kondensation von $^2\text{H}_2$ -Benzofurazanoxid mit 2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester zu $[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäuremethylester-di-N-oxid analog [20]; Fp. 197 °C; braun-violettes Pulver; Massenspektrum (m/z): 288 (M^+), 272, 256, 240, 224, 214 (Basispeak), 198, 186, 168; Markierungsgrad 95%.

Hydrierung des Di-N-oxids zu $[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäuremethylester analog [20]. Säulenchromatographie: LM: CHCl_3/EE (2:1).

Fp: 140 °C; orange-gelbe Kristalle; Massenspektrum (m/z): 256 (M^+), 224 (Basispeak), 198, 196, 168; ^1H -NMR (CD_3COCD_3 , TMS): 10,37 s ($-\text{OH}$, 1H); 8,21 d, 9,7 Hz (H-4, 1H); 7,49 d, 9,7 Hz (H-3, 1H); 8,19 s (H-6, $\frac{1}{2}\text{H}$); 8,15 s (H-9, $\frac{1}{2}\text{H}$); 7,82 s (H-8, $\frac{1}{2}\text{H}$); 7,76 s (H-7, $\frac{1}{2}\text{H}$); 4,15 s (OCH_3 , 3H); Markierungsgrad: 95% $^2\text{H}_2$. Spaltung des $[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäuremethylesters mit BCl_3 [21]: 50 mg (0.2 mol) $[\text{}^2\text{H}_2]$ -2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäuremethylester wurden in 50 ml CHCl_3 gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dazu wurden 10 ml einer auf -70 °C gekühlten, 30-prozentigen Lösung von BCl_3 in CH_2Cl_2 gegeben. Die Farbe des Reaktionsgemisches schlug nach rot um, und es fiel innerhalb von 10 min ein roter Niederschlag aus. Man versetzte mit je 50 ml 10-prozentiger Natriumacetatlösung und 10-prozentiger Natronlauge, säuerte mit HCl und extrahierte das Produkt mit CHCl_3 . Es wurde mit Methanol digeriert und abgetrennt. Ausbeute: 38–47%. Fp: 214–216 °C (Zersetzung); orangefarbene Kristalle; MS (m/z): 242 (M^+), 224, 198 (Basispeak), 196, 170, 168, Markierungsgrad: 95% $^2\text{H}_2$.

c) $[\text{}^2\text{H}_6]$ -Phenazin-1.6-dicarbonsäure

100 mg Phenazin-1.6-dicarbonsäure (Synthese nach [13]) wurden mit 5 ml $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ und 1 ml $^2\text{H}_2\text{O}$ drei Tage unter Rückfluß erhitzt. Das Wasser wurde dreimal abgezogen und durch $^2\text{H}_2\text{O}$ ersetzt. Säulenchromatographie $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{AcOH}$ (95:5:1); Massenspektrum (m/z): 276 ($\text{M} + 2^+$), 258, 230 (Basispeak); Markierungsgrad: 84% $^2\text{H}_6$, 11% $^2\text{H}_5$, 3% $^2\text{H}_4$.

d) Veresterung der [$^2\text{H}_6$]-Phenazin-1.6-dicarbonsäure zu [$^2\text{H}_6$]-Phenazin-1-carbonsäure-6-carbonsäure-methylester

80 mg [$^2\text{H}_6$]-Phenazin-1.6-dicarbonsäure (roh) wurden in 100 ml Dimethylformamid durch Erhitzen unter Rückfluß gelöst. Man gab 2 g Al_2O_3 (Fa. Woelm, sauer, Aktivitätsstufe I) dazu und ließ mindestens 3 h rühren. Nach dem Abfiltrieren wurde der Rückstand getrocknet und in Äther aufgeschlämmt. Zum Methylieren wird aus Diazald (FLUKA) generiertes Diazomethan eingeleitet.

Man filtrierte, trocknete den Rückstand und eluierte mit 200 ml CHCl_3 /Eisessig (3:1) die gebildeten Produkte. Diese wurden durch Säulenchromatographie mit CHCl_3 /Methanol (15:1) voneinander getrennt. Die erste Fraktion enthielt $^2\text{H}_6$ -Phenazin-1-carbonsäure, die zweite den [$^2\text{H}_6$]-Phenazin-1-carbonsäuremethylester, und die dritte das Ausgangsprodukt. Die Reinigung des Halbesters erfolgte durch HPLC. Ausbeute: 10%; Fp.: 202 °C; gelbe Kristalle; Massenspektrum (m/z): 288 (M^+), 257, 244 (Basision), 229, 201, 185.

- [1] 11. Mitt. zur Chemie und Biochemie der Phenazine. 9. Mitt. A. Römer und R. B. Herbert, Z. Naturforsch. **37c**, 1070 (1982).
- [2] A. Römer, H. Scholl, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, Z. Naturforsch. **36b**, 1037 (1981).
- [3] W. Neuenhaus, A. Römer, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, Z. Naturforsch. **35b**, 385 (1980).
- [4] H. Korth, A. Römer, H. Budzikiewicz und G. Pulverer, Tetrahedron Lett. **1979**, 509.
- [5] G. S. Byng und J. M. Turner, Biochem. J. **164**, 139 (1977).
- [6] R. B. Herbert, F. G. Holliman, P. N. Ibberson, Tetrahedron Lett. **1974**, 151.
- [7] R. B. Herbert, F. G. Holliman und J. B. Sheridan, Tetrahedron Lett. **1974**, 4201.
- [8] R. B. Herbert, F. G. Holliman und J. B. Sheridan, Tetrahedron Lett. **1976**, 639.
- [9] U. Hollstein, D. L. Mock, R. B. Sibbitt, U. Roisch und F. Lings, Tetrahedron Lett. **1978**, 2987.
- [10] R. B. Herbert, J. Mann und A. Römer, Z. Naturforsch. **37c**, 159 (1982).
- [11] G. S. Hansford, F. G. Holliman und R. B. Herbert, J. Chem. Soc. Perkin I **1972**, 103.
- [12] M. E. Flood, R. B. Herbert und F. G. Holliman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. **1970**, 1514.
- [13] M. E. Flood, R. B. Herbert und F. G. Holliman, J. Chem. Soc. Perkin I **1972**, 622.
- [14] R. B. Herbert, F. G. Holliman und P. N. Ibberson, Chem. Soc. Chem. Commun. **1972**, 355.
- [15] S. P. Gulliford, R. B. Herbert und F. G. Holliman, Tetrahedron Lett. **1978**, 195.
- [16] P. R. Buckland, R. B. Herbert und F. G. Holliman, J. Chem. Research (S) **1981**, 363 und ibid. (M) **1981**, 4225.
- [17] P. R. Buckland, R. B. Herbert und F. G. Holliman, Tetrahedron Lett. **1981**, 595.
- [18] H. Budzikiewicz, D. Stöckl und A. Römer, J. Heterocycl. Chem. **16**, 1307 (1979).
- [19] F. B. Mallory, Org. Synth. Coll. **Vol. IV**, 74 (1963).
- [20] A. Römer und M. Sammet, Z. Naturforsch. **38b**, 866 (1983).
- [21] P. K. Brooke, S. R. Challand, M. E. Flood, R. B. Herbert und F. G. Holliman, J. Chem. Soc. Perkin I, **1976**, 2248.