

6-(Hydroxythio)carbonylpyridin-2-carbonsäure und Pyridin-2-carbon-säure-6-monothiocarbonsäure als biosynthetische Zwischenstufen bei der Bildung von Pyridin-2,6-di(monothiocarbonsäure) aus Pyridin-2,6-dicarbonsäure [1]

6-(Hydroxythio)carbonylpyridine-2-carboxylic Acid and Pyridine-2-carboxylic Acid-6-monothiocarboxylic Acid as Intermediates in the Biosynthesis of Pyridine-2,6-di(monothiocarboxylic Acid) from Pyridine-2,6-dicarboxylic Acid [1]

U. Hildebrand, K. Taraz und H. Budzikiewicz*

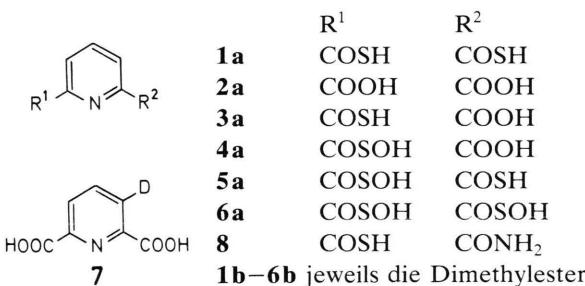
Institut für Organische Chemie der Universität, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **41c**, 691–694 (1986); eingegangen am 13. März 1986

Pyridine-2,6-di(monothiocarboxylic Acid), 6-(Hydroxythio)carbonylpyridine-2-carboxylic Acid, Biosynthesis, Deuterium Labelling, *Pseudomonas putida*

It is shown by feeding experiments with [$3\text{-}^2\text{H}$]pyridine-2,6-dicarboxylic acid that 6-(hydroxythio)carbonylpyridine-2-carboxylic acid and pyridine-2-carboxylic acid-6-monothiocarboxylic acid are intermediates in the biosynthesis of pyridine-2,6-di(monothiocarboxylic acid) from pyridine-2,6-dicarboxylic acid produced by *Pseudomonas putida*. Thus the series of biosynthetic steps $-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO-SOH} \rightarrow \text{COSH}$ has been demonstrated for the first time.

In vorausgehenden Arbeiten haben wir über die Isolierung und Strukturaufklärung von Pyridin-2,6-di(monothiocarbonsäure) **1a** [2], ihre Eisenkomplexe [3, 4] sowie eine Reihe verwandter Verbindungen (**2a–6a**) [5, 6] aus *Pseudomonas putida* berichtet. **1a** wird während der exponentiellen Wachstumsphase in das Kulturmedium abgegeben und verschwindet während der Absterbephase wieder [5]. Um Entstehung und Abbau der schwefelhaltigen Verbindungen näher zu untersuchen, wurden Einfütterungsversuche mit [$3\text{-}^2\text{H}$]-Pyridin-2,6-dicarbonsäure (**7**) [7] durchgeführt, über deren Ergebnisse im folgenden berichtet werden soll.



Durchführung der Untersuchungen

Dem Kulturmedium wurde unmittelbar vor dem Animpfen mit *Pseudomonas putida* „To8“ **7** zugesetzt. Bei großen Kulturvolumina (2 l, s. Meßreihe 3 in Tabelle I) nimmt die Menge an gebildetem **1a** wegen schlechter Durchlüftung und dadurch bedingt verringertem Zellwachstum stark ab; es ist daher günstiger, mehrere 200-ml-Kulturen nach Beimpfen mit derselben Stammkultur parallel zu züchten und vor der Aufarbeitung zu vereinigen. Da mit Schwankungen von Zelldichte, pH usw. bei unterschiedlichen Stammkulturen gerechnet werden muß, die ihrerseits Einfluß auf die Bildung von **1a** und die Metabolisierung von **7** haben, sollten nur Meßwerte innerhalb einer Meßreihe miteinander in Beziehung gesetzt werden.

Die verschiedenen Pyridindicarbonsäurederivate wurden wie in [6] beschrieben als Methylester isoliert, ihr Deuteriumgehalt wurde massenspektroskopisch bestimmt. Quantifizierung von **1a** erfolgte durch Bestimmung der Extinktion seines blauen Fe^{2+} -Komplexes [5], die der übrigen Verbindungen durch Vergleich der Peakflächen in den Gaschromatogrammen der Methylester.

Ergebnisse und Diskussion

Wie die Daten in Tabelle I zeigen, wird **7** zu den Thioderivaten **1a** und **3a–6a** metabolisiert, die Bil-

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/86/0700-0691 \$ 01.30/0



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.

Tabelle I.

Meßreihe Nr.	Zahl der Parallel- kulturen	Kultur- volumen [ml]	Menge an zugesetztem 7 [mg/l]	Wachstums- dauer [Std.]	Menge an gebildetem 1a [mg/l]	Deuterierungsgrad [%] von 1b				
						4b	3b	6b	5b	
1	12	200	140	25	8	49	21	(9)	(5)	9
	12	200	70	25	12	39	15	(3)	(3)	5
2	3	200	110	24	12		33			7
		200	110	73	7		19			11
	3	200	64	24	17		22			8
		200	64	73	10		13			8
3	2	2000	160	40	3	(27)	(7)		(< 1)	(< 1)
4	3	200	87	24	26			(25)		(6)
		200	87	75	18			(13)		(10)

Anmerkungen:

1. **3b** und **1b** wurden mit dem Festprobeneinlaß, **4b**, **6b** und **5b** (sowie **3b** und **1b** in Meßreihe 4) über den Gaschromatographen in das Massenspektrometer eingeführt.
2. Die Deuterierungsgrade wurden aus M^+ und m/z 136 ($[M - \text{COSOCH}_3]^+$) bei **4b**, m/z 136 ($[M - \text{COSCH}_3]^+$) bei **3b**, m/z 196 ($[M - \text{SOCH}_3]^+$) bei **6b**, m/z 180 ($M - \text{SOCH}_3^+$) bei **5b** bzw. m/z 152 ($[M - \text{COSCH}_3]^+$) bei **1b**, bei den eingeklammerten Werten wegen der zu geringen absoluten Intensität von M^+ bei GC-Messungen nur aus den genannten Fragmenten bestimmt. Die vollständigen Massenspektren von **4b**, **6b** und **5b** finden sich in [6], die von **3b** und **1b** in [8]. Die Werte sind für die unvollständige Deuterierung von **7** (96% Isotopenreinheit) korrigiert.

dungsrate von **1a** aber durch den Zusatz von **7** herabgesetzt (s. Abb. 1 und Tab. I). Der Deuteriumgehalt von **1a** steigt auch nach Ende der exponentiellen Wachstumsphase noch etwas an, während gleichzeitig seine Konzentration im Medium abnimmt. Wie bereits früher [5] gezeigt, ist dies zum größten Teil auf Hydrolyse zu **3a** zurückzuführen, wie die Abnahme von **1a** bei gleichzeitiger Zunahme von **3a** zeigt (Meßreihe 4: nach 24 Std. 26,2 mg/l **1b** und 2,6 mg/l **3b**, nach 74,5 Std. 17,7 mg/l **1b** und 15,9 mg/l **3b**). Da **3b** jedoch einen höheren D-Gehalt als **1b** aufweist, kann es nicht nur auf diese Weise entstehen*, es muß vielmehr auch Glied der zu **1a** führenden Biosynthesekette sein, wenn man davon ausgeht, daß die Höhe des Deuterierungsgrades der einzelnen Zwischenstufen durch ihre Reihenfolge in der Kette bestimmt wird. Im Einklang mit dieser Schlüssefolge-

zung steht die Beobachtung, daß sich der Deuterierungsgrad von **3b** nach längerer Inkubationszeit dem von **1b** anzugeleichen beginnt.

Vom biosynthetischen Standpunkt interessanter ist aber, daß in der Kette noch vor **3a** die (Hydroxythio)carbonylverbindung **4a** liegen muß, die von allen gefaßten Metaboliten den höchsten Markierungsgrad aufweist. **6b** und **5b** sind dagegen an das Ende der Kette zu plazieren, da ihr D-Gehalt (innerhalb der für die nur in Spuren vorliegenden Verbindungen möglichen Meßgenauigkeit) etwa dem von **1b** entspricht, also deutlich niedriger als der von **4b** und

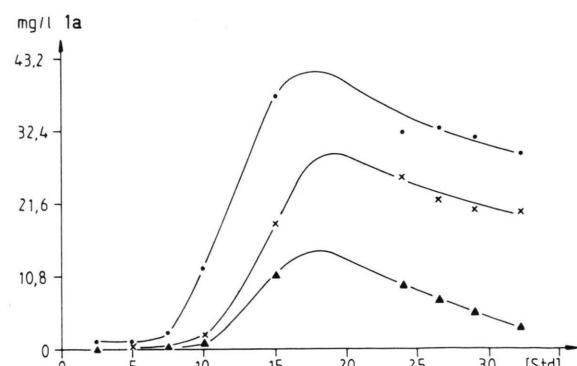
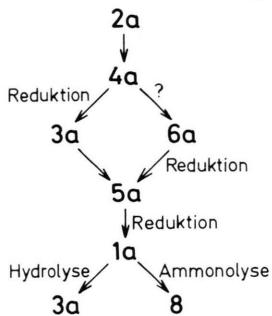


Abb. 1. Gebildete Menge von **1a** in Abhängigkeit von der Wachstumszeit und der zugesetzten Menge von **7** (● 0 mg/l, ○ 87 mg/l, △ 100 mg/l).

* Dies hatten wir vor Vorliegen der Markierungsversuche aus dem Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten von **1a** in bakterienfreier Nährlösung und in der Kulturlösung von *Ps. putida* „To8“ über längere Bebrütungszeiträume, bei denen offensichtlich die Hydrolyse überwiegt, geschlossen [5]. Bei dem ebenfalls im Kulturmedium nach längeren Inkubationszeiten nachzuweisenden Pyridin-2-carbonsäureamid-6-monothiocarbonsäure-S-methylester **8** handelt es sich um keine biosynthetische Zwischenstufe, sondern nur um das Ammonolyseprodukt von **1a** [5], wie der gegenüber **1b** etwas geringere D-Gehalt bestätigt.

3b liegt. Es läßt sich somit das folgende Biosyntheseschema aufstellen (auf eine Untersuchung der Bildung von **2a** wurde verzichtet, da diese für Bakterien bereits eingehend dokumentiert ist [9]):



Das Auftreten einer $-\text{C}(=\text{O})\text{SOH}$ -Gruppe als Zwischenglied bei der Bildung von $-\text{COSH}$ aus $-\text{COOH}$ ist bisher nicht nachgewiesen (und unseres Wissens auch nicht postuliert) worden. Es legt den Schluß nahe, daß ein durch Reaktion einer aktivierten Carboxylgruppe von **2a** mit einer SH-Gruppe z. B. von Coenzym A oder einem Cysteinderivat entstandener Thiocarbonat [10] oxidativ gespalten wird und anschließend Reduktion zur COSH-Gruppe erfolgt. Diese Reaktionsfolge könnte auch bei der Biogenese anderer Thiocarbonäuren eine Rolle spielen, wobei aber die (Hydroxythio)carbonyl-Zwischenstufe bisher nur bei **4a**, wo sie durch intramolekulare H-Brückenbindung stabilisiert ist, gefaßt werden konnte. Auch diese biosynthetische Zwischenstufe findet sich nur in geringer Menge im Kulturmedium.

Experimenteller Teil

Geräte

Massenspektrometer (Elektronenstoßionisation): Finnigan 3200 mit Gaschromatograph 9100, Kapillarsäule BP1 (26m) bzw. Kratos MS 25 RF mit Gaschromatograph Carlo-Erba Mega, Kapillarsäule BP1 (26m).

GC: Carlo-Erba HRGC 4160, FID, Kapillarsäule SE 52 (25m), Injektor und Detektor 250 °C.

Säulenchromatographie: Kieselgel 32–64 µm (Woelm, Eschwege), trockenes CH_2Cl_2 , Kontrolle der Fraktionen mit LKB 2089 Uvicord III bei 254 und 277 nm.

Bakterienzucht und Aufarbeitung

Die Zucht von *Pseudomonas putida* „To8“ (bezüglich der Charakterisierung des Stammes s. [4]) er-

folgte wie in [5] beschrieben durch Animpfen von mit **7** [7] frisch versetztem Kulturmedium in 200-ml- bzw. 2-l-Parallelkulturen, die Isolierung der Pyridinderivate durch Extraktion mittels XAD-4-Kunst-

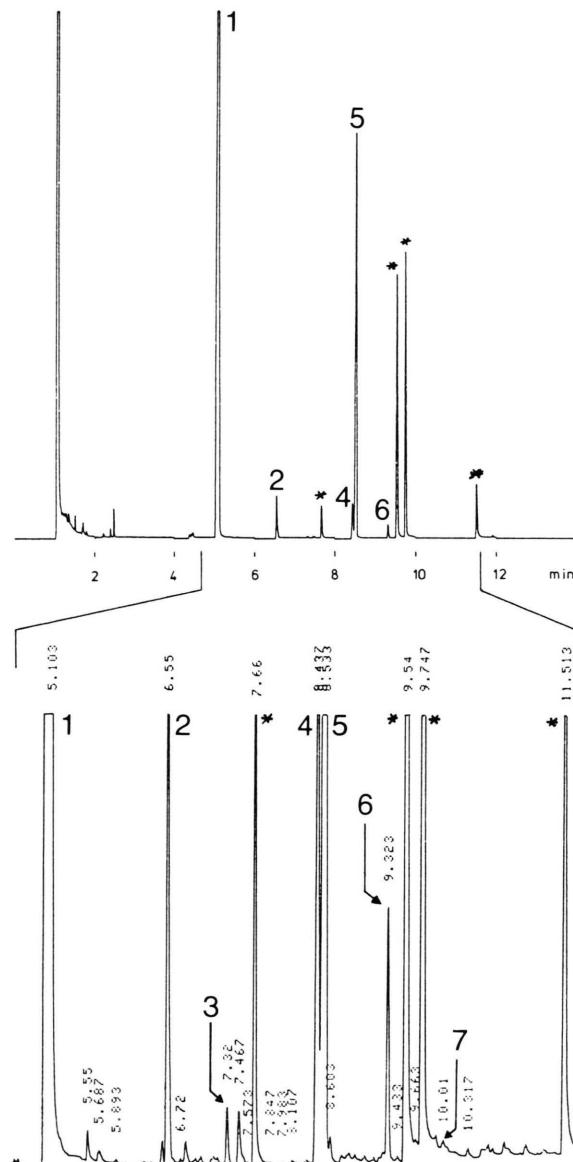


Abb. 2. Gaschromatogramm eines methylierten XAD-Extraktes von *Ps. putida* „To8“. Die untere Spur zeigt einen Ausschnitt mit 16facher Verstärkung. 1: **2b**, 2: **3b**, 3: **4b**, 4: Pyridin-2-monothiocarbonäure-O-methylester-6-monothiocarbonäure-S-methylester, 5: **1b**, 6: **5b**, 7: **6b**. Die mit * bezeichneten Peaks stammen von 2,4-Dihydro-2H-pyrrol-Derivaten, über deren Strukturermittlung a. a. O. berichtet werden soll [11].

harz, Methylierung mit CH_2N_2 und anschließende Säulenchromatographie, wobei die Elution der Fraktionen mit Hilfe eines UV-Detektors verfolgt wurde. **1b** und **3b** konnten rein erhalten und daher mittels eines Festprobeneinlasses massenspektrometrisch vermessen werden, **4b**, **5b** und **6b** fielen als Gemisch an und wurden durch GC/MS analysiert. Quantifizierung von **1a** erfolgte durch Photometrie seines Fe^{2+} -Komplexes [5], die der übrigen Komponenten im Verhältnis dazu durch Integration der GC-Peakflächen. Bei Untersuchungen zu unterschiedlichen Zei-

ten innerhalb einer Meßreihe erfolgte Entnahme von aliquoten Probenmengen.

Dank

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie möchten wir für die Förderung dieses Forschungsprojektes bestens danken. Der Bakterienstamm wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. H. Korth, Hygiene-Institut der Universität zu Köln, überlassen.

- [1] Teil XXIX der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“. Für Teil XXVIII s. G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **41c**, 497 (1986).
- [2] W. Ockels, A. Römer, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 3341.
- [3] U. Hildebrand, J. Lex, K. Taraz, S. Winkler, W. Ockels und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **39b**, 1607 (1984).
- [4] U. Hildebrand, K. Taraz, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **40c**, 201 (1985).
- [5] H. Budzikiewicz, U. Hildebrand, W. Ockels, M. Reiche und K. Taraz, *Z. Naturforsch.* **38b**, 516 (1983).
- [6] U. Hildebrand, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **40b**, 1563 (1985).
- [7] U. Hildebrand, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **22**, 293 (1985).
- [8] H. Budzikiewicz, E. Lange und W. Ockels, *Phosphorus and Sulfur* **11**, 33 (1981).
- [9] D. Gross, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* (W. Herz, H. Grisebach und A. I. Scott, Hrsg.), *Bd. 28*, S. 109ff. und dort angegebene Literatur, Springer, Wien 1970.
- [10] A. L. Lehninger, *Biochemie*, S. 541ff., Verlag Chemie, Weinheim 1979.
- [11] U. Hildebrand und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **41b**, in press (1986).