

# Pseudobactin- und Pseudobactin A-Varianten: Neue Peptidsiderophore vom Pyoverdin-Typ aus *Pseudomonas fluorescens* „E2“ [1]

Variants of Pseudobactin and Pseudobactin A: New Pyoverdin Type Peptide Siderophores from *Pseudomonas fluorescens* “E2”

K. Taraz, D. Seinsche und H. Budzikiewicz

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

Z. Naturforsch. **46c**, 522–526 (1991); received February 20/April 9, 1991

*Pseudomonas fluorescens*, Siderophores, Pyoverdins, Pseudobactin, Structure Elucidation

From a strain of *Pseudomonas fluorescens* pseudobactin and several related compounds were isolated and their structures were elucidated. In this way a reference compound (**5**) could be obtained for the unambiguous determination of the absolute configuration of C-1 of the pyoverdin chromophore in newly isolated representatives of this class.

## Einleitung

Pseudobactin (**1**) [2, 3] hat für die Untersuchungen von Pseudomonaden-Siderophoren vom Pyoverdin-Typ [4] grundlegende Bedeutung erlangt, da es der einzige Vertreter dieser Gruppe ist, dessen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte. Alle späteren Arbeiten beziehen sich in der einen oder anderen Form auf die für **1** publizierten spektroskopischen Daten. Von dem von Teintze ursprünglich bearbeiteten **1** scheinen keine Proben mehr zur Verfügung zu stehen und es dürfte auch in der Zwischenzeit keine Neuisolierung vorgenommen worden sein – jedenfalls wird in der umfangreichen Literatur, die sich mit der Struktur weiterer Pyoverdine befaßt, nie von einem direkten Vergleich berichtet. Dies hat insbesondere im Hinblick auf den Chinolinchromophor Bedeutung, der den meisten Pyoverdinen gemeinsam ist, und dessen Stereochemie zu Problemen geführt hat [5, 6], die durch erneute Isolierung von **1** (vgl. unten und [7]) nun gelöst werden konnten: Es gelang uns, aus dem Kulturmedium des Stammes „E2“ von *Pseudomonas fluorescens* mehrere Pyoverdine zu isolieren, von denen sich eines – wie im folgenden gezeigt werden soll – mit **1** identisch erwies. Bei den Begleitkomponenten handelt es sich um von **1** abgeleitete Verbindungen.

## Ergebnisse und Diskussion

Der untersuchte Stamm E2 von *Pseudomonas fluorescens* wurde aus einem Rapsfeld bei Heidelberg im Rahmen eines Untersuchungsprogramms auf Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) isoliert und zeigt *in vitro* signifikante Hemmung von *Fusarium nivale* und *Rhizoctonia cerealis* [8]. Zucht, Aufarbeitung des Kulturmediums nach  $\text{Fe}^{3+}$ -Zusatz und Isolierung der Pyoverdine erfolgte nach dem bereits a.a.O. [6, 9] beschriebenen Verfahren. Es wurden vier Eisenkomplexe erhalten, aus denen durch Dekomplexierung mit 8-Hydroxychinolin und anschließende Reinigung durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 [6, 9] die Verbindungen **1–4** freigesetzt werden konnten.

Die  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe der Verbindungen **1–3** zeigen das für den Pyoverdin-Chromophor typische pH-unabhängige Absorptionsmaximum der  $\pi, \pi^*$ -Bande (**1** und **2** bei 401, **3** bei 405 nm) und breite charge-transfer-Banden im Bereich von 450–500 und bei 550 nm [5, 6, 9]. Die UV-Spektren der freien Verbindungen sind stark pH-abhängig (das Absorptionsmaximum verschiebt sich wegen der fortschreitenden Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppen von 380 nm bei pH 3.0 nach 410 nm bei pH 9,6 [10, 11]). Der  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplex von **4** zeigt ein spektrales Verhalten, das dem von Eisen-Catechol-Komplexen entspricht: Banden bei 235 und 311 nm entsprechen  $\pi, \pi^*$ - und intramolekularen charge-transfer-Übergängen [12], die Lage der langwelligen charge-transfer-Bande (und damit die Farbe der wäßrigen Lösung von  $\text{Fe}^{3+}$  – **4**) ist pH-abhängig (pH 3,2 ... 555 – blauviolett, 6,4 ... 530 – rotviolett, 11,6 ... 580 nm – blau). Ähnliches

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0939–5075/91/0700–0522 \$ 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.

Absorptionsverhalten wurde bei den gelegentlich als Begleitsubstanzen der Pyoverdine beobachteten Verbindungen mit in 5,6-Position hydriertem Chromophor [3, 13] beobachtet. So unterscheidet sich z.B. Pseudobactin A auf diese Weise von Pseudobactin [3].

Quantitative Aminosäureanalyse durch Gaschromatographie ihrer TAB-Derivate [5, 6, 9] nach Hydrolyse mit 6 N HI [5, 6, 9] ergab für alle vier Verbindungen 2 L-Ala, D-allo-Thr, D-threo- $\beta$ -Hydroxy-Asp, D-Orn und L-Lys (Hydrolyse mit 6 N HCl liefert  $\delta$ -N-Hydroxy-Orn), deren absolute Konfiguration durch gaschromatographische Analyse der N-Trifluoracetyl-*i*-propylester an L-Chirasil-Val [9] bestimmt werden konnte. Bei **1** und **2** kommt noch Bernsteinsäure, bei **4** L-Glu hinzu. Die für **1** bestimmte Zusammensetzung entspricht der für Pseudobactin ermittelten [2, 3], bei **2** handelt es sich um das häufig als begleitendes Artefakt [14] beobachtete Analoge mit freier Bernsteinsäure (vgl. unten). Bei **3** konnte keine zusätzliche Säurekomponente nachgewiesen werden. Dies ist typisch für Pyoverdine [5, 15–17], bei welchen  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure amidisch an den Chromophor gebunden ist. Entsprechend läßt sich nach Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> bei Hydrolyse mit HCl  $\alpha$ -Hydroxyglutarinsäure [5, 15–17] und bei Hydrolyse mit HI Glutarinsäure detektieren [5, 15–17].

Daß die  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure wie bei allen bisher gefundenen Pyoverdinen mit ihrer  $\gamma$ -Carboxylgruppe amidisch an den Chromophor gebunden ist, beweist das elektrophoretische Verhalten, demzufolge die freie ( $\alpha$ -)Carboxylgruppe noch bei pH 3 weitgehend dissoziiert vorliegt (die pK-Werte für  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure sind 2,3 für die 1- und 4,8 für die 5-Funktion) [18].

Durch Hydrolyse von **1** konnte der „modifizierte“ Chromophor **5** (bei welchem die NH<sub>2</sub>-Gruppe an C-5 durch –OH ersetzt ist [5, 7, 9]) erhalten werden, allerdings waren wegen der schwereren Spaltbarkeit der Amidbindung zwischen der C-1-Carboxylgruppe des Chromophors und der  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des Lys drastischere Bedingungen (3 N HCl, 7 Tage, 110 °C) als bei anderen Pyoverdinen [5–7, 9] notwendig. Als Molmasse für die [M+H]<sup>+</sup>-Ionen ließen sich durch FAB-Massenspektroskopie für **1** 989 (entsprechend Pseudobactin), für **2** 990 (entsprechend dem Ersatz von Bernsteinsäureamid durch Bernsteinsäure), für **3** 1018 (Ketoglutarinsäure statt Bernsteinsäure) und für **4** 1021 (s.u.)

bestimmen. Alle vier Verbindungen zeigen das typische retro-Diels-Alder-Fragment [5–7, 9] bei *m/z* 687, das die gleiche Zusammensetzung der Peptidketten bestätigt. Die [M+H]<sup>+</sup>-Ionen der Fe<sup>3+</sup>-Komplexe sind erwartungsgemäß um 53 u (+Fe<sup>3+</sup> – 3 H<sup>+</sup>) zu höheren Massen verschoben.

Den abschließenden Beweis für die Identität von **1** und Pseudobactin erbrachte der Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren, wobei die früher getroffene Zuordnung [3] durch Einstrahllexperimente bestätigt werden konnte. Bei **3** werden die für die verschiedenen Gleichgewichtsformen der  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure [5, 6, 15] typischen breiten Signalgruppen zwischen 2,3 und 2,9 ppm beobachtet, denen auch das komplexe <sup>13</sup>C-NMR-Muster (Signale bei 180,5/181,2, 176,4/176,7, 94,3/95,5 sowie mehrere im Bereich von 30–34 ppm) entspricht (bezgl. einer Diskussion vgl. [5, 15–17]). Für **4** legen das UV/VIS-Spektrum und die Molmasse einen 5,6-Dihydrochromophor sowie eine Glutaminsäure-Seitenkette nahe. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **4** stimmt mit dem von Pseudobactin A [3] vollkommen überein mit Ausnahme des Fehlens der Signale bei 2,64 ppm (Succinamid), anstelle derer die für Glu charakteristischen Signale bei 2,17 ( $\beta$ ), 2,57 ( $\gamma$ ) und 3,79 ppm ( $\alpha$ ) zu beobachten sind. Vergleich dieser Werte mit den für peptidisch gebundenem Glu ( $\alpha$ : 4,3;  $\beta$ : 2,0;  $\gamma$ : 2,3 ppm) und Glutamin ( $\alpha$ : 3,77;  $\beta$ : 2,14;  $\gamma$ : 2,45 ppm) gefundenen zeigt auch, daß Glu (wie auch  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, s.o.) mit seiner  $\gamma$ -Carboxylgruppe amidisch an den Chromophor gebunden ist (für ein weiteres Pyoverdin, bei dem die entsprechende Verknüpfung chemisch bestätigt wurde [20], finden sich  $\alpha$ : 3,84;  $\beta$ : 2,26;  $\gamma$ : 2,77 ppm). Dies entspricht auch der bei einem Pyoverdin [14] nachgewiesenen Umwandlung Glu  $\rightleftharpoons$   $\alpha$ -Ketoglutarinsäure-Seitenkette.

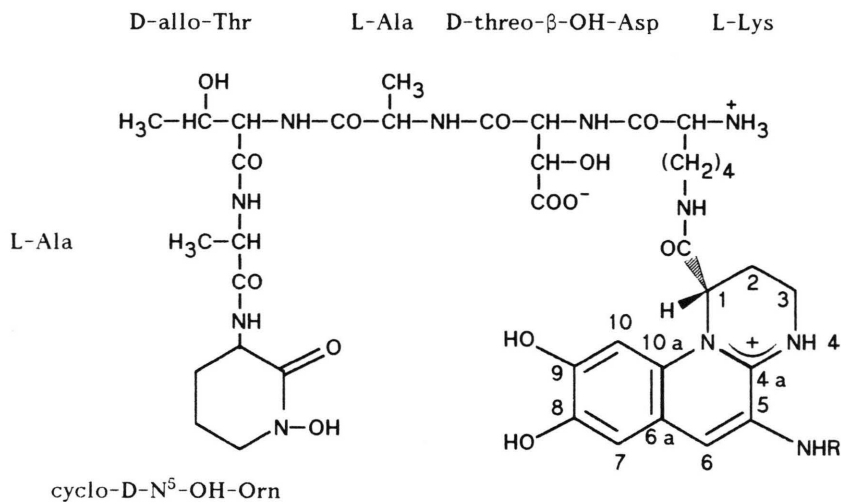
Da die <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von Pseudobactin und Pseudobactin A von Teintze zwar gemessen, die Signale aber nur z. T. zugeordnet worden sind, fassen wir unsere Daten für **1** und **4** in Tab. I zusammen. Die Zuordnungen erfolgen durch Vergleich mit Literaturdaten anderer Pyoverdine und Azotobactine [5, 6, 9, 17, 19, 21], bei denen 2D-NMR-Techniken zur Stützung angewandt worden sind (bezgl. der  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure-Seitenkette von **3** s.o.). Bei **4** finden sich an Stelle der Succinamides Pseudobactin A [3] die entsprechenden Glutaminsäure-Signale.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist somit **1**

Tab. I.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **1** und **4** in gepuffertem (pH 3,0)  $\text{D}_2\text{O}$ , innerer Standard DSS (chemische Verschiebungen in ppm relativ zu TMS:  $\delta(\text{TMS}) = \delta(\text{DSS}) - 1,61$  ppm).

C-Atom	<b>1</b>	<b>4</b>	C-Atom	<b>1</b>	<b>4</b>
$\beta$ -Ala	17,6/17,8	17,7/17,9	$\beta$ -Thr	68,1	68,2
$\gamma$ -Thr	19,8	19,9	$\beta$ -(OH)-Asp	73,1	73,0
$\gamma$ -(OH)-Orn	21,1	21,2	Chr C-10	101,5	106,0
$\gamma$ -Lys	22,5 <sup>a</sup>	22,6 <sup>a</sup>	Chr C-7	115,1	117,6 <sup>a</sup>
Chr C-2	23,2 <sup>b</sup>	23,6 <sup>b</sup>	Chr C-6a	116,1	117,9 <sup>b</sup>
$\beta$ -Glu	—	26,7	Chr C-5	118,8	48,6
$\beta$ -(OH)-Orn	27,8	27,8	Chr C-10a	132,9	129,5
$\delta$ -Lys	28,9	29,0	Chr C-6	140,0	29,2
Acyl C-3'	30,9	—	Chr C-8	144,6	143,4
$\beta$ -Lys	31,6 <sup>a</sup>	31,7	Chr C-4a	150,5	161,1
Acyl C-2'	31,8 <sup>b</sup>	—	Chr C-9	152,3	145,1
$\gamma$ -Glu	—	32,4	(OH)-Orn CO	167,7	167,8
Chr C-3	36,4	37,4	Chr CO	171,0 <sup>a</sup>	171,3 <sup>a</sup>
$\epsilon$ -Lys	40,4	40,3	Thr CO	171,4 <sup>b</sup>	171,4 <sup>b</sup>
$\alpha$ -Ala	51,0/51,3 <sup>a</sup>	51,1/51,3 <sup>a</sup>	(OH)-Asp 1-CO	172,4 <sup>a</sup>	172,3 <sup>a</sup>
$\alpha$ -(OH)-Orn	51,4 <sup>b</sup>	51,5 <sup>b</sup>	Lys CO	172,5 <sup>b</sup>	172,6 <sup>b</sup>
$\delta$ -(OH)-Orn	52,8	52,8	Glu 1-CO	—	175,1
$\alpha$ -Lys	54,3	54,4	Ala CO	175,6/176,1	175,6/176,1
$\alpha$ -Glu	—	55,1	Glu 5-CO	—	176,5
$\alpha$ -(OH)-Asp	57,7 <sup>a</sup>	57,7 <sup>a</sup>	Acyl C-1'	177,5	—
Chr C-1	58,4 <sup>b</sup>	57,2 <sup>b</sup>	(OH)-Asp 4-CO	177,5	177,0
$\alpha$ -Thr	60,1	60,2	Acyl C-4'	178,8	—

a, b ... Zuordnung nicht sicher (ggf. zu vertauschen).



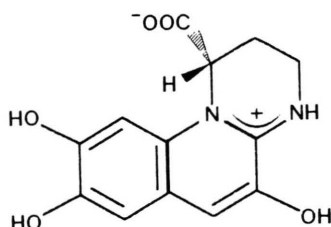
- |     |  |                        |        |
|-----|--|------------------------|--------|
| (1) | R = $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$                         | Pyoverdin-Q-Ld'AtAo'*  | — SUCA |
| (2) | R = $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$                           |                        | — SUC  |
| (3) | R = $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{COOH}$                 |                        | — KGL  |
| (4) | 5,6-Dihydro-   |                        |        |
|     | R = $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{COO}^-$ | Pyoverdin-QH-Ld'AtAo'* | — GLU  |

identisch mit Pseudobactin [2, 3], **2** dessen Hydrolyseprodukt (Bernsteinsäure statt Bernsteinsäureamid) und **3** das  $\alpha$ -Ketoglutaräureanaloge. **4** ist schließlich das Glutaminsäureanaloge von Pseudobactin A. Nach der Kurzschreibweise [6, 9] kommen ihnen die Bezeichnungen

Pyoverdine-Q-Ld'AtAo'* – SUCA	(1)
– SUC	(2)
– KGL	(3)
Pyoverdine-QH-Ld'AtAo'* – GLU	(4)

zu. **4** ist von möglichem biogenetischem Interesse, da die Dihydroverbindungen Zwischenstufen auf dem Weg von den peptidischen Ferribactinen zu den Pyoverdinen sein könnten [4, 22].

Wichtiger aber ist die erneute Isolierung von Pseudobactin (**1**). Teintze hatte seinerzeit den Chromophor nicht isoliert und nur die CD-Spektren von Pseudobactin bzw. Ferri-Pseudobactin bestimmt, so daß auf die Konfiguration von C-1 des Chromophors bei anderen Pyoverdinen nur durch Vergleich mit deren CD-Spektren geschlossen werden konnte. Dies hat bereits zu Fehlinterpretationen geführt [5, 6], da der Einfluß der unterschiedlichen Peptidketten auf die CD-Spektren nicht abgeschätzt werden kann. Das CD-Spektrum von **1** stimmt – wie nach der Strukturermittlung nicht anders zu erwarten – mit dem für Pseudobactin veröffentlichten überein. Der daraus isolierte „modifizierte“ Chromophor **5** zeigt in 1 N HCl CD-Banden bei 253 nm ( $\Delta\epsilon + 0,5$ ), 296 nm ( $\Delta\epsilon - 1,0$ ) und 354 nm ( $\Delta\epsilon + 0,5$ ) in Übereinstimmung mit dem aus den Pyoverdinen I–III [5], C–E [6] und GM-I/II [9] isolierten. Da **5** aus Pyoverdinen leicht zu isolieren ist, kann die Konfiguration an C-1 nunmehr eindeutig bestimmt werden. Offen ist die Konfiguration an C-5 des 5,6-Dihydrochromophors, der bisher nicht in Substanz isoliert werden konnte. Da der biogenetische Vorläufer des Chinolinteils des Chromophors jedoch D-Tyrosin ist [22], ist für das C-5 *R*-Konfiguration wahrscheinlich.



Struktur des modifizierten Tryhydroxychinolin-Chromophors (**5**).

## Material und Methoden

UV/VIS-Spektren: Perkin-Elmer Hitachi 200 und Perkin-Elmer Lambda 7. Lösung: H<sub>2</sub>O mit Phosphatpuffer auf pH 6,8 eingestellt, Veränderungen des pH-Wertes durch Zusatz von HCl bzw. KOH.

NMR-Spektren: Bruker AM 300. Lösung: D<sub>2</sub>O, bei **1** und **4** auf pH 3, bei **3** auf pH 7 eingestellt. Standard DSS.

Massenspektren: Finnigan MAT 3200 mit Gaschromatograph 9110, SE-54-Säule (GC/MS); Finnigan MAT HSQ-30 mit Ion-Tech-FAB-Kanone (Xe).

Papierelektrophorese: Camag HVE-System 60600 mit Elektrophoresepapier MN 261. Standard: Desferal® (+1) sowie Glucose (neutral).

## Dank

Der deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie möchten wir für finanzielle Unterstützung, Herrn Prof. G. Wolf, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen, für die Überlassung des Bakterienstammes und Herrn Prof. Dr. G. Snatzke, Institut für Strukturchemie der Universität Bochum, für die CD-Messungen bestens danken.

- [1] Teil XLIV der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“, für Teil XLIII s. H. Schäfer, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **46c**, 398 (1991).
- [2] M. Teintze, M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong und D. van der Helm, *Biochemistry* **20**, 6446 (1981).
- [3] M. Teintze und J. Leong, *Biochemistry* **20**, 6457 (1981).
- [4] H. Budzikiewicz, *Studies in Natural Products Chemistry* (Herausg. Atta-Ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam, im Druck.
- [5] K. Poppe, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Tetrahedron* **43**, 2261 (1987).
- [6] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 375.
- [7] J. Michels, G. Briskot, J. Hahn, J. Lex, H. Schmickler, K. Taraz und H. Budzikiewicz, in Vorbereitung.
- [8] G. Wolf, Univ. Göttingen, private Mitt.
- [9] G. Mohn, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **45b**, 1437 (1990).
- [10] J. C. MacDonald und G. G. Bishop, *Biochem. Biophys. Acta* **800**, 11 (1984).
- [11] J. M. Meyer und M. A. Abdallah, *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319 (1978).
- [12] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 2. Aufl., Kap. I, Thieme, Stuttgart 1984.
- [13] S. B. Philson und M. Llinas, *J. Biol. Chem.* **257**, 8081 (1982).
- [14] H. Schäfer, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **46c**, 398 (1991).
- [15] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **41c**, 497 (1986).
- [16] K. Poppe, Dissertation, Universität zu Köln (1986).
- [17] G. Briskot, Dissertation, Universität zu Köln (1988).
- [18] J. Jen und W. Knoche, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **73**, 539 (1969).
- [19] C. C. Yang und J. Leong, *Biochemistry* **23**, 3534 (1984).
- [20] K. Geisen, Dissertation, Universität zu Köln (1990).
- [21] P. Demange, A. Bateman, A. Dell und M. A. Abdallah, *Biochemistry* **27**, 2745 (1988).
- [22] K. Taraz, R. Tappe, H. Schröder, U. Hohlneicher, I. Gwose, H. Budzikiewicz, G. Mohn und J. L. Lefèvre, *Z. Naturforsch.* **46c**, 527 (1991).