

Dihydroxyoverdinsulfonsäuren - Zwischenstufen bei der Biogenese?

Dihydroxyoverdin Sulfonic Acids - Intermediates in the Biogenesis?

H. Schröder, J. Adam, K. Taraz und H. Budzikiewicz*

Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, Greinstraße 4, D-50939 Köln

Z. Naturforsch. **50 c**, 616–621(1995); received May 4/June 12, 1995

Siderophores, Dihydroxyoverdin Sulfonic Acid, Pyoverdin, *Pseudomonas aptata*, *Pseudomonas fluorescens* biogenesis

From the culture media of *Pseudomonas aptata* **4b** and of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 5,6-dihydroxyoverdin-7-sulfonic acids could be isolated. Their possible role in the biogenetic pathway leading to the pyoverdins will be discussed.

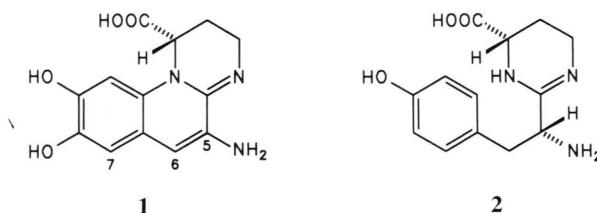
Einleitung

Vertreter der sogenannten Fluoreszentengruppe des Genus *Pseudomonas* bilden eisenkomplexierende Verbindungen (Siderophore), wenn sie unter Eisenmangelbedingungen gezüchtet werden. Strukturell und funktionell am interessantesten sind die Pyoverdine, welche als charakteristischen Bestandteil den Chromophor (1S)-5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido-[1,2a]chinolin-1-carbonsäure (**1**) enthalten, dessen Carboxylgruppe mit dem N-Terminus einer Peptidkette verknüpft ist. Gewöhnlich findet man mehrere Pyoverdine nebeneinander, die alle dieselbe Peptidkette enthalten, sich aber in den an die NH₂-Gruppe des Chromophors gebundenen

Ferribactin-Chromophor **2**, ein Kondensationsprodukt von L-Dab und D-Tyr zyklisiert oxidativ zu 5,6-Dihydro-**1**, das letztlich zu **1** dehydriert wird. Wir möchten nun die Isolierung und Strukturaufklärung von 5,6-Dihydroxyoverdin-7-sulfonsäuren beschreiben, welche möglicherweise Zwischenstufen auf dem Weg von **2** nach **1** sind.

Materialien und Methoden

Bakterienzucht und Isolierung: (a) *Pseudomonas aptata* 4b. Die Zucht erfolgte wie beschrieben (Budzikiewicz *et al.*, 1992) über 96 h, ebenso die Aufarbeitung und die Isolierung des Fe(III)-Komplexes (Mohn *et al.*, 1990). Der XAD-Extrakt wurde an CM-Sephadex in zwei braune Fraktionen aufgetrennt. Die erste Fraktion ließ sich an CM-Sephadex in 5 Fraktionen weiter zerlegen, von welchen die zweite (violette) dem UV/Vis-Spektrum nach ein Dihydroxyoverdin enthielt. Die letzte Reinigung erfolgte über Biogel, die Dekomplexierung mittels 8-Hydroxychinolin. (b) *Pseudomonas fluorescens*. Die Zucht erfolgte wie beschrieben (Hohlneicher *et al.*, 1995), ebenso die Aufarbeitung (Mohn *et al.*, 1990). Der XAD-Extrakt ließ sich an CM-Sephadex C-25 in zehn Fraktionen auftrennen, von welchen die siebente (tiefrotviolette) die Dihydroxyoverdinsulfonsäuren **7** und **8** enthielt. Die Reindarstellung erfolgte an DEAE-Sephadex A-25. Für die Dekomplexierung wurde ein neues Verfahren entwickelt: Der Eisenkomplex wird an einer RP-18 Sep-Pak-Kartusche adsorbiert, welche mit 6-prozentiger Kaliumoxalatlösung (pH 4.0) solange gespült wird, bis die rotviolette Farbe der Ferri-Dihydroxyoverdine in



Dicarbonsäuren unterscheiden. Bei sorgfältiger Aufarbeitung des Kulturmédiums kann man in der Regel außerdem 5,6-Dihydroxyoverdine und Ferribactine nachweisen, die als biogenetische Vorläufer der Pyoverdine diskutiert werden: Der

* LXIII. Mitt. der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“. Für die LXII. Mitt. s. Hohlneicher (1995).

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

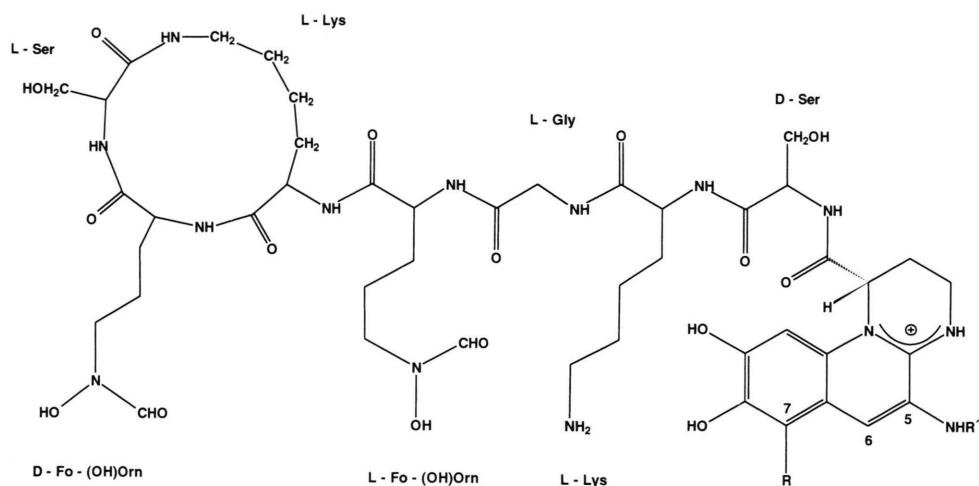
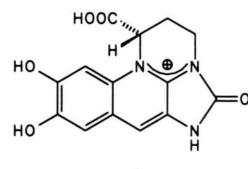
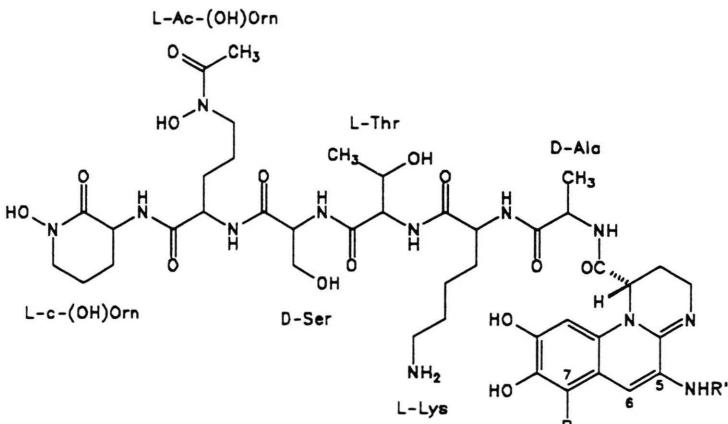


die hellgelbe der Desferri-Verbindungen umgeschlagen ist. Dann läßt man eine 0.05 M Phosphatpufferlösung durchlaufen und eluiert schließlich mit Aceton/Wasser 1:1. Der freie Ligand wird mit Phosphat als Gegenion weitgehend salzfrei eluiert.

Massenspektrometrische und NMR-Untersuchungen s. Budzikiewicz *et al.*, 1992; Hohlnieicher *et al.*, 1995. Die Elektrospray-Analyse (ESI)

einschließlich der exakten Massenmessung erfolgte mit einem Finnigan-MAT (Bremen) 900 Q-Gerät. Vollständige Daten von **4**, **7** und **8** finden sich in Schröder (1990) und Adam (1994).

ESCA-Analyse. Der Nachweis von S in **7** und **8** wurde mit einem XPS-Spektrometer LHS-10 der Fa. Leybold (Köln) durchgeführt. Nichtmonochromatisierte Al-K_α-Strahlung, Bremsfaktor B=3 (entsprechend einer Linienbreite des



Signals von 3,5 eV), Zählraten $\sim 10^3$ cts/s, Druck im Rezipienten $\sim 10^{-8}$ Torr. Die Proben wurden in gelöster Form auf gereinigte und gesputterte Cu-Träger aufgebracht, wodurch sich dünne Schichten bildeten, so daß Aufladungerscheinungen vernachlässigt werden können; ebenso erfolgte keine Korrektur für die Austrittsarbeit. Zur Kontrolle wurden die intensivsten Signale für C, N und O überprüft, die keine Besonderheiten ergaben. Messungen des Untergrundes zeigten im Bereich von 1230 - 1330 eV, in welchem die 2s- und 2p-Ionisierungsenergien von S liegen, keine störenden Signale (vergl. Cardona, 1978).

Aminosäureanalysen (qual., quant., Chiralität) wurden wie beschrieben durchgeführt (Briskot *et al.*, (1986); Mohn *et al.*, (1990).

Ergebnisse

Dihydropyoverdinsulfonsäure (4) aus Pseudomonas aptata

Der Eisenkomplex von **4** zeigt eine breite pH-abhängige charge transfer-Bande (pH; λ_{\max} nm; $\log \varepsilon$ 3.0; 480; 2.82 - 5.0; 516; 3.04 - 6.8; 521; 3.01 - 9.9; 511; 2.90), die für die Farbe des Komplexes verantwortlich ist, sowie die für Dihydropyoverdine typischen Absorptionen bei 230 und 318 nm (Taraz *et al.*, 1991). Freies **4** hat im Bereich von 3.0 - 7.0 ein pH-unabhängiges Absorptionsmaximum bei 310 nm ($\log \varepsilon$ 3.88) mit einer Schulter bei 280 nm. Die Gesamtladung (Offord, 1966) des Eisenkomplexes von **4** bei pH 6.5 beträgt 0 zum Unterschied vom analogen Pyoverdin **3** (+1); **4** muß daher eine zusätzliche negative Ladung tragen. **4** hat dieselbe Aminosäuren-Zusammensetzung wie **3** (Ala, Lys, 2 OH-Orn, Ser, Thr), zusätzlich Glu, während Bernsteinsäure fehlt. Die mit Hilfe der FAB-Massenspektrometrie bestimmte Molmasse von **4** ergibt 1157; **4** ist somit um 112 u schwerer als **3**. Dies entspricht den 2 H in 5,6-Position (2 u), dem Ersatz von Bernsteinsäureamid durch Glu als Seitenkette (30 u) sowie einer Sulfonsäuregruppe (80 u).

Das ^1H -NMR-Spektrum (bei pH 3,0 und 6,8 nur geringfügige Unterschiede) des Chromophors von **4** zeigt gegenüber dem von Dihydropyoverdinen (Taraz *et al.*, 1991; Gwose *et al.*, 1992) folgende Besonderheiten: Das Signal von H-7 fehlt, das von H-5 ist zu höherem Feld verschoben (5,04, m, statt

5,50) und die beiden H an C-6 zeigen eine stark unterschiedliche Verschiebung (3,16, verbreitetes t, und 3,60 ppm, teilweise überlagert; bei Dihydropyoverdinen typischerweise 3,03 und 3,06 ppm). Daraus folgt, daß C-7 einen Substituenten trägt, durch den die beiden H an C-6 deutlich beeinflußt werden. Analoges beobachtet man bei den ^{13}C -Daten: Das Signal von C-6 ist leicht (26,5 statt 29,1 ppm), das von C-7 stark verschoben (126,1 statt 117,6 ppm; dies entspricht dem Inkrement einer SO_3H -Gruppe, Pretsch *et al.*, 1981). Da sich weder im ^1H - noch im ^{13}C -Spektrum zusätzliche Signale finden, kann der Substituent an C-7 kein C und kein nicht austauschbares H enthalten.

Die ^1H - und ^{13}C -Spektren der Peptidketten von **3** und **4** sowie des begleitenden Ferribactins (Chromophor **2**) stimmen überein. Ebenso ergaben der chemische Nachweis der freien NH_2 - (Lys) und OH-Gruppen (Ser, Thr) jeweils dieselben Resultate. Wie zu erwarten, sind die Primärstrukturen der Peptidketten gleich. Ebenso stimmen die ^1H - und insbesondere die ^{13}C -Daten der Glu-Seitenketten für **4** und das Ferribactin überein, so daß auch hier Bindung über die γ -Carboxylgruppe an die NH_2 -Gruppe des Chromophors vorliegt (Budzikiewicz *et al.*, 1992; vergl. auch Geisen *et al.*, 1992).

Dihydropyoverdinsulfonsäuren aus Pseudomonas fluorescens

Die Untersuchung der Siderophore des Stammes *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 kann auf eine längere Geschichte zurückblicken: Erste Ergebnisse hinsichtlich der Ferribactin-Struktur erzielten Maurer *et al.*, (1968). Die Arbeit wurde von Philson und Llinas (1982) fortgesetzt und von Hohlneicher *et al.* (1992) abgeschlossen. Die Strukturmöglichkeit der zugehörigen Pyoverdine **5** begann durch Linget *et al.* (1992) und wurde durch Hohlneicher *et al.* (1995) vollendet; in letzterer Arbeit wird ebenfalls ein bisher bei *Pseudomonas* nicht beobachteter Strukturtyp mit dem Chromophor **6** beschrieben. Aufarbeitung der Nebenfraktionen ergab nun auch die Anwesenheit zweier Sulfonsäurederivate.

Vorausgeschickt sei, daß erwartungsgemäß auch hier die ^1H - und ^{13}C -Untersuchungen einschließlich der 2D-Experimente für alle Siderophore identische Primärstrukturen der Peptidketten ergaben. Zusätzlich zu den bisher

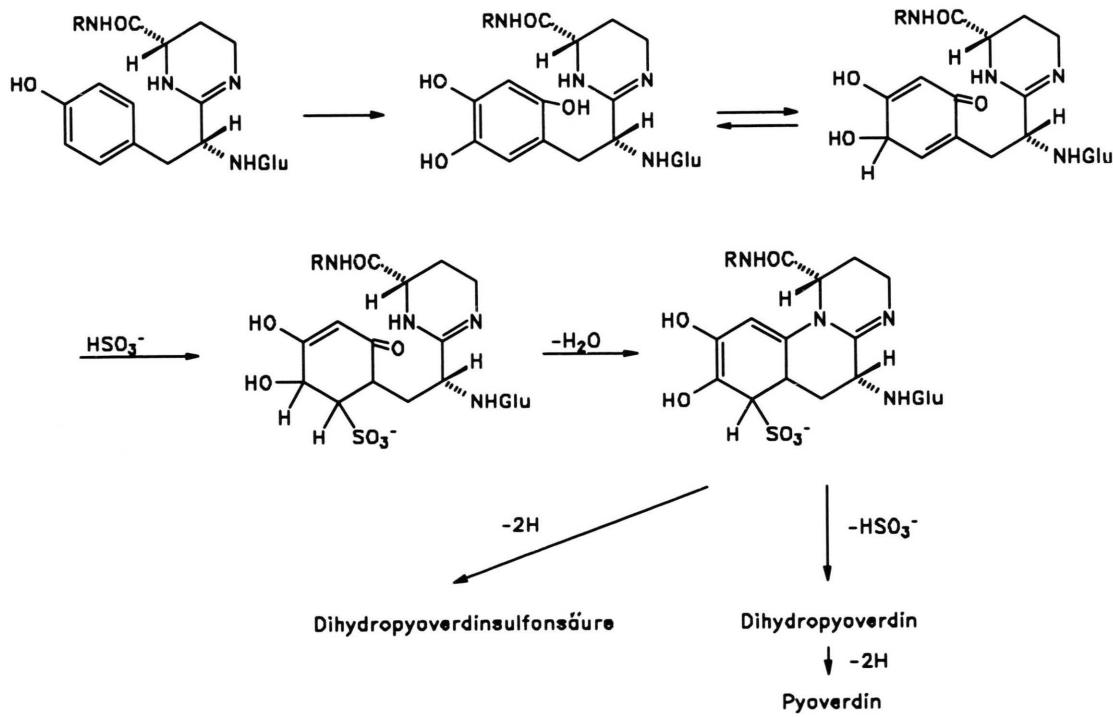
beschriebenen Verbindungen konnten nun zwei weitere isoliert werden, die sich wieder als 5,6-Dihydropyoverdin-7-sulfonsäuren erwiesen, und zwar mit Bernsteinsäureamid- bzw. Glu-Seitenkette, wie sich aus den Molmassen sowie den NMR-Spektren einschließlich H,H-COSY ergibt (für Bernsteinsäureamid (pH 2,6): ^1H 2,76 ppm für beide CH_2 -Gruppen, ^{13}C 31,0 und 31,8, CH_2 ; 177,1, CO; 178,9, COOH; für Glu (pH 5,7): ^1H 3,71, α -H; 2,14/2,25, β -H; 2,56, γ -H, ^{13}C 54,4, α -C; 27,1, β -C; 32,0, γ -C; 174,9, CONH; 182,8, COOH).

Die für den Chromophor von **7** und **8** erhaltenen Daten bestätigen und ergänzen die Ergebnisse für **4**: Die mittels FAB-Massenspektrometrie bestimmten Molmassen 1241 bzw. 1271 u liegen wieder mit 2 (Dihydro-) + 80 (Sulfonsäurerest) über denen der entsprechenden Pyoverdine. Diese Werte werden durch die mittels ESI-Massenspektrometrie für die $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ -Ionen der Eisen(III)-Komplexe erhaltenen Massenwerte 648 bzw. 663 u bestätigt, aus welchen sich auch die 1:1-Stöchiometrie Fe zu Ligand ergibt. Exakte Massenmessung ergab 648,200 bzw. 663,203 (berechnet 648,213 bzw. 663,218

für $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{FeN}_{15}\text{O}_{21}\text{S}$ und $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{FeN}_{15}\text{O}_{22}\text{S}$). Schwefel konnte schließlich mit Hilfe einer ESCA-Messung nachgewiesen werden: Es wurden Signale bei 1250 und 1314 eV für die 2s- bzw. 2p-Ionisierung beobachtet (zum Vergleich: die Werte für Na-Naphthalin-1-sulfonat liegen ebenfalls bei 1250 und 1315 eV). Das UV/Vis-Spektrum der Eisenkomplexe ist pH-abhängig: Bei pH 6,0 tritt eine schwache breite charge-transfer-Bande bei ~ 560 nm auf, die bei pH 3,0 nicht mehr zu erkennen ist. Die Chromophor-Absorption liegt bei 320 (pH 6,0) bzw. bei 275 nm (pH 3,0), das pH-unabhängige Absorptionsmaximum der freien Liganden bei 310 nm.

Die NMR-Chromophordaten entsprechen denen von **4**: Im ^1H -Spektrum fehlt das Signal für H-7, das für H-5 erscheint als dd bei 5,06 ppm und die für die beiden H-6 als Multipletts bei 3,22 und 3,62 ppm. Das ^{13}C -Signal von C-6 liegt bei 26,5, das von C-7 bei 126,6 ppm.

Dihydropyoverdinsulfonsäuren sind als freie Liganden nur in schwach saurer Lösung relativ stabil. Bei pH ~ 7 zersetzen sie sich langsam, im alkalischen Bereich rasch.



Schema 1. Möglicher Mechanismus der Bildung von Pyoverdinen aus Ferribactinen (R = Peptidkette).

Diskussion

Aliphatische Sulfonsäuren kommen in der Natur zwar in geringen Mengen, aber doch weit verbreitet vor. Am bekanntesten ist Cysteinsäure (3-Sulfoalanin), von der sich weitere Verbindungen wie Sulfoessigsäure bis hin zu Zuckern wie Sulfochinovose ableiten (z. B. Gupta and Sastry, 1988); hinzu kommen Sulfolipide (für in Mikroorganismen vorkommende Verbindungen s. Paramasigamani, 1984 und Haines, 1984). Den Autoren dieser Arbeit ist aber nur eine einzige in der Literatur beschriebene natürlich vorkommende *aromatische* Sulfonsäure bekannt, nämlich das aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* isolierte 2-Amino-6-carboxy-10-methyl-8-sulfo-phenazinium-betain (Aeruginosin B) (Herbert *et al.*, 1969).

Für die Biogenese des Pyoverdin-Chromophors wird diskutiert (Budzikiewicz, 1994), daß der Ferribactin-Chromophor **2** zum Trihydroxyderivat

oxidiert wird, über dessen Ketoform die Zyklisierung zum Dihydropyoverdin erfolgt. Eine durch Addition eines HSO_3^- -Ions entstandene Sulfonsäure könnte nach dem Mechanismus der Bucherer-Reaktion diese Zyklisierung erleichtern und als Nebenreaktion zu den Sulfonsäurederivaten führen. Für die Umwandlung der Dihydropyoverdine in Pyoverdine haben Teintze and Leong (1981) einen basenkatalysierten Oxidationsmechanismus formuliert. Eine mögliche Reaktionssequenz ist in Schema 1 zusammengestellt.

Danksagung

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie sowie vom Verein der Freunde und Förderer der Universität zu Köln unterstützt. Besonders danken möchten wir Herrn Dr. H. Gonska, Institut für Physikalische Chemie, für die ESCA-Messungen sowie Herrn Dr. H. Münster, Finnigan-MAT, Bremen, für der ESI-Messungen.

- Adam J. (1994), Isolierung und Untersuchungen zur Struktur von Siderophoren des Pyoverdintyps aus *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Diplomarbeit Univ. zu Köln.
- Briskot G., Taraz K. und Budzikiewicz, H. (1986), Siderophore vom Pyoverdin-Typ aus *Pseudomonas aeruginosa*. Z. Naturforsch. **41c**, 497-506.
- Budzikiewicz H. (1994), The biosynthesis of pyoverdins. Pure Appl. Chem. **66**, 2207-2210.
- Budzikiewicz H., Schröder H. und Taraz, K. (1992), Zur Biogenese der *Pseudomonas*-Siderophore: Der Nachweis analoger Strukturen eines Pyoverdin-Desferriferribactin-Paares. Z. Naturforsch. **47c**, 26-32.
- Cardona M. (1978), Photoemission in Solids, Springer, Berlin.
- Geisen K., Taraz K. und Budzikiewicz H. (1992), Neue Siderophore des Pyoverdin-Typs aus *Pseudomonas fluorescens*. Monatsh. Chem. **123**, 151-178.
- Gupta S. D. and Sastry P. S. (1988), The Biosynthesis of Sulfoquinovosyldiacylglycerol: Studies with groundnut (*Arachis hypogaea*) Leaves. Arch. Biochem. Biophys. **260**, 125-133.
- Gwose I. und Taraz K. (1992), Pyoverdine aus *Pseudomonas putida*. Z. Naturforsch. **47c**, 487-502.
- Haines Th. H. (1984), Microbial Sulfolipids in CRC Handbook of Microbiology (Hersg. A. I. Laskin und H. A. Lechevalier), CRC Press, Boca Raton, 2. Aufl., Bd. 5, S. 115-123.
- Herbert R. B. and Holliman F. G. (1969), Pigments of *Pseudomonas* species. Part II. Structure of aeruginosin B. J. Chem. Soc. (C) 2517-2520.
- Hohlneicher U., Hartmann R., Taraz, K. and Budzikiewicz, H. (1995), Pyoverdin, Ferribactin, Azotobactin - a New Triade of Siderophores from *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 and Its Relation to *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Z. Naturforsch. **50c**, 000-000.
- Linget C., Azadi P., MacLeod J. K., Dell A. and Abdallah M. A. (1992), Bacterial siderophores: The structure of the pyoverdins of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Tetrahedron Lett. **33**, 1737-1740.
- Maurer B., Müller A., Keller-Schierlein W. und Zähner H. (1968), Ferribactin, ein Siderophor aus *Pseudomonas fluorescens* Migula. Arch. Microbiol. **60**, 326-339.
- Mohn G., Taraz K. and Budzikiewicz H. (1990), New Pyoverdin-Type Siderophores from *Pseudomonas fluorescens*. Z. Naturforsch. **45b**, 1437-1450.
- Offord, R. E. (1966), Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of the amide groups. Nature **211**, 591-593.
- Paramasigamani K. (1984), [Microbial] Simple Sulfur Compounds in CRC Handbook of Microbiology (Hersg. A. I. Laskin und H. A. Lechevalier), CRC Press, Boca Raton, 2. Aufl., Bd. 5, S. 111- 113.

- Philson S. B. and Llinas M. (1982), Siderophores from *Pseudomonas fluorescens*. I. Isolation and Characterisation, II. Structural Homology as Revealed by NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **257**, 8081-8085 und 8086-8090.
- Pretsch E., Clerc T., Seibl J. und Simon W. (1981), Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Übungen. Springer, Berlin.
- Schröder H. (1990), Untersuchung der Siderophore aus *Pseudomonas aptata* 4B. Diplomarbeit Univ. zu Köln.
- Taraz K., Seinsche D. und Budzikiewicz H. (1991), Pseudobactin- und Pseudobactin A-Varianten: Neue Peptidsiderophore vom Pyoverdin-Typ aus *Pseudomonas fluorescens* „E2“. *Z. Naturforsch.* **46c**, 522-526.
- Teintze M. and Leong J. (1981), Structure of pseudobactin A, a second siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. *Biochem.* **20**, 6457-6462.