



Doctoral Thesis

**Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen
Isolierung und Strukturaufklärung der Pyridindolol-Glucoside
aus *Streptomyces parvulus* und des neuartigen Siderophors
Maduraferrin aus *Actinomadura madurae***

Author(s):

Hagmann, Leonhard

Publication Date:

1987

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000471625> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8460

**STOFFWECHSELPRODUKTE AUS MIKROORGANISMEN:
ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG DER
PYRIDINDOLOL-GLUCOSIDE AUS *STREPTOMYCES PARVULUS*
UND DES NEUARTIGEN SIDEROPHORS
MADURAFERRIN AUS *ACTINOMADURA MADURAE***

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
LEONHARD HAGMANN
Dipl. Chem. ETH
geboren am 20. März 1958
von Sevelen (SG)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. W. Keller-Schierlein, Referent
Prof. Dr. W. Schneider, Korreferent



ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1987

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der chemischen und spektroskopischen Strukturaufklärung von Stoffwechselprodukten verschiedener Mikroorganismen.

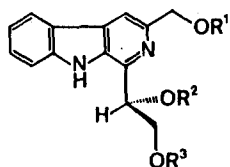
Pyridindolol-Glucoside

Aus den Rohextrakten der Kulturen des Stammes Tü 2480 (Streptomyces parvulus) konnten durch Extraktion und chromatographische Reinigung E-3-(Pyrrol-3'-yl)-propensäure und E-3-(Pyrrol-3'-yl)-propensäureamid erhalten werden, deren Strukturen durch Spektroskopie und Synthese bewiesen wurden. Das Hauptaugenmerk richtete sich aber auf vier im langwelligen UV-Licht stark blau fluoreszierende F-Komponenten, deren Isolierung und Trennung durch mehrmalige chromatographische Reinigungsoperationen an Kieselgel mit ammoniakalischen Laufmitteln erreicht wurde. Die apolarste dieser Verbindungen (F₁) erwies sich als identisch mit dem aus Streptomyces alboverticillatus isolierten Pyridindolol und stimmte in allen Eigenschaften mit diesem überein. Die drei stark polareren Komponenten F₂, F₃, F₄ konnten mit Hilfe von UV-, IR-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert und als Glycoside des Pyridindolols erkannt werden. Von allen drei Verbindungen konnten nach Methanolyse und Derivatisierung identische und mit Pyridindolol übereinstimmende Aglycone sowie identische und mit einem synthetischen (D)-Glucose-Derivat übereinstimmende Zuckerderivate gewonnen werden. Die Zuckerpositionen konnten anhand eingehender protonen-kernresonanzspektroskopischer Untersuchungen der Acetylderivate aller F-Komponenten eindeutig festgelegt werden, womit ihre gesamte Struktur aufgeklärt war.

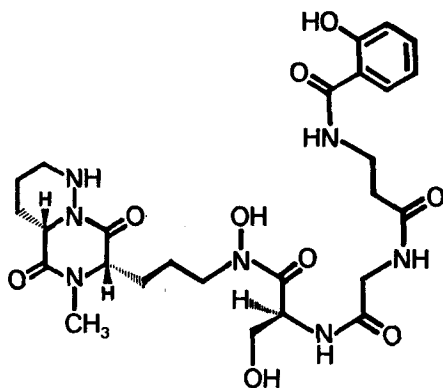
Maduraferrin

Unter Eisenmangelbedingungen produziert Actinomadura madurae (DSM 43067) einen neuartigen Siderophor, der nach Zugabe von Eisenchlorid zur Kulturbrühe als Eisenkomplex isoliert wurde. Nach zahlreichen chromatographischen Reinigungen an verschiedenen Medien wurde Maduraferrin als orangebraunrote, feine Kristalle erhalten. Elementaranalyse und FAB-Massenspektroskopie führten zur Summenformel $C_{26}H_{37}N_7O_9Fe$ ($M = 644$). Mit 8-Hydroxychinolin konnte die eisenfreie Verbindung gewonnen werden. Desferri-Maduraferrin wurde mit UV-, IR-, 1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und FAB-Massenspektroskopie sowie elementaranalytisch charakterisiert. Die IR- und 1H -NMR-Spektren von Acetyl-Desferri-Maduraferrin bewiesen das Vorkommen von einer Hydroxamsäure. Nach der Totalhydrolyse von Desferri-Maduraferrin konnten Salicylsäure, β -Alanin, Glycin und Serin nachgewiesen werden; im katalytisch reduzierten Totalhydrolysat zusätzlich Ornithin und Claudiamin (N^α -Methylornithin). Mit Ausnahme des Ornithins wurden alle Aminosäuren als 2,4-Dinitrophenylderivate gefasst, charakterisiert und mit authentischen Präparaten verglichen. Die Position der N-Methylgruppe von Claudiamin wurde durch ein Nuclear-Overhauser-Effekt-Experiment abgeklärt und durch Synthese der beiden Isomere bewiesen. Bei der Partialhydrolyse von Desferri-Maduraferrin wurden Bruchstücke erhalten, die, charakterisiert als Methylester mittels Massenspektroskopie und durch Totalhydrolyse, eine lückenlose Sequenzanalyse erlaubten. Einschlägige Überlegungen führten zum Schluss, dass Ornithin und Claudiamin einen Bicyclus bilden. Seine Verknüpfungsart wurde mit Hilfe des Desferri-Maduraferrin-Permethylierungsproduktes aufgeklärt, nämlich durch hydrolytische Spaltung, Derivatisierung und anschließende Isolierung des nun am N^δ methylierten Ornithins mittels semipräparativer HPLC und durch dessen Vergleich mit dem synthetischen Präparat. Damit waren Konstitution und Konfiguration von Maduraferrin endgültig aufgeklärt. Die Komplexierungsstellen für das Eisen-(III)-ion sind die Hydroxamsäure, Salicylsäure und das Säurehydrazid (Aza-Analogon einer Hydroxamsäure). Letzteres aber auch β -Alanin und N^δ -Hydroxy-claudiamin sind bisher einmalig in der Chemie natürlicher Siderophore.

THE PYRIDINDOLOL GLUCOSIDES



	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>
Tü 2480 F ₁	H	H	H
Tü 2480 F ₂	H		H
Tü 2480 F ₃	H	H	
Tü 2480 F ₄		H	H



THE DEFERRI-MADURAFERRIN

E . S U M M A R Y

The present work deals with the chemical and spectroscopic structure elucidation of secondary metabolites from different microorganisms.

Pyridindolol glucosides

From the crude culture extract of the strain Tü 2480 (Streptomyces parvulus), E-3-(pyrrole-3'-yl)-propenic acid and E-3-(pyrrole-3'-yl)-propenic amide were obtained by extraction and chromatographic purification. Their structures were established by spectroscopy and synthesis. But special attention demanded the four F-components which show a strong blue fluorescence in the longwave UV. Their isolation and separation was achieved by multiple chromatographic purifications on silica gel with ammoniacal solvents. The most apolar substance among this compounds (F_1) was proved to be identical in all respects with pyridindolol, also isolated from Streptomyces alboverticillatus. The three much more polar components F_2 , F_3 , F_4 were characterized and recognized as glycosides of pyridindolol by means of UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - and mass spectroscopy. All three compounds gave identical aglycons after methanolysis and derivatization and were in accordance with pyridindolol. This degradations also afforded all the same sugar derivatives, identical with a synthetic (D)-glucose derivative. The sugar positions at the pyridindolol skeleton were determined unequivocally on the basis of the proton nuclear magnetic resonance spectroscopic investigations of the acetyl derivatives of all F-components. Therefore the complete structure of all pyridindolol glucosides were now definitely elucidated.

Maduraferrin

A novel siderophore was produced by Actinomadura madurae (DSM 43067) under iron deficiency conditions and could be isolated from the culture broth after addition of ferric chloride. After numerous chromatographic purifications on different media, maduraferrin could be obtained as orange-brown-reddish fine crystals. Elementary micro-analysis and FAB mass spectroscopy led to the formula $C_{26}H_{37}N_7O_9Fe$ ($M = 644$). Treatment with 8-hydroxy-quinoline yielded the iron free compound of it. Deferri-maduraferrin was characterized by UV, IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR and FAB mass spectroscopy just as elementary analysis. The IR and 1H -NMR spectra of acetyl-deferri-maduraferrin demonstrated the occurrence of one hydroxamic acid group. Salicylic acid, β -alanine, glycine and serine could be established after total hydrolysis of deferri-maduraferrin. In addition to that, ornithine and claudiamine (N^α -methylornithine) were found in the catalytic reduced hydrolysate. With the exception of ornithine all amino acids could be collected as 2,4-dinitrophenyl derivatives, which were characterized and compared with authentic samples. The localization of the N-methyl group of claudiamine was clarified by a nuclear Overhauser experiment and then proved by synthesis of both the isomers. The partial hydrolysis of deferri-maduraferrin afforded fragments which were characterized as methylesters by mass spectroscopy and total hydrolysis. This information allowed an uninterrupted sequence analysis. Relevant considerations (ring parameters) assigned the conclusion that ornithine and claudiamine must form a bicyclus. His manner of connection was argued with the deferri-maduraferrin permethylation product, namely by hydrolytic cleavage, derivatization and the following isolation of the now N^δ -methylated ornithine with the aid of semipreparative HPLC and by comparison with a prepared synthetic sample. So the constitution and configuration of maduraferrin was definitively elucidated. The complexing positions around the ferric ion are the hydroxamic acid, salicylic acid and the acid hydrazide which can be regarded as an aza analogon of a hydroxamic acid. The latter but also β -alanine and N^δ -hydroxy-claudiamine are unique so far in the chemistry of natural siderophores.