3-Hydroxymethylpyridin, ein neues Stoffwechselprodukt der Mycobakterien*

D. GROSS, A. FEIGE, A. ZURECK und H.-R. SCHÜTTE

Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale) und Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena, der Deutschen Akademie der Wissenschaften

(Z. Naturforschg. **22 b**, 835—838 [1967]; eingegangen am 1. Februar 1967)

Aus dem Kulturfiltrat von *Mycobacterium bovis* Stamm BCG wird neben Nicotinsäure eine weitere Bromcyan-positive Substanz isoliert und als 3-Hydroxymethylpyridin identifiziert. Dieses Pyridin-Derivat läßt sich auch als Ausscheidungsprodukt anderer Mycobakterien-Arten nachweisen. 3-Hydroxymethylpyridin ist eng mit dem Stoffwechsel der Nicotinsäure verbunden. Angebotene Nicotinsäure wird von den BCG-Bakterien aufgenommen und zu 3-Hydroxymethylpyridin umgewandelt.

Nach Untersuchungen von MOTHES wird von *Mycobacterium bovis* Stamm BCG neben Nicotinsäure eine weitere Bromcyan-positive Substanz gebildet und in das Nährmedium ausgeschieden¹, deren Struktur und Bildung wir näher untersucht haben. Zur Isolierung der in ihrer Struktur bisher unbekannten Pyridinverbindung haben wir größere Mengen Kulturfiltrat eingeengt und bei p_H 9,5 bis 10,0 ausgeäthert. Nach Abdestillieren des Äthers blieb eine gelbbraune Flüssigkeit zurück, die wir einer Gegenstromverteilung unterworfen haben. Als besseres Reinigungsverfahren erwies sich die Hochspannungs-Elektrophorese, weil sich die Nicotinsäure und die zu isolierende Pyridinverbindung durch unterschiedliches Wanderungsvermögen einwandfrei voneinander trennen ließen. Die Bromcyan-positiven Fraktionen wurden bei p_H 9,5—10,0 ausgeäthert. Zur weiteren Reinigung haben wir den Ätherextrakt auf Kieselgel-H-Platten dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit Äther. Die nach Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Flüssigkeit wies im IR-Spektrum zwei starke Banden bei 1030 cm^{-1} (C—OH) und bei 1600 cm^{-1} (Pyridinring) sowie eine breite Bande bei $3050\text{ bis }3600\text{ cm}^{-1}$ (—OH) auf. An Hand der DMS-Kartei (Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße) konnte das Spektrum 3-Hydroxymethylpyridin zuge-

ordnet werden. Die IR- und UV-Spektren authentischer Testsubstanz und isolierter Pyridinverbindung waren identisch**.

Zur weiteren Charakterisierung wurden chromatographische Verfahren herangezogen. Das isolierte Produkt und 3-Hydroxymethylpyridin verhielten sich bei aufsteigender Papierchromatographie, zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und analytischer Gaschromatographie völlig gleich.

Pikrat, Schmp. $160-161^\circ$, und Hydrochlorid, Schmp. $116-119^\circ$, stimmten im Schmelzpunkt mit den in der Literatur angegebenen Werten²⁻⁷ überein. Die Mischschmelzpunkte ergaben keine Depression. Nach diesen chemisch-physikalischen Daten handelt es sich bei der aus Kulturfiltraten und Bakterienmaterial von *M. bovis* Stamm BCG isolierten Substanz um 3-Hydroxymethylpyridin, ein als Naturstoff bisher unbekanntes Pyridin-Derivat.

(1)

Weitere Untersuchungen ergaben, daß 3-Hydroxymethylpyridin auch von anderen Arten der Gattung *Mycobacterium* wie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. avium* und

* Die physiologischen Teile dieser Arbeit sind der Dissertation A. ZURECK, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald 1966, entnommen.

¹ E. MOTHES, Z. allg. Mikrobiol., Morphol., Physiol., Ökol. Mikroorganismen **4**, 42 [1964].

** Herrn Dr. A. KOLBE, Institut für anorganische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danken wir für die Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren.

² E. DEHNEL, Chem. Ber. **33**, 3498 [1900].

³ O. JEGER, J. NORYMBERSKI, S. SZPILFOGEL u. V. PRELOG, Helv. chim. Acta **29**, 684 [1946].

⁴ A. COHEN, J. W. HAWORTH u. E. G. HUGHES, J. chem. Soc. [London] **1952**, 4374.

⁵ K. W. ROSENEMUND u. F. ZYMALKOWSKI, Chem. Ber. **85**, 152 [1952].

⁶ F. BOHLMANN u. M. BOHLMANN, Chem. Ber. **86**, 1419 [1953].

⁷ H. S. MOSHER u. J. E. TESSIERI, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4925 [1951].

von unklassifizierten Arten gebildet wird. 3-Hydroxymethylpyridin tritt ebenso wie Nicotinsäure bei den einzelnen Arten in unterschiedlicher Menge auf. Diese Tatsache dürfte für eine biochemische Typendifferenzierung von großem Interesse sein. Entsprechende Arbeiten sind im Gange und werden an anderer Stelle veröffentlicht.

Das Auffinden von 3-Hydroxymethylpyridin als weitere Pyridinverbindung im Kulturfiltrat zeigt, daß die Farbreaktion beim Niacin-Test nach KONNO^{9,10} nicht nur durch Nicotinsäure hervorgerufen wird. Nach ersten Versuchen mit *M. tuberculosis* Stamm H 37 Rv scheint die Gelbfärbung bei der König-Reaktion zum großen Teil durch 3-Hydroxymethylpyridin verursacht zu werden. Aus diesem Grund ist eine quantitative Nicotinsäurebestimmung mit der Bromcyan-Methode im Kulturfiltrat ohne chromatographische Auftrennung nicht möglich.

Nach Versuchen zur Biosynthese der Nicotinsäure entsteht diese bei *M. bovis* Stamm BCG^{1,11-14} und bei *M. tuberculosis*¹⁵⁻¹⁸ aus Asparaginsäure und einem C₃-Körper (Glycerinalalge) [vgl. Schema 1].

Schema 1. Biosynthese von Nicotinsäure und 3-Hydroxymethylpyridin.

In unseren früheren Versuchen ist den BCG-Bakterien ¹⁴C-markierte Asparaginsäure oder Glycerin-[¹⁴C] angeboten und das Kulturfiltrat nach 10-tägigem Wachstum zur Isolierung der Nicotinsäure papierchromatographisch aufgetrennt worden. Die Radioaktivität fand sich auf den Papierchromatogrammen in der Nicotinsäurezone und in der Bande, die nach vorliegenden Untersuchungen 3-Hydroxymethylpyridin zuzuschreiben ist. Der Einbau von ¹⁴C-Aktivität in Nicotinsäure und 3-Hydroxymethylpyridin ließ eine biogenetische Verwandtschaft bei der Pyridin-Derivate vermuten. Dieser Zusammen-

hang ergab sich auch aus quantitativen Untersuchungen zur Bildung von Nicotinsäure und 3-Hydroxymethylpyridin bei BCG-Kulturen. BCG-Unterstämmen, die viel Nicotinsäure bilden, produzieren in der Regel auch größere Mengen 3-Hydroxymethylpyridin. Ebenso geht auch die 3-Hydroxymethylpyridin-Bildung der Nicotinsäure-Produktion parallel (vgl. Tab. 1).

Kultur-tage	Nicotinsäure		3-Hydroxymethylpyridin	
	µg/Kultur*	µg/20 mg Bakt.**	µg/Kultur*	µg/20 mg Bakt.**
3	145,8	9,8	10,0	0,7
5	399,5	19,9	23,7	1,2
7	802,0	35,3	84,5	3,5
10	1145,9	53,0	155,7	7,4
12	1023,1	53,8	282,1	14,8

Tab. 1. Nicotinsäure- und 3-Hydroxymethylpyridin-Bildung (Unterstamm Jena, Sauton-Nährlösung). * 20 ml Kulturfiltrat + Bakterienmasse. ** Trockengewicht.

In weiteren Versuchen haben wir die Unterstämmen Marburg und Paris 888 auf einer Nicotinsäure-haltigen Sauton-Nährlösung kultiviert und die Nicotinsäureaufnahme nach 10-tägiger Kultur bestimmt (vgl. Tab. 2).

BCG-Unterstamm	Nicotinsäure	
	µg/20 ml Nähr-lösung zugesetzt	µg/20 ml Kulturfiltrat + Bakt. Material nach 10 Tagen
Paris 888	0	228
	800	555
	2000	1148
Marburg (Behring-Werke) A.G.)	0	1171
	800	1255
	2000	2012

Tab. 2. Nicotinsäurebilanz in 10-tägiger Kultur (Sauton-Nährlösung) bei Nicotinsäurezusatz. Bakt. = Bakterien.

Es zeigte sich besonders bei dem schwachen Nicotinsäurebildner Paris eine der zugesetzten Nicotinsäuremenge proportionale Ausscheidung von 3-Hydroxymethylpyridin bei gleichzeitiger Abnahme des Nicotinsäuregehaltes. Diese Versuche deuten eine

⁹ K. KONNO, Science [Washington] **124**, 985 [1956].

¹⁰ K. KONNO, Beitr. Klin. Tuberkul. **119**, 1 [1958].

¹¹ E. MOTHES, D. GROSS, H. R. SCHÜTTE u. K. MOTHES, Naturwissenschaften **48**, 623 [1961].

¹² D. GROSS, H. R. SCHÜTTE, G. HÜBNER u. K. MOTHES, Tetrahedron Letters [London] **1963**, 541.

¹³ D. GROSS, A. FEIGE, R. STECHER, A. ZURECK u. H. R. SCHÜTTE, Z. Naturforsch. **20b**, 1116 [1965].

¹⁴ D. GROSS, Abh. dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol., Biol., Jg. 1966, Nr. 3, S. 151, Akademie-Verlag, Berlin.

¹⁵ A. NELLES u. H. HERSCHMANN, Tuberkulosearzt **14**, 813 [1960].

¹⁶ C. RIO ESTRADA u. H. PATINO, J. Bacteriol. **84**, 871 [1962].

¹⁷ A. G. MOAT u. J. N. ALBERTSON, Federat. Proc. **23**, 528 [1964].

¹⁸ J. N. ALBERTSON u. A. G. MOAT, J. Bacteriol. **89**, 540 [1965].

Umwandlung Nicotinsäure → 3-Hydroxymethylpyridin an.

Zur Überprüfung dieser Frage haben wir mit einer modifizierten Sauton-Nährlösung gearbeitet, in der Asparagin durch sekundäres Ammoniumphosphat ersetzt wurde. Unter diesen Kulturbedingungen werden weder Nicotinsäure¹ noch 3-Hydroxymethylpyridin ausgeschieden; es fehlt Asparagin als Precursor des Pyridinringes. Setzt man dieser Asparagin-freien Nährlösung aber Nicotinsäure zu, so ist bei Nicotinsäureaufnahme eine Ausscheidung von 3-Hydroxymethylpyridin festzustellen (vgl. Tab. 3). Dabei zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der 3-Hydroxymethylpyridin-Bildung von der vorgelegten Nicotinsäure-Konzentration.

BCG-Unterstamm	Nicotinsäure		3-Hydroxymethylpyridin
	µg/20 ml NL zugesetzt	µg/20 ml KF + Bakt. nach 10 Tagen	µg/20 ml KF + Bakt. nach 10 Tagen
Montreal	0	0	0
	500	63,4	147,2
	1000	187,3	431,2
	2000	545,2	938,0
Tokio	0	0	0
	500	208,0	125,6
	1000	452,8	378,0
	2000	734,4	883,1

Tab. 3. Nicotinsäureumsatz und 3-Hydroxymethylpyridin-Bildung in 10-tägiger Kultur (modifizierte Sauton-Nährlösung). NL = Nährlösung, KF = Kulturfiltrat, Bakt. = Bakterien.

Verfolgt man die Ausscheidung von 3-Hydroxymethylpyridin in Abhängigkeit von der Zeit, so zeigt sich, daß der Nicotinsäuregehalt der Kulturlösung ständig abnimmt und die Konzentration an 3-Hydroxymethylpyridin ansteigt. Diese Versuche lassen den Schluß zu, daß 3-Hydroxymethylpyridin von den BCG-Bakterien nur dann gebildet wird, wenn Nicotinsäure zur Verfügung steht. Diese Annahme haben wir in orientierenden Versuchen mit ¹⁴C-markierter Nicotinsäure überprüft. Den Unterstämmen Göteborg und Montreal wurden Nicotinsäure-[¹⁴COOH] und Nicotinsäure-[4.6-¹⁴C] in normaler und in Asparagin-freier Sauton-Nährlösung angeboten. Nach 10-tägigem Wachstum konnte radioaktives 3-Hydroxymethylpyridin isoliert werden. Offenbar kann die Carboxylgruppe der Nicotinsäure

von den BCG-Bakterien zur Hydroxymethylgruppe reduziert werden, wie in Schema 1 dargestellt ist. Eingehende Biosyntheseversuche zum Beweis einer spezifischen Inkorporation sind in Arbeit.

Die physiologische Bedeutung von Nicotinsäure und 3-Hydroxymethylpyridin im Stoffwechsel der Mycobakterien ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. H. KNÖLL danken wir für großzügige Unterstützung und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. K. MOTHES für anregende Diskussionen.

Material und Methodik

1. Anzucht der BCG-Stämme

Als Versuchsobjekt diente *Mycobacterium bovis* Stamm BCG. Stammhaltung und Kultur erfolgten nach den im BCG-Institut, Jena, üblichen Methoden^{19, 20}. Die für die Vor- und Hauptkultur verwendete Sauton-Nährlösung⁸ besaß folgende Zusammensetzung:

	[g]
L-Asparagin	4,0
Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O	0,5
Ferriammoniumcitrat	0,05
Dikaliumhydrogenphosphat	0,5
Citronensäure	2,0 mg
Glycerin	60 ml
Zinkchlorid	1,0 mg
Aqua dest. ad	1000 ml

Der pH-Wert der Nährlösung betrug 7,0. Als Kulturgefäße benutzten wir 100-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 20 ml Sauton-Nährlösung. Die modifizierte Sauton-Nährlösung enthielt an Stelle von Asparagin 4,0 g sekundäres Ammoniumphosphat pro Liter.

Die verwendeten Kulturen der BCG-Unterstämmen und der saprophytischen Mycobakterien-Arten stammten aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena. Die pathogenen Stämme wurden im Hygiene-Institut der Friedrich-Schiller-Universität (Frau Dr. GRUHN), Jena, kultiviert.

2. Nachweis und quantitative Bestimmung von Nicotinsäure und 3-Hydroxymethylpyridin

Das nach dem Ernten der Bakterien anfallende Kulturfiltrat wurde im Rotationsverdampfer bei 70 °C Badtemperatur und 15 mm Vakuum eingengt und aufsteigend papierchromatographisch aufgetrennt (Schleicher & Schüll-Papier 2043 b, Laufmittel: wassergesättigtes n-Butanol). Zum Sichtbarmachen der Pyridinverbindungen haben wir 0,5 cm breite Längsstreifen der Papierchromatogramme 20 Min. einer Bromcyanatmosphäre ausgesetzt, anschließend mit einer 0,25-proz. alkoholi-

⁸ B. SAUTON, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **155**, 860 [1912].

¹⁹ H. KNÖLL, Z. Tuberkulose **101**, 485 [1952].

²⁰ A. ZURECK, Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald 1966.

schen Benzidinlösung besprüht und nach dem Trocknen erneut mit Bromcyan behandelt. Nicotinsäure erschien als roter Fleck, $R_f = 0,3$, 3-Hydroxymethylpyridin als rotvioletter Fleck, $R_f = 0,73-0,76$. Nach Elution mit Wasser erfolgte Rechromatographie. Der Gehalt an 3-Hydroxymethylpyridin im wäßrigen Eluat wurde kolorimetrisch nach Farbreaktion mit Bromcyan bei 436 nm im Specol (Fa. Carl Zeiss, Jena) oder spektrophotometrisch bei 260 nm (Spektralphotometer VSU I, Fa. Carl Zeiss, Jena) ermittelt. Die den gemessenen Extinktionswerten zugehörigen Konzentrationen haben wir entsprechenden Eichkurven entnommen.

Zur Bestimmung der in den Bakterien verbliebenen Pyridinverbindungen (freie Nicotinsäure und 3-Hydroxymethylpyridin) wurde das von der Kulturlösung abgetrennte und zweimal mit dest. Wasser gewaschene Bakterienmaterial zerrieben und 16 Stdn. bei Raumtemperatur mit Aceton stehengelassen. Die weitere Aufarbeitung dieses Acetonextraktes erfolgte wie die des Kulturfiltrates.

3. Isolierung von 3-Hydroxymethylpyridin

Größere Mengen Kulturfiltrat wurden mit Natronlauge auf pH 9,5–10,0 eingestellt und erschöpfend ausgeäthert. Nach Abdestillieren des Äthers wurde eine gelbbraune Flüssigkeit erhalten, von der wir einen Teil mit einer Gegenstromverteilungs-Apparatur (40 Einheiten) untersucht haben. Als Unterphase diente 0,1-n. Natriumcitrat-Salzsäure-Puffer pH 4, als Oberphase Äther. Nach der Verteilung enthielten die Einheiten Nr. 1–7 angereichert 3-Hydroxymethylpyridin, das noch mit geringen Mengen Nicotinsäure verunreinigt war.

Eine einwandfreie Reinigung gelang durch Auftrennung an einer Hochspannungs-Elektrophorese (Elphor VaP, Fa. Bender & Hobein, München) mit Benzer Trennkarton 230 bei einer Durchlaufzeit von 1,5–2 Stdn. (Spannung 0,7 kV, Stromstärke 220 mA). Als Puffer diente 0,05-n. Natriumacetat, pH 5,0. Das zur Kathode wandernde 3-Hydroxymethylpyridin ließ sich

in 9 von 40 aufgefangenen Fraktionen nachweisen und wurde bei pH 9,5–10,0 mit Äther extrahiert. Der mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknete Ätherextrakt wurde eingengt und auf Kieselgel H-Platten chromatographiert (Laufmittel: n-Propanol–Ammoniak, 10-proz., 95 : 5). Die Elution erfolgte mit Äther.

4. Identifizierung

a) Das mit dem Zweistrahl-Spektralphotometer UR 10 (Fa. Carl Zeiss, Jena) aufgenommene IR-Spektrum zeigte starke Banden bei 1030 cm^{-1} und bei 1600 cm^{-1} sowie eine breite Bande bei $3050-3600\text{ cm}^{-1}$. Im UV-Bereich (Spektralphotometer VSU I, Fa. Carl Zeiss, Jena) lag das Maximum bei 260 nm.

b) Folgende chromatographische Verfahren dienten zur Identifizierung:

Aufsteigende Papierchromatographie (Schleicher & Schüll-Papier 2043 b) mit wassergesättigtem n-Butanol als Laufmittel, $R_f = 0,73-0,76$; zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G-Platten (Schichtdicke $25\text{ }\mu$). 1. Laufmittel: n-Propanol–Ammoniak (10-proz.) 95 : 5, $R_f = 0,5$. 2. Laufmittel: Benzol–Methanol 4 : 1, $R_f = 0,3$; Gaschromatographie (Panchromatograph, Fa. Pye & Co., Cambridge) bei 135°C . Säule: 2,1 m, 4 mm ϕ , 3% SE 30 auf silanisiertem Celit, 85–100 mesh.

c) Das aus methanolischer Lösung gefällte Pikrat zeigte nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasser einen Schmelzpunkt von $160-161^\circ\text{C}$. Aus ätherischer Lösung wurde durch Einleiten von HCl das Hydrochlorid gefällt und mit Äther gewaschen, Schmp. 116 bis 119°C .

5. ^{14}C -markierte Verbindungen

Die Darstellung von Nicotinsäure- $^{14}\text{COOH}$ ²¹ und Nicotinsäure- ^{14}C ²² erfolgte nach bekannten Methoden. Die Messung der Radioaktivität haben wir unter dem Methandurchflußzähler (FH 49, Fa. Fricke & Hoepfner, Erlangen-Bruck) vorgenommen.

²¹ A. MURRAY, W. W. FOREMAN u. W. LANGHAM, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1037 [1948].

²² D. GROSS, A. FEIGE u. H. R. SCHÜTTE, Z. Chem. **5**, 21 [1965].