

Die Kristallstruktur des Ectoin, einer neuen osmoregulatorisch wirksamen Aminosäure

The Crystal Structure of Ectoine, a Novel Amino Acid of Potential Osmoregulatory Function

Willi Schuh und Heinrich Puff

Anorganisch-Chemisches Institut der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Straße 1,
D-5300 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

Erwin A. Galinski und Hans G. Trüper

Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168,
D-5300 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **40c**, 780–784 (1985); received July 8/August 9, 1985

Herrn Prof. Dr. O. Kandler zum 65. Geburtstag gewidmet

X-Ray Structure Analysis, Ectoine, Amino Acid, Compatible Solute, Osmoregulation

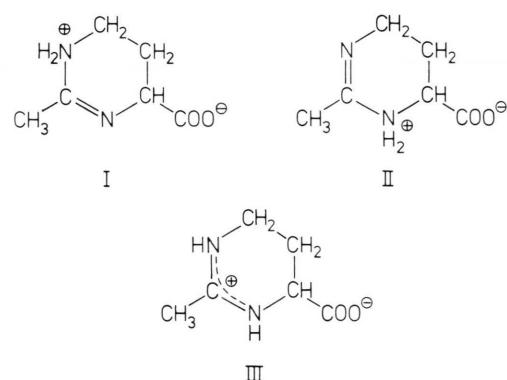
The crystal structure of ectoine (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine carboxylic acid) isolated from the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris* was determined by X-ray analysis. This novel cyclic amino acid forms zwitterionic molecules with delocalized π -bonding in the N-C-N group of the hydrated pyrimidine ring. The molecules are connected by N-H...O hydrogen bonds. The excellent solubility of ectoine in water can be explained by its structural features which also account for its function as a compatible solute in halophilic bacteria.

Einleitung

Untersuchungen zur Osmoregulation extrem halophiler phototroper Bakterien der Gattung *Ectothiorhodospira* haben gezeigt, daß diese Organismen, die aus alkalischen Salzseen des Wadi Natrun in Ägypten isoliert wurden [1], hauptsächlich Betain akkumulieren und als „compatible solute“ verwenden [2].

Daneben wurde unter bestimmten Kulturbedingungen (Salzstress, exponentielle Wachstumsphase) eine weitere, bisher noch unbekannte Aminoverbindung entdeckt, die zwar in deutlich geringerer Konzentration als Betain vorliegt, aber vermutlich ebenfalls eine osmoregulatorische Funktion hat. Bei dieser Verbindung handelt es sich um die zyklische Aminosäure 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidincarbonsäure, für die der Trivialname Ectoin vorgeschlagen wurde [3].

Das Moleköl liegt den Massenspektren zufolge in der Gasphase in undissoziierter Form vor. In wässriger Lösung dagegen dissoziert die Verbindung und bildet Zwitterionen.



Von den angegebenen möglichen Isomeren war die Struktur III mit delokalisierte Doppelbindung aufgrund der ^{13}C -NMR-Daten als die wahrscheinlichere anzusehen, wenngleich ein endgültiger Beweis dazu noch ausstand. Zur Klärung der Molekölgeometrie und der Bindungsverhältnisse im Moleköl haben wir daher eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt, über die wir im folgenden berichten.

Strukturbestimmung

Ectoin wurde wie in [3] beschrieben aus dem Bakterium *Ectothiorhodospira halochloris* isoliert. Ein-kristalle wurden als farblose viereckige Säulen durch

Sonderdruckanforderungen an E. A. Galinski.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/85/1100-0780 \$ 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 digitized 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.

langses Abkühlen einer warmen gesättigten Lösung in Methanol erhalten.

Die Röntgenreflexe wurden auf einem Vierkreisdiffraktometer CAD4 (Enraf Nonius) mit Mo-K α -Strahlung und Graphitmonochromator vermessen. Die Gitterkonstanten wurden anhand von 25 ausgewählten Reflexen bestimmt. Nach den systemati-

schen Auslösungen ($h00$ nur für $h = 2n$, $0k0$ nur für $k = 2n$ und 001 nur für $l = 2n$ vorhanden) ergab sich für die orthorhombisch kristallisierende Substanz die Raumgruppe $P2_12_12_1$. Die Zahl der Formeleinheiten in der Elementarzelle wurde anhand raumchemischer Überlegungen ($0,018 \text{ nm}^3$ pro Atom C, N und O) abgeschätzt. Die kristallographischen Daten sind in Tabelle I zusammengestellt.

Die Lagen der Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatome konnten mit direkten Methoden ermittelt werden, die der Wasserstoffatome aus anschließenden Differenz-Fourier-Synthesen. In den Verfeinerungsrechnungen wurden die an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome mit idealer Geometrie, die an Stickstoff gebundenen individuell berücksichtigt, jeweils mit einem gemeinsamen isotropen Temperaturfaktor. Die übrigen Atome erhielten anisotrope Temperaturfaktoren. Die Atomkoordinaten sind in Tabelle II, Bindungsabstände und -winkel in Abbildung 1 angegeben*.

Tab. I. Kristallographische Daten.

Kristallabmessungen [mm]	0,80 × 0,35 × 0,35
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe (Nr.)	$P2_12_12_1$ (19)
Elementarzelle	
a [pm]	756,3(5)
b [pm]	924,2(3)
c [pm]	1331,9(3)
V [nm 3]	0,931
Formeleinheiten je Zelle	4
Summenformel	$C_6H_{10}N_2O_2$ CH_3OH
Molmasse [g mol $^{-1}$]	174,20
Dichte $_{\text{r}\ddot{\text{o}}}$ [g cm $^{-3}$]	1,24
Absorption μ [cm $^{-1}$]	0,60
Bereich $\Theta <$	25°
Reflexe	
gemessen	947
davon verwendet	808
mit $\sigma (I)/I <$	0,5
verfeinerte Parameter	117
R -Wert (ungewichtet)	0,063

* Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Energie-Physik-Mathematik GmbH, D-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-51497, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

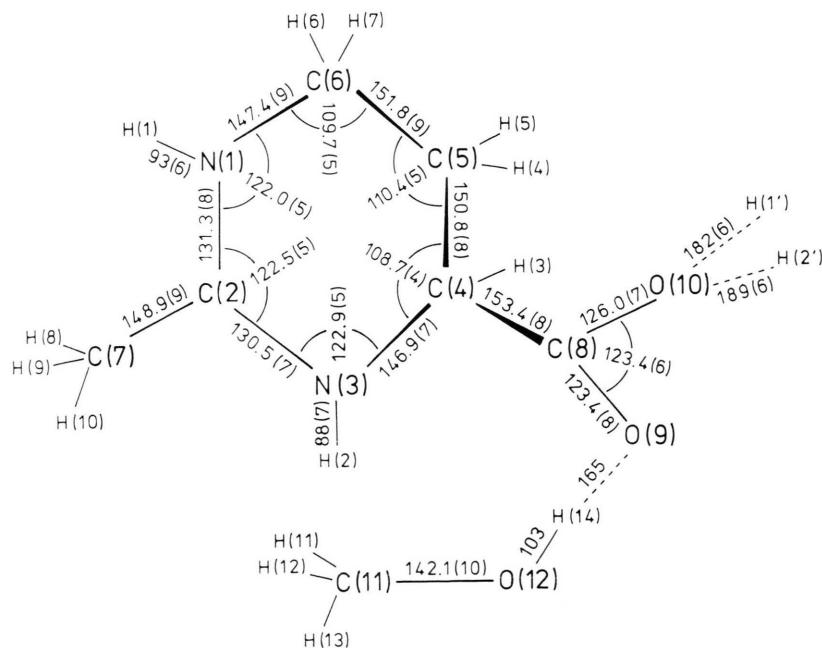


Abb. 1. Bindungsabstände (pm) und -winkel (°) im Molekül; Länge der Wasserstoffbrücken O(10)...N(1') 274,3(7), O(10)...N(3') 272,7(7), O(9)...O(12) 268,0(8) pm.

Tab. II. Atomkoordinaten, äquivalente isotrope (U_{eq})^a und isotrope Temperaturfaktoren (U).

Atom	x	y	z	U_{eq}
N(1)	0,2816(8)	0,0704(6)	0,2416(4)	0,055
C(2)	0,3981(8)	0,1603(7)	0,2796(4)	0,045
N(3)	0,3717(6)	0,2289(5)	0,3639(3)	0,044
C(4)	0,2131(7)	0,2078(6)	0,4258(4)	0,040
C(5)	0,0611(7)	0,1669(7)	0,3582(4)	0,046
C(6)	0,1118(8)	0,0401(8)	0,2918(5)	0,057
C(7)	0,5656(8)	0,1862(9)	0,2236(5)	0,064
C(8)	0,2474(8)	0,0937(6)	0,5072(4)	0,044
O(9)	0,3851(7)	0,0222(6)	0,5087(4)	0,087
O(10)	0,1279(6)	0,0826(5)	0,5728(3)	0,058
C(11)	0,7589(11)	-0,1485(9)	0,4643(7)	0,094
O(12)	0,6753(8)	-0,0435(7)	0,4026(4)	0,100

Atom	x	y	z	U
H(1)	0,303(9)	0,025(8)	0,181(5)	0,07(2)
H(2)	0,437(8)	0,305(7)	0,380(5)	0,07(2)
H(3)	0,1793(7)	0,3068(6)	0,4643(4)	0,12(1)
H(4)	-0,0510(7)	0,1367(7)	0,4038(4)	0,12(1)
H(5)	0,0265(7)	0,2585(7)	0,3118(4)	0,12(1)
H(6)	0,0105(8)	0,0238(8)	0,2357(4)	0,12(1)
H(7)	0,1246(8)	-0,0565(8)	0,3369(4)	0,12(1)
H(8)	0,6464(8)	0,2623(9)	0,2646(5)	0,12(1)
H(9)	0,5361(8)	0,2295(9)	0,1502(5)	0,12(1)
H(10)	0,6360(8)	0,0852(9)	0,2157(5)	0,12(1)
H(11)	0,8797(11)	-0,1843(9)	0,4288(6)	0,12(1)
H(12)	0,6716(11)	-0,2398(9)	0,4746(6)	0,12(1)
H(13)	0,7893(11)	-0,1012(9)	0,5364(6)	0,12(1)
H(14) ^b	0,5590	-0,0155	0,4382	

$$^a U_{\text{eq}} = 1/3 \sum_i \sum_j U_{ij} a_i^* a_j^* \mathbf{a}_i \mathbf{a}_j$$

^b Die Atomkoordinaten wurden nicht verfeinert, es sind daher keine Standardabweichungen angegeben.

Für die Strukturberechnungen wurden die Programme MITHRIL [4] (direkte Methoden), SHELX [5] (Verfeinerungen und Differenz-Fourier-Synthesen) und KPLOT [6] benutzt. Die Zeichnungen wurden mit dem Programm ORTEP [7] angefertigt. Alle Rechnungen wurden auf der Rechenanlage IBM 3081K des Regionalen Hochschulrechenzentrums der Universität Bonn durchgeführt.

Beschreibung der Struktur

Das durch die Röntgenstrukturanalyse gefundene Molekül entspricht der zwitterionischen Struktur III (Formelschema), die bereits aufgrund der in Lösung aufgenommenen ¹³C-NMR-Spektren vermutet wurde. Der Kristall ist demnach ebenfalls aus dissoziier-

ten Molekülen aufgebaut: Die Carboxylgruppe liegt als Anion vor, und beide Stickstoffatome haben jeweils ein Wasserstoffatom gebunden.

Die Bindungsabstände zwischen den Atomen N(1) und C(2) bzw. C(2) und N(3) sind fast gleich groß und liegen zwischen den Werten für Einfach- und Doppelbindung, was für eine Delokalisation der π -Elektronen spricht; der Schwerpunkt der positiven Ladung befindet sich demnach am Atom C(2). Die übrigen Kohlenstoff-Stickstoff-, Kohlenstoff-Sauerstoff- und Kohlenstoff-Kohlenstoff-Abstände entsprechen denen, die in vergleichbaren zyklischen Aminosäuren (Azetidin-2-carbonsäure [8], Prolin [9]) gefunden wurden.

Die Atome N(1), C(2), N(3), C(4) und C(6) sind nahezu planar angeordnet. Legt man durch diese Atome eine Ausgleichsebene, so haben die Kohlenstoff- und Stickstoffatome von dieser Ebene folgende Abstände:

$$\begin{array}{cccccccc} \text{N(1)} & \text{C(2)} & \text{N(3)} & \text{C(4)} & \text{C(5)} & \text{C(6)} & \text{C(7)} & \text{C(8)} \\ -1 & -1 & 2 & -1 & 64 & 1 & -1 & -145 \text{ pm.} \end{array}$$

Das Atom C(5) weicht deutlich von dieser Ebene ab, der Sechsring besitzt demnach Halbsesselkonformation (Abb. 2). Die an das Atom C(2) gebundene Methylgruppe liegt ebenfalls in der Ringebene. Die Carboxylatgruppe nimmt eine axiale Position ein.

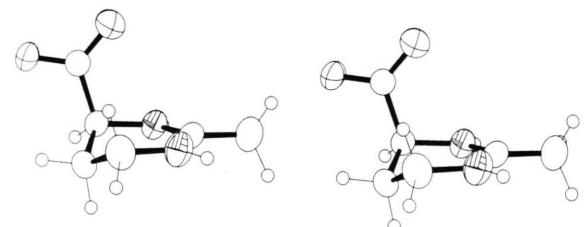


Abb. 2. Konformation des Ectoin-Moleküls (Stereobild, 50% Aufenthaltswahrscheinlichkeit für C, N und O).

Die Moleküle sind im Kristall über N-H...O-Wasserstoffbrücken zu einem dreidimensionalen Raumnetz verknüpft (Abb. 3). An diesen Brücken sind beide Stickstoffatome des Sechsringes, aber nur eines der beiden Carboxylat-Sauerstoffatome beteiligt. Das zweite Sauerstoffatom, das in Richtung der α -Aminogruppe zeigt, bildet eine O...H-O-Wasserstoffbrücke zu einem Molekül des im Kristall eingesetzten Lösungsmittels Methanol aus.

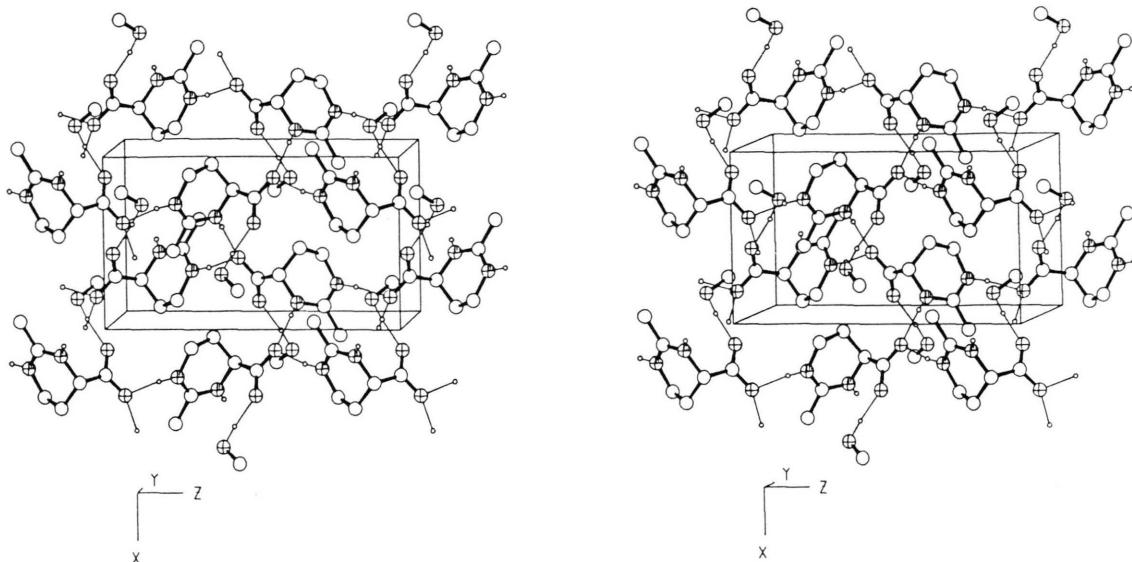


Abb. 3. Elementarzelle des Ectoin (Stereobild); aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die an den Wasserstoffbrücken beteiligten H-Atome eingezeichnet.

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken trägt zu der extrem guten Löslichkeit des Ectoin in Wasser bei (6 mol/kg Wasser bei 4 °C) und erklärt den hohen Schmelzpunkt der Verbindung.

Osmoregulatorische Bedeutung

Bei den bereits beschriebenen „compatible solutes“ aus der Gruppe der Aminoverbindungen handelt es sich typischerweise um ungeladene zwitterionische Strukturen (Betaine und Aminosäuren), die in hoher Konzentration akkumuliert werden können und die die enzymatischen Reaktionen des Organismus nicht beeinträchtigen.

Während bei vielen halotoleranten und trockenresistenten Pflanzen eine Reihe verschiedener Betaine (Glycinbetain, Prolinbetain, Pipecolsäurebetain und Nikotinsäurebetain) mit der Osmoregulation in Zusammenhang gebracht werden [10], hat man bei Bakterien bisher fast ausschließlich Glycinbetain gefunden [2, 11, 12]. Eine mögliche Verwendung von α -Aminosäuren als Osmotika wird dadurch eingeschränkt, daß nur wenige bei physiologischem pH-Wert eine ausreichend gute Wasserlöslichkeit besitzen (z. B. Prolin 14,1, Glycin 3,3, Hydroxyprolin 2,8, Serin 2,4 mol/kg Wasser bei 25 °C [13], zum Vergleich: Glycinbetain 14,2 mol/kg Wasser bei 25 °C

[14]). Die für α -Aminosäuren ungewöhnlich gute Löslichkeit von Prolin wird durch hydrophobe Wechselwirkungen der Pyrrolidinringsysteme in Lösung gedeutet [15]. Eine annähernd hohe Konzentration erreicht nur noch die γ -Aminobuttersäure (12,6 mol/kg Wasser bei 25 °C [16]), die wohl gerade deshalb zusammen mit Prolin zu den wenigen Aminosäuren gehört, die bisher als „compatible solutes“ beschrieben wurden [17].

Die neue Aminosäure Ectoin ist abgesehen von Prolin sehr viel besser wasserlöslich (6 mol/kg Wasser bei 4 °C) als alle obengenannten α -Aminosäuren, die bei physiologischem pH-Wert ungeladen vorliegen. Im Vergleich mit den Azetidin-, Pyrrolidin- und Piperidin-Gerüsten der bekannten zyklischen α -Iminosäuren verleiht das hydrierte Pyrimidinringsystem des Ectoin dem Molekül besondere Eigenschaften:

a) Das Vorhandensein eines zweiten Stickstoffatoms im Ring erhöht die Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken.

b) Infolge der Resonanzstabilisierung sind die Protonen am Stickstoff in Lösung nur schwer dissoziierbar, so daß Ectoin auch bei alkalischen pH-Werten als Zwitterion vorliegt und elektrisch neutral reagiert.

c) Der Schwerpunkt der positiven Ladung im delokalisierten Elektronensystem befindet sich am Atom C(2) und damit in größerer Entfernung zur Carbo-

xylgruppe, wodurch ähnlich wie bei den β - und γ -Aminosäuren die Hydratisierung verbessert wird.

Ectoin spielt bei der Gattung *Ectothiorhodospira* quantitativ offenbar eine untergeordnete Rolle (0,3–0,4 mol/kg Wasser), erfüllt aber aufgrund der oben genannten Eigenschaften alle Anforderungen, die an eine osmoregulatorisch wirksame Verbindung zu stellen sind. Es ist daher zu erwarten, daß diese neue Aminosäure nicht nur bei der Gattung *Ectothiorhodospira*, sondern auch bei anderen extrem

halophilen Organismen vorkommt und dort möglicherweise sogar die Hauptfunktion bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes übernimmt.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] J. F. Imhoff, F. Hashwa und H. G. Trüper, Arch. Hydrobiol. **84**, 381 (1978).
- [2] E. A. Galinski und H. G. Trüper, FEMS Microbiology Letters **13**, 357 (1982).
- [3] E. A. Galinski, H.-P. Pfeiffer und H. G. Trüper, Eur. J. Biochem. **149**, 135 (1985).
- [4] C. J. Gilmore, MITHRIL: A Computer Program for the Automatic Solution of Crystal Structures from X-Ray data, Glasgow 1983.
- [5] G. M. Sheldrick, SHELX-76: Program for Crystal Structure Determination, Cambridge 1976.
- [6] R. Hundt, KPLOT: Ein Programm zum Zeichnen und zur Untersuchung von Kristallstrukturen, Bonn 1979.
- [7] C. K. Johnson, ORTEP: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations, Oak Ridge 1965; bearbeitet von R. Hundt, Bonn 1969.
- [8] H. M. Berman, E. L. McGandy, J. W. Burgner II und R. L. VanEtten, J. Am. Chem. Soc. **91**, 6177 (1969).
- [9] R. L. Kayushina und B. K. Vainshtein, Sov. Phys. Crystallogr. **10**, 698 (1966).
- [10] R. Storey, N. Ahmad und R. G. Wyn Jones, Oecologia (Berl.) **27**, 319 (1977).
- [11] F. A. A. Mohammad, R. H. Reed und W. D. P. Stewart, FEMS Microbiology Letters **16**, 287 (1983).
- [12] M. A. Mackay, R. S. Norton und L. J. Borowitzka, J. Gen. Microbiol. **130**, 2177 (1984).
- [13] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott und K. M. Jones (Hrsg.), Data for Biochemical Research, At the Clarendon Press, Oxford 1969.
- [14] J. T. Edsall und M. H. Blanchard, J. Am. Chem. Soc. **55**, 2337 (1933).
- [15] B. Schobert und H. Tschesche, Biochim. Biophys. Acta **541**, 270 (1978).
- [16] L. S. Mason, J. Am. Chem. Soc. **69**, 3000 (1947).
- [17] J. C. Measures, Nature **257**, 398 (1975).