

## Zwei Pyoverdine aus *Pseudomonas aeruginosa* R. [1]

Two Pyoverdins from *Pseudomonas aeruginosa* R.

S. Gipp\*, J. Hahn\*\*, K. Taraz\* und H. Budzikiewicz\*

\* Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln,  
Greinstraße 4, D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

\*\* Institut für Anorganische Chemie der Universität zu Köln,  
Greinstraße 6, D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **46c**, 534–541 (1991); received April 10, 1991

*Pseudomonas aeruginosa*, Pyoverdins

The structure elucidation of two pyoverdins from the strain R. of *Pseudomonas aeruginosa* is described.

### Einleitung

Vertreter der sog. Fluoreszenten-Gruppe der Bakteriengattung *Pseudomonas* geben bei Wachstum unter Eisenmangelbedingungen eisenkomplexierende Verbindungen, sog. Pyoverdine, in das umgebende Medium ab. Allen Pyoverdinen gemeinsam ist ein Dihydroxychinolinchromophor, an den eine Dicarbonsäure aus dem Zitronensäurezyklus und eine Peptidkette gebunden sind. Der Peptidteil, der z. T. aus ungewöhnlichen Aminosäuren aufgebaut ist, enthält zwei der Komplexierungsstellen für  $\text{Fe}^{3+}$  in der für die oktaedrische Ligandenanordnung geeigneten Position, ist aber auch für die Erkennung an der Zelloberfläche verantwortlich. Im Rahmen unserer systematischen Untersuchungen dieser Verbindungsklasse sind wir bei dem Stamm R. von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Pyoverdine Pa I (**1**) und Pa II (**2**) gestoßen, die in zweifacher Weise interessant sind: Einmal handelt es sich um einen sehr kleinen Vertreter, dessen Peptidkette außer dem für die Komplexierung notwendigen Teil nur noch das C-terminale Gly enthält, zum anderen ist in die Peptid-

kette ein cyclisches Kondensationsprodukt (**3**) von Ser-Dab eingebaut.

### Ergebnisse und Diskussion

Bakterienzucht, Aufarbeitung des Kulturmediums sowie Isolierung und Reinigung der Pyoverdine erfolgte nach dem bereits beschriebenen Verfahren [2], jedoch ohne vorherige Zugabe von  $\text{Fe(III)citrat}$ , so daß auch der Dekomplexierungsschritt wegfiel.

**1** und **2** zeigen Absorptionsmaxima bei 384 nm ( $\log \epsilon$  4,16) bei pH 6,9, die im sauren Bereich (pH 3–5) aufspalten (364 und 377 nm), entsprechend dem  $\pi, \pi^*$ -Übergang des Chromophors. Die Eisenkomplexe weisen im pH-Bereich von 3–7 zusätzlich zu dem Maximum bei 398 nm ( $\log \epsilon$  4,24) charge-transfer-Banden bei 460 und 550 nm auf [3]. Bei Elektrophorese erweist sich **1** bei pH 6,5 als neutral, besitzt aber bei pH 3,0 positive Mobilität entsprechend einer freien Carboxylgruppe (Gly) neben dem positiv geladenen Chromophor. **2** als Dicarbonsäure zeigt bei pH 6,5 negative, bei pH 3,0 (Protonierung beider Carboxylgruppen) positive Mobilität. Die Komplexbildungskonstanten für **1** und **2** sind  $1,36 \times 10^{20}$  bei pH 5,0 und  $3,72 \times 10^{25}$  bei pH 7,0. FAB-Massenspektrometrie ergab für **1** und **2** Molmassen von 1172 bzw. von 1173; die der Eisenkomplexe lagen um 53 u (+  $^{56}\text{Fe} - 3\text{H}$ ) höher. Das sog. *retro*-Diels-Alder-Fragment [4, 6, 7], das dem Verlust des Chinolinsystems zusammen mit der Säure-Seitenkette entspricht, liegt für beide Verbindungen bei  $m/z$  871; sie unterscheiden sich somit nur in der Natur letzterer. Da die Hydrolyse von **1** und **2** Bernsteinsäure liefert, sich die beiden Verbindungen um 1 u in ihrer Masse unterscheiden, **2** eine zusätzliche Säurefunktion besitzt (s. o.

**Abkürzungen:** Dab, 2,4-Diaminobuttersäure; DEPT, Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer; DMSO- $d_6$ , [ $\text{D}_6$ ]-Dimethylsulfoxid; DSS, Natrium-(trimethylsilyl)[ $\text{D}_4$ ]propansulfonat; FAB, Fast Atom Bombardment; GC/MS, Gaschromatographie/Massenspektrometrie; Gln, Glutamin; Glu, Glutaminsäure; Gly, Glycin; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; Orn, Ornithin; Ser, Serin; SUC(A), Bernsteinsäure(amid); TMS, Tetramethylsilan; TSP, Natrium-(trimethylsilyl)[ $\text{D}_4$ ]propionat; Tyr, Tyrosin.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0939–5075/91/0700–0534 \$ 01.30/0

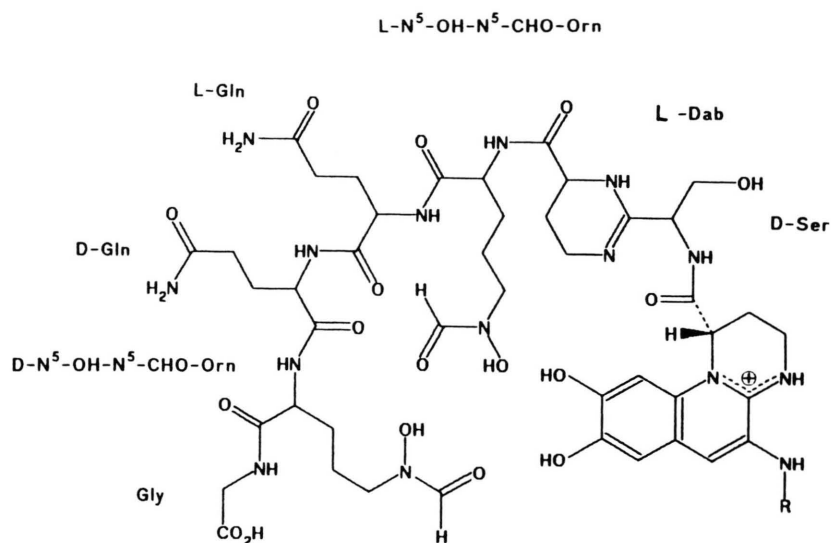


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

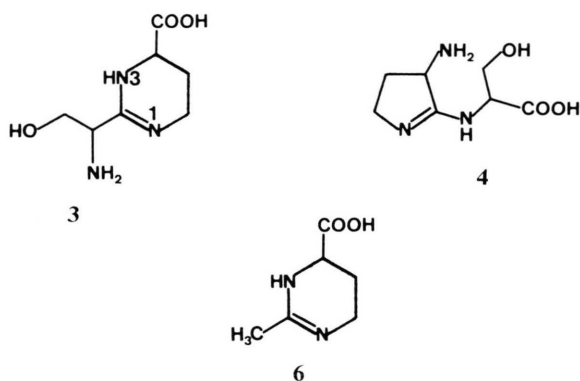
Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

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.



- 1: Pyoverdin Pa I: R = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>  
 2: Pyoverdin Pa II: R = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH



Elektrophorese) und **1** sich in wäßriger Lösung langsam in **2** umwandelt, handelt es sich bei den Säuren-Seitenketten um Bernsteinsäure (**2**) bzw. ihr Amid. Dieses Paar wurde bereits bei anderen Pyoverdinen beobachtet [4–6, 8, 9]; bei **2** handelt es sich wohl um ein Artefakt [10].

Zur Bestimmung der Aminosäuren wurden **1** und **2** 21 h mit 6 N HI bei 110 °C hydrolysiert. Qualitative und quantitative Analyse der N/O-Trifluoracetyl-*n*-butylester (TAB-Derivate [11]) durch GC/MS bzw. GC ergab jeweils 1 Bernsteinsäure, 1 Gly, 2 Glu, 2 Orn sowie eine weitere Komponente (X). Bei Hydrolyse mit HCl wurde neben Orn auch N<sup>5</sup>-Hydroxy-Orn erhalten. Erhöht man die Hydrolysezeit auf 7 Tage oder behandelt man das 21-h-Hydrolysat anschließend 18 h mit 1 N

NaOH bei 110 °C, so erhält man zusätzlich Ser und Dab. Die Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren erfolgte gaschromatographisch (N/O-Trifluoracetyl-*i*-propylester) an einer Chiral-Val-Säule durch Vergleich mit Standards als 1 D- und 1 L-Glu, 1 D- und 1 L-Orn, D-Ser und L-Dab. Zur Lokalisierung der beiden D- und L-Paare (Glu und Orn) wurde ein durch Partialhydrolyse erhaltenes Bruchstück (s. u.) isoliert, totalhydrolysiert und wie angegeben weiter untersucht.

Bei der Hydrolyse fiel auch der OH-Chromophor (Austausch der NH<sub>2</sub>- gegen eine OH-Gruppe, vgl. [8]) an und konnte durch Vergleich mit authentischem Material [9, 12–14] identifiziert werden. Das CD-Spektrum bestätigte die S-Konfiguration: Der Trihydroxychinolinchromophor aus **1** und **2** besitzt im Bereich des  $\pi,\pi^*$ -Überganges (350–385 nm) ebenso wie (OH)Chr aus Pseudobactin einen positiven Cotton-Effekt ( $\lambda_{\max}(\Delta\epsilon) = 364 \text{ nm} (+0,6)$ ).

Da bei Pyoverdinen die einzelnen Aminosäuren nicht immer peptidisch aneinander gebunden sind und z.T. auch modifiziert vorkommen, müssen insbesondere polyfunktionelle Aminosäuren gesondert untersucht werden (die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten finden sich in Tabelle I bzw. II, das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Pa I bei pH 6,9 zeigt Abb. 1).

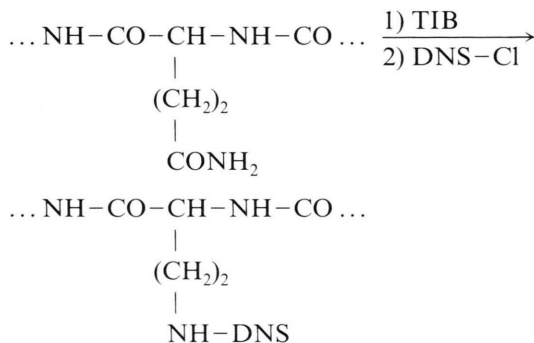
(a) Durch Hydrazinolyse [15] konnte Gly als C-Terminus und damit auch die freie Carboxylgruppe in der Peptidkette von **1** und **2** identifiziert werden.

Tab. I.  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebungen<sup>a</sup> von Pa I in gepuffertem  $\text{D}_2\text{O}$  (0,05 M Phosphatpuffer, pH 3,0 und 6,9).

$^1\text{H}$ -Signale	pH 3,0	pH 6,9
$\gamma$ -(OH)Orn	1,73	1,72
$\beta$ -(OH)Orn	1,73	1,73
$\gamma$ -(OH)Orn	1,78	1,78
$\beta$ -(OH)Orn	1,85	1,85
$\beta$ -Gln	1,92/2,10	1,90/2,07
$\beta$ -Dab	2,06/2,19	2,03/2,17
$\gamma$ -Gln	2,17/2,23	2,15/2,21
2a/2b-Chr	2,53/2,71	2,63/2,71
3'-Acyl	2,74	2,75
2'-Acyl	2,81	2,83
$\gamma$ -Dab	3,19/3,49	3,10/3,45
3a/3b-Chr	3,38/3,69	3,36/3,69
$\delta$ -(OH)Orn	3,58	3,57
$\delta$ -(OH)Orn	3,60	3,59
$\alpha$ -Gly	3,93	3,76
$\alpha$ -(OH)Orn	4,08	3,95
$\beta$ -Ser	4,04/4,06	4,08/4,10
$\alpha$ -Gln	4,26	4,23
$\alpha$ -Gln	4,27	4,24
$\alpha$ -(OH)Orn	4,35	4,35
$\alpha$ -Dab	4,46	4,45
$\alpha$ -Ser	4,64	4,63
1-Chr	5,74	5,68
10-Chr	7,07	6,96
7-Chr	7,16	7,22
6-Chr	7,92	7,81
CHO ( <i>cis</i> )	7,95/7,98	7,95/7,97
CHO ( <i>trans</i> )	8,30/8,32	8,30/8,32

<sup>a</sup> ppm relativ zu TMS.

(b) Für das Vorliegen von 2 Gln spricht die pH-unabhängige (z. U. von Glu)  $^{13}\text{C}$ -Resonanz der  $\gamma$ -CO-Gruppen bei 178,6 bzw. 178,7 ppm (Literaturwert [16] für  $\delta(\gamma\text{-CO-Gln}) = 179,0$  ppm). Den Beweis liefert Hofmann-Abbau mit [Bis(trifluoracetoxymethyl)iod]benzol (TIB) [17] und nachfolgende Dansylierung der entstandenen primären Aminogruppe: Totalhydrolyse liefert kein Glu mehr, sondern 2-Amino-4-dansylaminobuttersäure, die durch Vergleich mit authentischem Material [8] identifiziert wurde.

Tab. II.  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen<sup>a</sup> von Pa I in gepuffertem  $\text{D}_2\text{O}$  (0,05 M Phosphatpuffer, pH 3,0 und 6,9).

$^{13}\text{C}$ -Signale	Mult. <sup>b</sup>	pH 3,0	pH 6,9	Zuordnung <sup>c</sup>
$\beta$ -Dab	t	22,2	22,1	A, B, C
2-Chr	t	22,8	22,7	A, C
$\gamma$ -(OH)Orn	t	23,2	23,2	A, C
	t	23,8	23,7	
$\beta$ -Gln	t	27,7	27,6	A, C
	t	27,8	27,7	
$\beta$ -(OH)Orn	t	28,4	28,3	A, C
	t	28,9	28,8	
3'-Acyl	t	30,9	30,9	A, C
2'-Acyl	t	31,8	31,6	A, C
$\gamma$ -Gln	t	31,7	31,8	A, C
	t	32,0	31,9	
3-Chr	t	36,1	36,0	C
$\gamma$ -Dab	t	37,5	37,2	A, B, C
$\alpha$ -Gly	t	43,2	44,4	C
$\delta$ -(OH)Orn		47,0	47,0	A, C
( <i>trans</i> )	t	47,1	47,1	
$\delta$ -(OH)Orn		51,0	51,0	A, C
( <i>cis</i> )	t	51,0	51,0	
$\alpha$ -Dab	d	51,9	51,6	A, C
$\alpha$ -Gln	d	53,9	53,8	A, C
	d	54,0	54,0	
$\alpha$ -(OH)Orn	d	54,4	54,4	A, C
	d	55,4	55,4	
$\alpha$ -Ser	d	55,7	55,7	A, C
1-Chr	d	57,7	57,4	A, C
$\beta$ -Ser	t	61,6	61,7	A, C
10-Chr	d	101,2	101,3	A, C
7-Chr	d	114,8	114,0	A, C
6a-Chr	s	115,8	114,8	C
5-Chr	s	118,5	117,8	C
10a-Chr	s	132,5	132,3	C
6-Chr	d	139,8	139,3	A, C
8-Chr	s	144,4	144,7	C
4a-Chr	s	150,3	149,8	C
9-Chr	s	152,6	153,8	C
CHO ( <i>cis</i> )	d	160,7	160,5	C
C=N	s	163,4	163,4	B, C, D, E
CHO ( <i>trans</i> )	d	164,9	164,7	C
CO-Chr	s	171,5	171,6	C
CO-Gly	s	171,7	172,1	C, F
$\alpha$ -CO-Gln	s	174,0	174,0	C
	s	174,0	174,1	
CO-(OH)Orn	s	174,5	174,2	C
	s	174,6	174,7	
CO-Dab	s	177,1	177,0	B, C
1'-Acyl	s	177,1	177,3	C
$\gamma$ -CO-Gln	s	178,7	178,6	C
	s	178,7	178,6	
4'-Acyl	s	178,7(3)	178,7	C

<sup>a</sup> ppm relativ zu TMS; Chr = Chromophor, Acyl = Bernsteinsäureamid.<sup>b</sup> Multiplizität durch DEPT ermittelt.<sup>c</sup> Zuordnungsmethoden: A = 2D-COSY; B = Vergleich mit dem Chromophorpeptid **5**; C = Vergleich mit Literaturdaten; D = heteronukleare Doppelresonanz; E = 2D-Long-Range-Korrelation; F = pH-Wertabhängigkeit der chemischen Verschiebung.

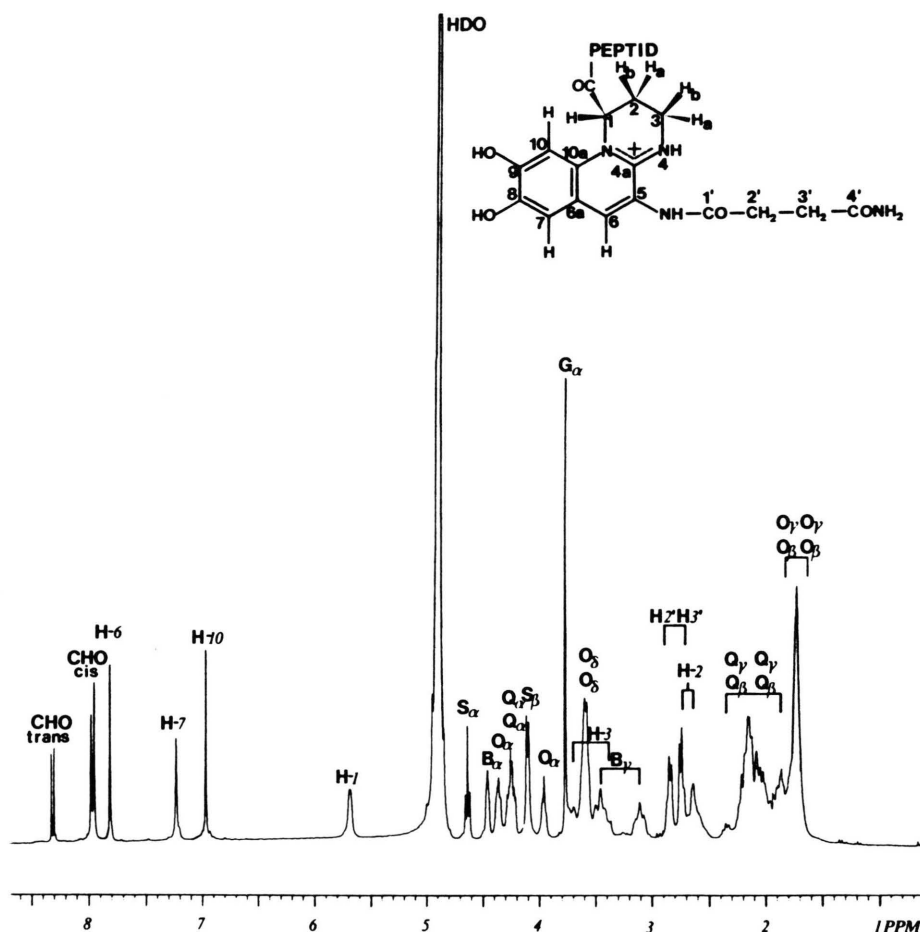


Abb. 1. 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Pa I in gepuffertem  $\text{D}_2\text{O}$  (Phosphatpuffer, pH 6,9), interner Standard DSS, Aminosäuren wurden nach den IUPAC-Regeln bezeichnet (Ausnahmen: O =  $\text{N}^5\text{-CHO-N}^5\text{-OH-Orn}$ ; B = Dab).

(c) Daß die OH-Gruppe von Ser frei ist, folgt aus der Lage der  $\beta\text{-CH}_2$ -Resonanzen, die den Literaturwerten [16] entsprechen. Bei verestertem Ser lägen sie um etwa 0,5 ppm tieffeldverschoben [18]. Überdies zeigen die IR-Spektren von **1** und **2** keine Esterbanden.

(d) Das Vorliegen von 2  $\text{N}^5$ -Formyl- $\text{N}^5$ -hydroxy-Orn folgt aus dem HCl-Hydrolyseergebnis ( $\text{N}^5\text{-OH-Orn}$ ), der Tatsache, daß kein  $\text{N}^5$ -DNS-Orn bei Dansylierung von **1** und **2** gebildet wird (keine freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe) sowie den für diese (für Pyoverdine typischen) Hydroxamsäuren charakteristischen NMR-Daten [4–6, 9]: Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum finden sich bei tiefem Feld zwei unterschiedlich intensive Paare von scharfen Si-

gnalen, die der *cis*- und *trans*-Konfiguration von Formyl-hydroxamsäuren entsprechen. Analoge Aufspaltung der Formyl-C findet man im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum, die der N-Atome im  $^{15}\text{N}$ -Spektrum.

Eine neuartige strukturelle Untereinheit bei Pyoverdinen ist das Kondensationsprodukt von Ser mit Dab (X). Dieses ist direkt an den Chromophor gebunden, da sich nach Hydrolyse mit 6 N HCl (3 h,  $100^\circ\text{C}$ ) das Bruchstück **5** (s. Tabelle IV) isolieren ließ. Exakte Massenmessung der  $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Ionen im FAB-Massenspektrum ergab 445,1841 entsprechend  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_6$ . X muß damit die Zusammensetzung  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$  haben, was Ser + Dab –  $2\text{H}_2\text{O}$  entspricht. Lactonstrukturen kommen aufgrund der freien OH-Gruppe von Ser

(s. u.) nicht in Frage, ebenso kann H<sub>2</sub>O-Abspaltung unter Ausbildung z. B. von  $\text{>C=CH}_2$  aufgrund der NMR-Spektren sowie der Elementarzusammensetzung ausgeschlossen werden. Da sowohl bei saurer wie bei alkalischer Hydrolyse Ser und Dab erhalten werden, müssen die beiden Aminosäuren in hydrolysierbarer Form miteinander verbunden sein. Es bieten sich zwei Möglichkeiten an: Ausgehend von Ser–Dab **3** und ausgehend von Dab–Ser **4**. Eine Unterscheidung ist auf NMR-spektroskopischem Wege möglich: Durch homonukleare Doppelresonanzexperimente lassen sich die Sequenzen  $\text{>CH–CH}_2\text{OH}$  (Ser) und  $\text{–CH}_2\text{CH}_2\text{–CH<}$  (Dab) identifizieren. In einem <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-heteronuklearen Doppelresonanzexperiment sollte beim Einstrahlen bei den CH-Frequenzen die <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>-Kopplung mit dem Amidin-C wegfallen. Einstrahlen bei der Dab–CH-Frequenz führte zu keiner Veränderung des Amidinsignals, wohl aber Einstrahlen bei der Ser–CH-Frequenz. Dies spricht für die Alternative **3**. Bestätigt wird dies durch inverse CH-Korrelationen über 2 und 3 Bindungen, die eine <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>-Kopplung zwischen der Ser–CH- und eine <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>-Kopplung zwischen der Ser–CH<sub>2</sub>-Gruppe und dem Amidin-C zeigen. Im übrigen stimmen auch die <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Daten (s. Tabelle III) mit denen von Ectoin (**6**) überein [19–22].

Das Chromophorpeptid **5** wurde zur Aufnahme der <sup>15</sup>N-NMR-Spektren aus speziell zu diesem Zweck <sup>15</sup>N-angereicherten Pyoverdinen isoliert. Seine <sup>15</sup>N-NMR-Daten sollten mit denen des Trihydroxychinolin-Chromophors [12] und des Ectoins verglichen werden. Der Chromophor war mit der DEPT-Aufnahmetechnik in DMSO-*d*<sub>6</sub> vermessen worden; daher wurde das Bruchstück **5** zur Aufnahme der <sup>15</sup>N-NMR-Spektren ebenfalls in DMSO-*d*<sub>6</sub> gelöst. Ectoin (**6**) konnte jedoch nicht in der erforderlichen hohen Konzentration in DMSO-*d*<sub>6</sub> gelöst werden. Da zwischen den chemischen Verschiebungen von **5** in DMSO-*d*<sub>6</sub> und denen in D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O keine nennenswerten Unterschiede beobachtet werden [23], wurde **6** in D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (2:8) vermessen.

Das breitbandentkoppelte <sup>15</sup>N-DEPT-NMR-Spektrum von **6** zeigt zwei Signale bei –261,7 und –266,7 ppm (relativ zu Nitromethan), die im DEPT-Coupled-Spektrum als zwei Dubletts identifiziert wurden, also durch zwei NH-Gruppen erzeugt werden. Dies stimmt mit dem zwitterioni-

Tab. III. <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von **5** in gepuffertem D<sub>2</sub>O (0,05 M Phosphatpuffer, pH 3,0 und 6,9); <sup>15</sup>N-NMR-Daten in DMSO-*d*<sub>6</sub>; die Zuordnung basiert auf Einstrahl-Experimenten und Vergleich mit Literaturdaten [4, 18–22].

<sup>1</sup> H-Signale		pH 3,0 [δ (ppm)] <sup>b</sup>	pH 6,9 [δ (ppm)] <sup>b</sup>
β-Dab		2,12	2,16
2a/2b-Chr		2,57/2,79	2,56/2,85
γ-Dab <sup>a</sup>		3,41–3,47	3,41–3,57
3a-Chr <sup>a</sup>		3,41–3,47	3,41–3,57
3b-Chr		3,78	3,83
β-Ser		4,08/4,09	4,13/4,14
α-Dab		4,23	4,23
α-Ser		4,77	4,86
1-Chr		5,68	5,66
7-Chr		6,86	6,72
10-Chr		6,91	6,87
6-Chr		7,27	7,17
<sup>13</sup> C-Signale	Mult. <sup>c</sup>	pH 3,0 [δ (ppm)] <sup>b</sup>	pH 6,9 [δ (ppm)] <sup>b</sup>
β-Dab	(t)	22,0	22,1
2-Chr	(t)	23,2	23,2
3-Chr	(t)	36,1	36,0
γ-Dab	(t)	38,5	38,7
α-Dab	(d)	53,6	54,0
α-Ser	(d)	54,9	54,5
1-Chr	(d)	58,0	58,1
β-Ser	(t)	61,5	61,5
10-Chr	(d)	100,9	100,7
7-Chr	(d)	113,1	112,7
6a-Chr	(s)	117,3	117,1
6-Chr	(d)	123,1	122,8
10a-Chr <sup>a</sup>	(s)	128,7	128,5
5-Chr <sup>a</sup>	(s)	129,0	128,8
8-Chr	(s)	144,4	144,3
4a-Chr	(s)	148,3	148,0
9-Chr	(s)	148,8	148,6
C=N	(s)	162,1	161,7
CO–Chr	(s)	172,0	171,8
CO–Dab	(s)	176,2	176,8
<sup>15</sup> N-Signale	Mult. <sup>c</sup>	δ (ppm) <sup>b</sup>	<sup>1</sup> J <sub>NH</sub> (Hz) <sup>c</sup>
>N–Chr	(s)	–241,5	–
NH-3 <sup>d</sup>	(d)	–261,9	95,7
NH-1 <sup>d</sup>	(d)	–267,6	97,7
>NH–Peptidbdg.	(d)	–269,5	92,0
<NH–Chr	(d)	–284,3	95,7
NH <sub>2</sub> –Chr	(t)	–327,3	80,9

<sup>a</sup> Zuordnung nicht eindeutig; zum Teil Überlagerung der Signale.

<sup>b</sup> <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C: ppm relativ zu TMS; <sup>15</sup>N: ppm relativ zu CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> Multiplizität durch DEPT; <sup>1</sup>J<sub>NH</sub> durch DEPT-Coupled.

<sup>d</sup> Bezeichnung s. Abb. 2.



Tab. IV.  $[M + H]^+$ -Ionen der erhaltenen Chromophorpeptide.

$m/z$	Produkt
445 <sup>a,b</sup>	Chr–[(Ser–Dab)–18] <sup>d</sup> ( <b>5</b> )
545 <sup>c</sup>	Suc–Chr–[(Ser–Dab)–18]
575 <sup>a,b</sup>	Chr–[(Ser–Dab)–18]–(OH)Orn
704 <sup>a,b,c</sup>	Chr–[(Ser–Dab)–18]–(OH)Orn–Glu <sup>d</sup> ( <b>7</b> )
833 <sup>a,c</sup>	Chr–[(Ser–Dab)–18]–(OH)Orn–Glu–Glu
963 <sup>a</sup>	Chr–[(Ser–Dab)–18]–(OH)Orn–Glu–Glu–(OH)Orn

<sup>a</sup> 6 N HCl, 2 h, 90 °C.<sup>b</sup> 6 N HCl, 5 h, 90 °C.<sup>c</sup> 6 N HCl, 10 min, 110 °C.<sup>d</sup> wurden isoliert.

schen Charakter von **6** überein. Das Signal bei tieferem Feld wurde aufgrund der direkten Nachbarschaft zur Carboxylgruppe N-3 zugeordnet.

Im breitbandkoppelten <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum von **5** erkennt man sechs <sup>15</sup>N-Signale, von denen eines (–244,0 ppm) in den DEPT-Spektren nicht mehr zu beobachten ist: es handelt sich demnach um den tertiären Stickstoff des Chromophors.

Die restlichen Signale spalten im DEPT-Coupled-Spektrum zu vier Dubletts und einem Triplet auf. Das Triplet bei –327,3 ppm wurde der NH<sub>2</sub>-Gruppe am C-5 des Chromophors, das Dublett bei –284,3 ppm aufgrund von Vergleichsdaten [12] dem Chromophor-NH und das Dublett bei –269,5 ppm dem Stickstoff der Amidbindung zugeordnet. Die restlichen zwei Dubletts haben ihre Signalschwerpunkte bei –261,9 und –267,6 ppm; diese Signallagen stimmen mit den Werten von **6** (s.o.) gut überein, wodurch das Vorliegen eines Tetrahydropyrimidinrings in Struktur **5** untermauert wird.

Kondensationsprodukte von Dab mit einer zweiten Aminosäure unter Ausbildung eines Tetrahydropyrimidinrings scheinen bei Pyoverdinen eine wichtige Rolle zu spielen: Kürzlich konnten wir zeigen, daß Tyr + Dab der biogenetische Vorläufer des Chinolinchromophors ist [24]. Orn + Dab sowie Gln + Dab haben wir in Pyoverdinen und deren Vorläufern gefunden [25]. Kürzlich [26, 27] wurde über das Vorkommen von Ser + Dab und Gln + Dab in Pyoverdinen aus *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen berichtet. Allerdings wurden in diesen beiden Fällen die Alternativstrukturen analog **4** nicht in Betracht gezogen und als Hinweis nur die <sup>1</sup>H-Resonanzen von peptidisch gebundenem Dab sowie die auch bei anderen sechsgliedri-

gen Amidin-Strukturen beobachtete <sup>13</sup>C-Resonanz angegeben. Eine eindeutige Entscheidung ist aber nur, wie gezeigt worden ist, durch heteronukleare Korrelationsexperimente möglich.

Die Aminosäuresequenz von **1** und **2** konnte durch Partialhydrolysen mit 6 N HCl (unterschiedliche Zeiten und Temperaturen) ermittelt werden. Auftrennung der Gemische erfolgte durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 mit 0,1 N CH<sub>3</sub>COOH. Die einzelnen Fraktionen wurden FAB-massenspektrometrisch untersucht (Bestimmung der Massen der  $[M + H]^+$ -Ionen), totalhydrolysiert, in die TAB-Derivate übergeführt und qualitativ gaschromatographisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt. Durch entsprechende Analyse des Bruchstückes **7** an der chiralen Kapillarsäule nach Hydrolyse und Überführung der Aminosäuren in die N/O-Trifluoracetyl-*i*-propylester konnte auch die Lage der Enantiomerenpaare D- und L-Glu und D- und L-Orn bestimmt werden. Damit ergeben sich die Strukturen **1** und **2** für die Pyoverdine Pa I und Pa II (s. Abb. 4). Nach der Kurzschreibweise [4, 8] kommt ihnen die Bezeichnung

Pyoverdin-Q-s\*B\*O'Qqo'G-SUCA (bzw. -SUC)

zu, wobei B für Dab steht.

### Experimenteller Teil

**Massenspektrometer:** Varian MAT 731 bzw. Finnigan MAT HSQ 30 mit einer FAB-Einrichtung der Fa. Ion Tech Ltd., Gas Xe (für FAB-Messungen); Kratos MS 25 F mit Carlo Erba HRGC MF6 500 (SE-54-Säule) bzw. Varian MAT 212 mit Varian 3700 GC (SE-54-Säule) (für GC/MS).

**Gaschromatographie:** Carlo Erba HRGC 4160 mit FID-Detektor und Integrator Chromatopac C-R 3 A der Fa. Shimadzu (SE-54-Säule; He).

**NMR-Spektrometer:**  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : Bruker AM 300 (10–20 mg **1** oder **2** für  $^1\text{H}$ , 30–60 mg für  $^{13}\text{C}$  in 0,4 ml  $\text{D}_2\text{O}$ , Phosphatpuffer, pH 3,0 oder 6,9; Standard DSS  $\delta$  0,0 ppm für  $^1\text{H}$ , –1,61 ppm für  $^{13}\text{C}$ );  $^{15}\text{N}$ : Bruker WM 300 (30 mg **4**, ca. 10%  $^{15}\text{N}$ -angereichert, in  $\text{DMSO}-d_6$  oder  $\text{D}_2\text{O}$ , externer Standard  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ). Homonukleare Verschiebungskorrelationen ( $^3J_{\text{HH}}$ ): 2D-COSY 45 (Bruker HM 300), 30 mg **2** in 0,4 ml  $\text{D}_2\text{O}$ , Phosphatpuffer, pH 3,0; heteronukleare Verschiebungskorrelationen ( $^1J_{\text{CH}}$ ): 2D-COSY mit inverser Meßtechnik (Bruker AMX 500) 60 mg **2** in 0,4 ml  $\text{D}_2\text{O}$ , Phosphatpuffer, pH 3,0; Standard Dioxan,  $\delta$  67,4 ppm relativ zu TMS; heteronukleare long-range-Korrelation im Invers-Modus (Bruker AM 400; 60 mg **2** in 0,4 ml  $\text{D}_2\text{O}$ , Phosphatpuffer, pH 3,0; Standard Na-Trimethylsilyl-tetradecuteropropionat (TSP),  $\delta$  1,7 ppm relativ zu TMS) [28, 29].

**Herkunft von *Pseudomonas aeruginosa* R.:** Der Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* R. wurde von Herrn Dr. H. Korth (Hygiene-Institut der Universität zu Köln) isoliert und aufgrund morphologischer und phänotypischer Merkmale taxonomisch eingeordnet.

**Bakterienzucht, Aufarbeitung, Isolierung und Reinigung der Pyoverdine, Hydrolyse, qualitative**

und quantitative Analyse der Aminosäuren sowie Bestimmung von deren Konfiguration, Bestimmung der Komplexbildungskonstanten, Hofmann-Abbau und Herstellung der Dansylderivate erfolgte nach bereits beschriebenen [4–6, 8, 9] Verfahren.

**Hydrazinolyse:** 0,05 mg **1** wurden mit 0,5 ml wasserfreiem  $\text{N}_2\text{H}_4$  in einem verschlossenen Gefäß 10 h auf 100 °C erhitzt. Die Lösung wurde i. V. zur Trockene eingengt und 2 h über konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zur Entfernung von überschüssigem  $\text{N}_2\text{H}_4$  gehalten. Der Rückstand wurde in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit 0,2 ml  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$  bei Raumtemperatur geschüttelt. Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugieren. Der klare Überstand wurde abpipettiert und mit Ether ausgeschüttelt, die wäßrige Phase i. V. zur Trockene eingengt, dansyliert und mit Hilfe von HPLC untersucht.

#### Danksagung

Wir möchten der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. E. A. Galinski, Universität Bonn, für die Überlassung von Ectoin (**6**) sowie Herrn Prof. Dr. St. Berger, Universität Marburg, und Herrn Dr. D. Wendisch, Bayer AG, Leverkusen, für 2D-NMR-Messungen bestens danken.

- [1] Teil XLVII der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“. Für Teil XLVI siehe K. Geisen, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Monatsh. Chem.*, im Druck.
- [2] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **41c**, 457 (1986).
- [3] J. M. Meyer und M. A. Abdallah, *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319 (1978).
- [4] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 375.
- [5] G. Briskot, Dissertation, Köln 1988.
- [6] K. Poppe, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Tetrahedron* **43**, 2261 (1987).
- [7] S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer und M. A. Abdallah, *Tetrahedron Lett.* **24**, 4877 (1983).
- [8] G. Mohn, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **45b**, 1437 (1990).
- [9] K. Geisen, Dissertation, Köln 1990.
- [10] H. Schäfer, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **46c**, 398 (1991).
- [11] K. R. Leimer, R. H. Rice und G. W. Gehrke, *J. Chromatogr.* **141**, 121 (1977).
- [12] J. Michels, Diplomarbeit, Köln 1989.
- [13] G. Mohn, Dissertation, Köln 1990.
- [14] K. Taraz, D. Seinsche und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **46c**, 522 (1991).
- [15] C. I. Niu und H. Fraenkel-Conrat, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5882 (1955).
- [16] K. Wüthrich, *NMR in Biological Research: Peptides and proteins*, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1976.
- [17] A. S. Radhakrishna, M. E. Panham, R. M. Riggs und G. M. Loudon, *J. Org. Chem.* **44**, 1746 (1979).
- [18] C. C. Yang und J. Leong, *Biochemistry* **23**, 3534 (1984).
- [19] R. Regev, I. Peri, H. Gilboa und Y. Avi-Dor, *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 106 (1990).
- [20] E. A. Galinski, H.-P. Pfeiffer und H. G. Trüper, *Eur. J. Biochem.* **149**, 135 (1985).
- [21] A. Wohlfarth, J. Severin und E. A. Galinski, *J. Gen. Microbiol.* **136**, 705 (1990).
- [22] L. Inbar und A. Lapidot, *J. Biol. Chem.* **263**, 16014 (1988).
- [23] G. E. Hawkes, E. W. Randall und C. H. Bradley, *Nature* **257**, 767 (1975).
- [24] K. Taraz, R. Tappe, H. Schröder, U. Hohlneicher, I. Gwose, H. Budzikiewicz, G. Mohn und J. F. Lefèvre, *Z. Naturforsch.* **46c**, 527 (1991).
- [25] I. Gwose, unveröffentlicht.
- [26] P. Demange, A. Bateman, J. K. MacLeod, A. Dell und M. A. Abdallah, *Tetrahedron Lett.* **31**, 7611 (1990).
- [27] P. Demange, A. Bateman, C. Mertz, A. Dell, Y. Piemont und M. A. Abdallah, *Biochemistry* **29**, 11041 (1990).
- [28] A. Bax, R. H. Griffey und B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.* **55**, 301 (1983).
- [29] J. Cavanagh, C. A. Hunter, D. N. M. Jones, J. Keeler und J. K. M. Sanders, *Magn. Res. Chem.* **26**, 867 (1988).