

Pyoverdine aus *Pseudomonas putida*

Pyoverdins from *Pseudomonas putida*

I. Gwose and K. Taraz

Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41

Z. Naturforsch. **47c**, 487–502 (1992); received March 2/May 19, 1992

Pseudomonas putida, Pyoverdins

The structures of two pyoverdins (Pp 1 and Pp 2) and one dihydropyoverdin (dihydro-Pp 2) from a strain of *Pseudomonas putida* have been elucidated by spectroscopic methods and degradation studies. The pyoverdins Pp 1 and Pp 2 consist of a chromophore which was identified as (1*S*)-5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1*H*-pyrimido[1,2-*a*]quinoline-1-carboxylic acid substituted at the amino group with a 3-carboxypropanoyl or a succinamoyl residue and at the carboxy group with the N-terminus of L-Ser-L-Thr-D-Ser-L-Orn-L-threo-(OH)Asp-[D-Gln + L-Dab]*-L-Ser-D-allo-Thr-L-c(OH)Orn.

Dihydro-Pp 2 differs from Pp 2 only in the chromophore, which is saturated at carbons 5 and 6. All compounds contain a tetrahydropyrimidine moiety ([D-Gln + L-Dab]*) resulting from the condensation of 2,4-diaminobutyric acid and glutamine.

Einleitung

Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, die in der Fluoreszentengruppe zusammengefaßt werden, scheiden beim Wachstum unter Eisenmangelbedingungen intensiv fluoreszierende peptidische Siderophore, sogenannte Pyoverdine, in das umgebende Medium aus. Die physiologische Bedeutung dieser Eisen-III-komplexierenden Substanzen liegt in der Versorgung der Zelle mit Eisen.

Allen Pyoverdinen gemeinsam ist der Chr, dessen Fluoreszenz Veranlassung für die Namensgebung der o.g. Bakteriengruppe ist. Der Chr, der als ein Dihydroxy-Chinolin-Derivat aufgefaßt werden kann, besitzt am C-1 eine Carboxylgruppe, die mit einer Peptidkette verknüpft ist, und trägt des weiteren am C-5 eine Aminogruppe, an der amidisch ein Acylrest einer Dicarbonsäure (aus dem Citronsäurecyclus) oder deren Amid gebunden ist. Der Chr stellt durch die Catecholgruppe eine zwei-

zähnige Komplexierungsstelle für Fe³⁺ dar. Der Peptidbereich trägt die beiden anderen zweizähnigen Liganden (entweder Hydroxamateinheiten oder eine Hydroxamat- und eine α -Hydroxycarboxylateinheit), und zwar in solchem Abstand, daß eine oktaedrische Ligandenanordnung zu steht kommt.

Die Strukturelemente, die für die Erkennung des Siderophors durch die Zellrezeptoren verantwortlich sind, befinden sich ebenfalls im Peptidbereich, der je nach Stamm erhebliche Variationen aufweist. Dieser Bereich ist zum Teil aus D-konfigurierten und seltenen Aminosäuren zusammengesetzt. Häufig sind die Aminosäuren polyfunktionell, so daß durch Kondensation cyclische Teilstrukturen entstehen können. Die etablierten Methoden der Peptidanalytik können deshalb der strukturellen Problematik nicht gerecht werden. Entsprechend gering ist die Anzahl der vollständig beschriebenen Pyoverdinstrukturen [1–11]. Erst kürzlich wurde eine für die Pyoverdine speziell entwickelte chemisch-massenspektrometrische Sequenzierungsmethode veröffentlicht [1].

In der vorliegenden Arbeit wird die Strukturaufklärung zweier Pyoverdine Pp 1 (**1**) und Pp 2 (**2**) sowie eines Dihydropyoverdins Dihydro-Pp 2 (**3**) dargestellt, die aus Eisenmangelkulturen eines Stammes von *Pseudomonas putida* isoliert wurden. Alle drei Komponenten besitzen einen identisch strukturierten Peptidbereich. Die Struktur eines cyclischen Kondensationsproduktes aus Gln und Dab konnte durch Isolierung desselben aus dem Partialhydrolysat der Pyoverdine vollständig charakterisiert werden.

Abkürzungen: Chr, Chromophor; Dab, 2,4-Diaminobuttersäure; Dihydro-Chr, 5,6-Dihydro-Chromophor; DEPT, Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer; DMSO-d₆, [D₆]-Dimethylsulfoxid; DSS, Sodium-(trimethyl)[D₆]propansulfonat; FAB, Fast Atom Bombardement; GC/MS, Gaschromatographie/Massenspektrometrie; Gln, Glutamin; Glu, Glutaminsäure; Orn, Ornithin; (OH)Orn, δ -N-Hydroxyornithin; (OH)Asp, β -Hydroxyasparaginsäure; Ser, Serin; SUC(A), Bernsteinsäure(amid); Thr, Threonin; allo-Thr, allo-Threonin; TMS, Tetramethylsilan.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Kambiz Taraz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,
D-W-7400 Tübingen
0939-5075/92/0700-0487 \$ 01.30/0

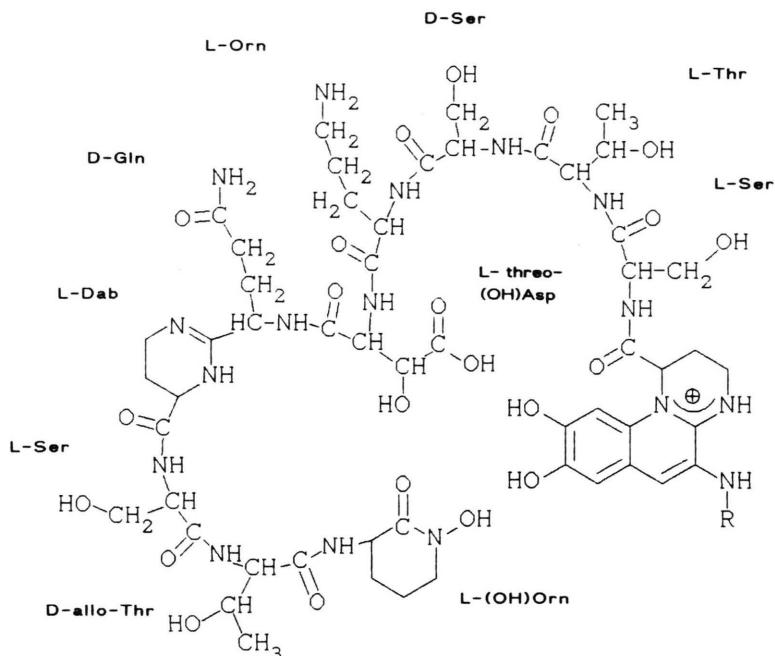


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

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.

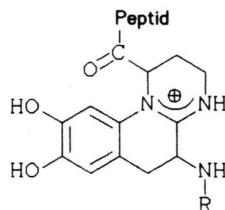
On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



Pyoverdin Pp1: $R = \text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ (1)

Pyoverdin Pp2: $R = \text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$ (2)

Pyoverdin Dihydro-Pp2: $R = \text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$ (3)



Ergebnisse und Diskussion

Isolierung von 1, 2 und 3

Die Bakterienzucht erfolgte in einem synthetischen Minimalmedium. Die Anfangskonzentration an Fe^{3+} war geringer als 20 $\mu\text{g/l}$. Die durchschnittliche Wachstumsdauer der Flüssigkulturen betrug 3–4 Tage. Um die Luftoxidation des Chlormophors – besonders im Falle 3 – bei der Isolierung zu vermeiden, wurden die Pyoverdine durch Zugabe von Fe^{3+} -Citrat zum Kulturmedium in ihre Fe^{3+} -Komplexe übergeführt und anschließend

durch Adsorption an XAD-4 vom Filtrat getrennt. Die Desorption erfolgte mit einem Aceton/Wasser-Gemisch (4:6, v/v). Der XAD-Extrakt wurde des weiteren durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex G 25 (Pyridiniumacetat-Puffer pH 5) in die Fe^{3+} -Komplexe 1, 2 und 3 aufgetrennt, die jeweils durch Gelfiltration (Bio-Gel P 2, 0,1 N Essigsäure) weiter gereinigt wurden. Mit 8-Hydroxychinolin wurde die Dekomplexierung durchgeführt, und durch anschließende Chromatographie an Bio-Gel P 2 wurden die freien Chelatoren 1, 2 und 3 gewonnen.

Charakterisierung

Die Voruntersuchungen hatten die Zuordnung von **1**, **2** und **3** zu den bekannten Siderophorenklassen und die Klärung der strukturellen Unterschiede der drei Siderophore untereinander zum Ziel.

1 und **2** haben identische UV/VIS-Spektren, die die charakteristischen Absorptionen des Pyoverdin-chromophors und deren pH-Wert-Abhängigkeit zeigen [12]: Maximum bei 398 nm ($\log \epsilon = 4,22$), pH 6,9; Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen unter Aufspaltung der Bande bei abnehmendem pH-Wert. Die rotbraunen Fe^{3+} -Komplexe zeigen zusätzliche charge-transfer-Banden bei ~ 470 nm und ~ 550 nm. Die Lage der Banden ist im Bereich pH 3 bis 7 konstant. **3** weist die spektralen Eigenschaften der Dihydropyoverdine auf [6, 8]. Sie sind farblos und zeigen in Lösung keine Fluoreszenz. Die pH-unabhängigen Absorptionen bei 225 und 297 nm sind auf π - π^* - und intramolekulare charge-transfer-Übergänge im Dihydro-Chromophor zurückzuführen. Für die violette Farbe des Fe^{3+} -Komplexes von **3** (pH 7) ist das breite charge-transfer-Maximum bei 530–540 nm verantwortlich. Die charge-transfer-Bande zeigt eine hypsochrome Verschiebung von 550 nm (pH 3,0) auf 529 nm (pH 9,5). Die Komplexbildungskonstanten für **1** und **2** sind $3,1 \times 10^{25}$ (pH 7) und $5,8 \times 10^{18}$ (pH 5).

Mit der Hochspannungspapierelektrophorese wurden die elektrophoretischen Mobilitäten von **1**, **2** und **3** sowie von deren Eisenkomplexen bei pH 1,9, pH 3,0 und pH 6,5 bestimmt (s. Tab. I). Die Untersuchungen von **1**, **2** und **3** ergaben für alle drei Komponenten eine Erhöhung der Mobilität beim Übergang von pH 3,0 zu 1,9 (Protonierung der β -Carboxylgruppe von (OH)Asp). Als einzige Komponente zeigt **1** beim Übergang von pH 6,5 zu pH 3,0 einen Mobilitätsprung (Protonierung der Carboxylgruppe der Bernsteinsäure-Seitenkette) und erreicht annähernd die gleiche Mobilität wie **2** und **3**.

Die Totalhydrolyse erfolgte sowohl in 6 N HCl als auch in 6 N HI, um die quantitative Bestimmung von (OH)Orn zu gewährleisten [13]. Qualitative und quantitative Analyse der N/O-Trifluoracetyl-*n*-butylester (TAB-Derivate) [14] durch GC/MS bzw. GC ergab für alle drei Komponenten eine identische Zusammensetzung: 1 (OH)Asp,

1 Bernsteinsäure, 1 Dab, 1 Glu, 1 Orn, 1 (OH)Orn, 3 Ser, 1 Thr, 1 allo-Thr. Die Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren (N/O-Trifluoracetyl-*i*-propylester [15]) erfolgte gaschromatographisch an einer Chirasil-L-Val-Säule durch Vergleich mit Standards: 1 L-(OH)Asp, 1 L-Dab, 1 D-Glu, 2 L-Orn, 2 L-Ser, 1 D-Ser, 1 L-Thr, 1 D-allo-Thr.

Tab. I. Elektrophoretische Mobilitäten (m) der Pyoverdine und ihrer Eisen(III)-Komplexe relativ zu Glucose (0) und Desferal (+1).

	m (pH 1,9)	m (pH 3,0)	m (pH 6,5)
Pp1	1,35	0,90	0,48
Pp2	1,30	0,98	0,87
Dihydro-Pp2	1,28	0,97	0,86
Fe-Pp1	—	0,50	0,01
Fe-Pp2	—	0,52	0,52
Fe-Dihydro-Pp2	—	0,55	0,54

Aus dem HCl-Hydrolysat konnte auch der (OH)-Chromophor (bei dem durch die Hydrolyse bedingt die Aminogruppe gegen eine Hydroxylgruppe substituiert ist) isoliert und durch Vergleich mit authentischem Material [6, 16–19] identifiziert werden. Das CD-Spektrum bestätigte die S-Konfiguration an C-1.

Die FAB-Massenspektren von **1**, **2** und **3** zeigen intensive Quasi-Molekülionen ($[\text{MH}]^+$: m/z 1406 (**1**), m/z 1405 (**2**), m/z 1407 (**3**)). Alle drei Spektren weisen das gleiche retro-Diels-Alder-Fragment (Peptidkette mit einer $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}$ -Einheit aus dem Chromophor) bei m/z 1103 auf [1]. Die Fe^{3+} -Komplexe zeigen jeweils einen Massenunterschied von 53 u gegenüber den freien Pyoverdinen. Dies entspricht dem Ersatz von drei Protonen durch ein $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ion.

Die Art der komplexierenden Gruppen (Catecholat, Hydroxamat, α -Hydroxycarboxylat) und die peptidische Natur des ligandenträgenden Gerüstes machen die Zugehörigkeit von **1**, **2** und **3** zu den Siderophoren der Pyoverdin-Klasse deutlich.

Das UV/VIS-spektrale Verhalten spezifiziert **1** und **2** als Pyoverdine und **3** als ein Dihydropyoverdin.

Die Identität des Peptidbereiches aller drei Komponenten lässt sich durch die gleiche Aminosäurenzusammensetzung, die identische Masse des retro-Diels-Alder-Fragments und die identische Lage der entsprechenden NMR-Signale (s. Tab. II–IV) belegen. Die beobachteten Massendiffe-

Tab. II. ^1H -NMR-Daten^a der Pyoverdine Pp 1, Pp 2 und Dihydro-Pp 2 in gepuffertem D_2O ^b bei pH 3 und pH 6,9.

Proton ^c	pH 3		Dihydro-Pp 2	pH 6,9	
	Pp 1	Pp 2		Pp 1	Pp 2
Seitenkette:					
2'-Acyl	2,82	2,82	2,61	2,62	2,80
3'-Acyl	2,78	2,76	2,61	2,68	2,73
Chromphor:					
1-Chr	5,72	5,73	5,28	5,67	5,69
2a/2b-Chr	2,46/2,74	2,55/2,81	2,50/2,57	2,43/2,69	2,42/2,68
3a/3b-Chr	3,31/3,75	3,35/3,73	3,23/3,68	3,31/3,75	3,35/3,37
5-Chr	—	—	5,50	—	—
6-Chr	7,94	7,92	3,03/3,06	7,85	7,84
7-Chr	7,18	7,12	6,81 ^d	7,08	7,09
10-Chr	7,05	7,03	6,85 ^d	6,86	6,87
Peptidkette:					
α -2,4-Dab	4,49	4,50	4,47	4,48	4,49
β -2,4-Dab	2,18	2,19	2,17	2,18	2,19
γ -2,4-Dab	3,31/3,53	3,31/3,53	3,30/3,53	3,30/3,53	3,31/3,54
α -Gln	4,65	4,65	4,65	4,60	4,60
β -Gln	2,20	2,21	2,20	2,20	2,21
γ -Gln	2,46	2,48	2,47	2,46	2,47
α -(OH)Asp	4,86	4,87	4,87	4,85	4,85
β -(OH)Asp	4,60	4,62	4,62	4,45	4,47
α -(OH)Orn	4,46	4,46	4,47	4,45	4,47
β -(OH)Orn	1,76/2,01	1,76/2,01	1,76/2,01	1,75/1,99	1,76/2,00
γ -(OH)Orn	1,99	2,01	1,98	1,98	2,01
δ -(OH)Orn	3,62/3,66	3,62/3,67	3,60/3,64	3,62/3,66	3,63/3,67
α -Orn	4,48	4,47	4,48	4,48	4,48
β -Orn	1,78/1,93	1,78/1,93	1,78/1,93	1,78/1,93	1,78/1,93
γ -Orn	1,70	1,72	1,71	1,70	1,72
δ -Orn	3,02	3,03	3,01	3,01	3,03
α -Ser'	4,62	4,60	4,60	4,61	4,60
α -Ser	4,55	4,57	4,55	4,55	4,57
α -Ser	4,53	4,52	4,53	4,53	4,53
β -Ser'	3,99	3,98	3,97	3,99	4,00
β -Ser	3,88	3,88	3,88	3,88	3,90
β -Ser	3,90	3,92	3,88	3,90	3,92
α -allo-Thr	4,38	4,38	4,38	4,38	4,38
β -allo-Thr	4,13	4,13	4,12	4,13	4,16
γ -allo-Thr	1,23	1,26	1,26	1,23	1,26
α -Thr	4,54	4,55	4,54	4,45	4,46
β -Thr	4,32	4,32	4,32	4,32	4,33
γ -Thr	1,18	1,20	1,19	1,18	1,19

^a Chemische Verschiebung δ [ppm] relativ zu TMS; DSS als innerer Standard mit δ (DSS) = 0 ppm.

^b 0,1 M Phosphatpuffer in D_2O .

^c Abkürzungen: Chr, Chromphor; Acyl, Bernsteinsäure(amid); 2,4-Dab, 2,4-Diaminobuttersäure; Gln, Glutamin; (OH)Asp, β -Hydroxyasparaginsäure; (OH)Orn, cyclo- δ -N-Hydroxyornithin; Orn, Ornithin; Ser, Serin, allo-Thr, allo-Threonin; Thr, Threonin.

^d Zuordnung nicht sicher.

renzen von **1**, **2** und **3** müssen daher im Chr oder/und der daran gebundenen Acylseitenkette vorliegen. Alle drei Komponenten liefern bei der Totalhydrolyse Bernsteinsäure. Die Ergebnisse der Elektrophorese weisen bei **1** auf eine zusätzliche Säurefunktion hin. Eine eindeutige Interpretation

dieser Ergebnisse ist, wenn **1** Bernsteinsäure, **2** und **3** Bernsteinsäureamid als Seitenkette tragen und **3** sich von **2** durch den in 5,6-Position hydrierten Chromophor unterscheidet (Massendifferenz 2 u).

Die strukturelle Beziehung der Komponenten wurde durch die Überführung von **3** in **2** (oxidati-

Tab. III. ^{13}C -NMR-Daten^a der Pyoverdine Pp 1, Pp 2 und Dihydro-Pp 2 in gepuffertem D_2O bei pH 3^b.

^{13}C -Atom	Mult ^c	Pp 1	Pyoverdine Pp 2	Dihydro-Pp 2	Zuordnung ^d
Seitenkette:					
1'-Acyl	s	177,8	177,4	177,0	A
2'-Acyl	t	32,2	30,9	30,9	A, B, E
3'-Acyl	t	31,7	31,8	31,6	A, B, E
4'-Acyl	s	180,0	178,8	178,8	A
Chromophor:					
CO-Chr	s	171,2	171,2	171,2	A
1-Chr	d	58,0	58,0	56,6	A, B
2-Chr	t	23,1	22,9	23,4	A
3-Chr	t	36,3	36,3	37,3	A
4a-Chr	s	150,5	150,5	161,1	A
5-Chr	→	118,7(s)	118,7(s)	48,3(d)	A
6-Chr	→	140,0(d)	140,1(d)	29,1(t)	A
6a-Chr	s	116,0	116,1	117,4	A
7-Chr	d	115,0	115,1	117,6	A
8-Chr	s	144,6	144,6	143,4	A
9-Chr	s	152,4	152,3	145,1	A
10-Chr	d	101,3	101,3	105,7	A
10a-Chr	s	132,7	132,8	129,2	A
Peptidkette:					
CO-Dab	s	172,3	172,3	172,3	A, C
α -Dab	d	52,3	52,3	52,3	B
β -Dab	t	22,2	22,2	22,2	B
γ -Dab	t	37,6	37,6	37,6	B
Gln: NH-C=N	s	164,6	164,6	164,6	C, F
α -Gln	d	52,7	52,7	52,7	B
β -Gln	t	28,1	28,1	28,1	B
γ -Gln	t	31,8	31,8	31,8	B
γ CO-Gln	t	178,0	178,0	178,0	A
α CO-(OH)Asp	s	173,5	173,4	173,4	A, C
α -(OH)Asp	d	57,8	57,7	57,6	A
β -(OH)Asp	d	72,9	72,8	72,6	A
β CO-(OH)Asp	s	177,2	177,1	177,2	A
CO-(OH)Orn	s	167,6	167,6	167,6	A, D
α -(OH)Orn	d	51,5	51,5	51,5	A, D
β -(OH)Orn	t	27,7	27,7	27,7	A, D
γ -(OH)Orn	t	21,1	21,1	21,1	A, D
δ -(OH)Orn	t	52,7	52,7	52,7	A, D
α -Orn	d	54,5	54,5	54,5	A
β -Orn	t	28,7	28,7	28,6	A
γ -Orn	t	24,2	24,2	24,2	A
δ -Orn	t	39,9	39,9	39,9	A
CO-Ser'	s	172,5	172,5	172,5	A, C
CO-Ser	s	173,0	173,0	172,9	A, C
CO-Ser ^f	s	173,3	173,2	173,1	A
α -Ser'	d	56,9	56,9	56,7	A
α -Ser	d	56,9	56,9	56,9	A
α -Ser	d	56,9	56,9	56,9	A
β -Ser'	t	61,9	61,9	61,9	A, B
β -Ser	t	62,2	62,2	62,2	A, B
β -Ser	t	62,2	62,2	62,2	A, B
CO-allo-Thr	s	172,1	172,0	172,0	A, C
α -allo-Thr	d	60,1	60,0	60,1	A, B
β -allo-Thr	d	68,2	68,2	68,2	A, B

¹³ C-Atom	Mult ^c	Pp 1	Pyoverdine Pp 2	Dihydro-Pp 2	Zuordnung ^d
γ -allo-Thr	q	19,3	19,3	19,3	A, B
CO-Thrf	s	173,4	173,3	173,3	A
α -Thr	d	60,1	60,1	60,1	A, B
β -Thr	d	68,5	68,3	68,4	A, B
γ -Thr	q	19,8	19,8	19,8	A, B

^a Chemische Verschiebung δ [ppm] relativ zu TMS; DSS als innerer Standard; $\text{CH}_3(\text{DSS}) = -161$ ppm. Bezeichnungen: Chr = Chromophor; Acyl = Bernstein-säure(amid).

^b 0,1 M Phosphatpuffer.

^c Multiplizität bestimmt durch DEPT.

^d Zuordnung über A: Vergleich mit Literaturdaten B: C,H-COSY; C: H,C-long-range-COSY; D: Modifizierung von (OH)Orn; E: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung; F: Heteronukleare Doppelresonanz.

^e Zuordnung unsicher.

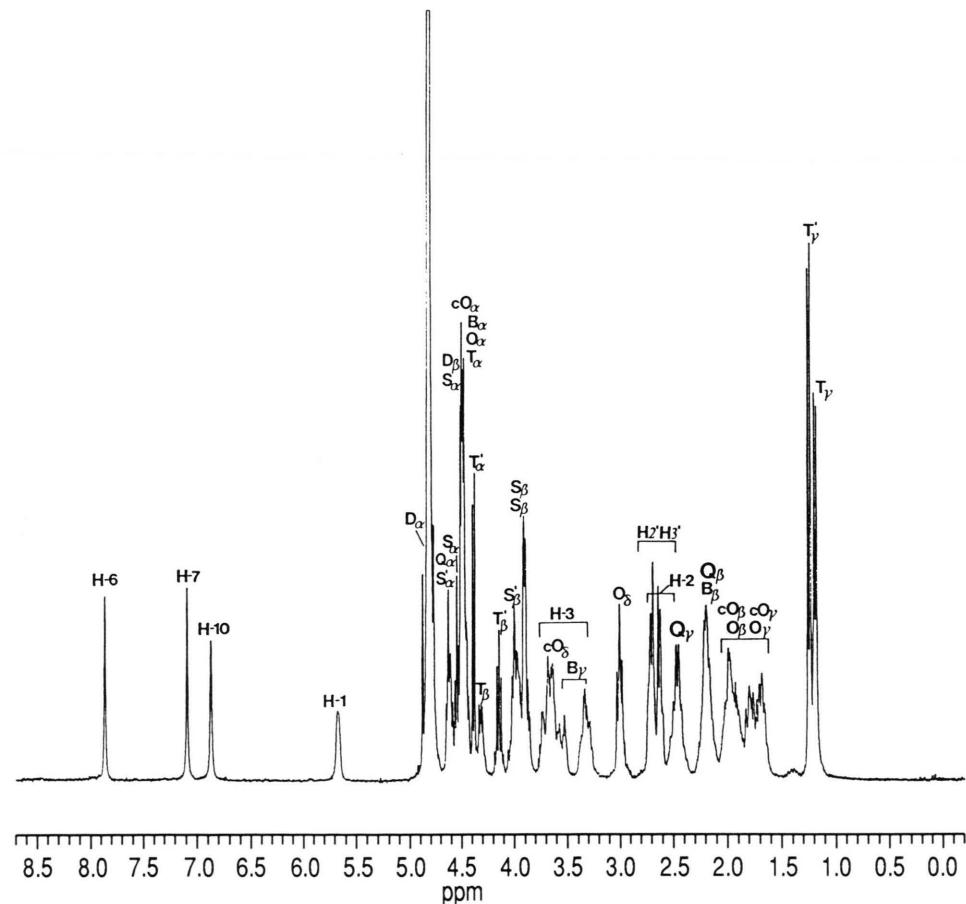


Abb. 1. 300-MHz ¹H-NMR-Spektrum von Pyoverdin Pp 1 (als Chlorid); in D_2O mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,9. Synonym verwendete Abkürzungen in Abb. und Tab.: B, 2,4-Dab; D, (OH)Asp; O, Orn; cO, (OH)Orn; S bzw. S', Ser; T, Thr; T', allo-Thr; Q, Gln.

Tab. IV. ^{13}C -NMR-Daten^a der Pyoverdine Pp 1, Pp 2 und Dihydro-Pp 2 in gepuffer-tem D_2O bei pH 6,9^b.

^{13}C -Atom	Mult ^c	Pp 1	Pyoverdine Pp 2	$^1\text{J}(\text{C},\text{H})^e$	Zuordnung ^d
Seitenkette:					
1'-Acyl	s	177,8	177,4	—	A
2'-Acyl	t	31,8	31,8	128,8	A, B, E
3'-Acyl	t	31,7	31,9	128,8	A, B, E
4'-Acyl	s	182,2	178,5	—	A
Chromophor:					
CO-Chr	s	171,1	171,7	—	A
1-Chr	d	58,0	57,8	144,0	A, B
2-Chr	t	23,1	23,2	135,0	A, B
3-Chr	t	36,3	36,1	143,0	A, B
4a-Chr	s	150,4	150,0	—	A
5-Chr	s	118,7	116,5	—	A
6-Chr	d	139,9	140,1	167,5	A, B
6a-Chr	s	115,9	116,5	—	A
7-Chr	d	114,9	114,3	162,5	A, B
8-Chr	s	144,6	146,2	—	A
9-Chr	s	152,2	157,0	—	A, E
10-Chr	d	101,2	101,3	157,5	A, B
10a-Chr	s	132,6	133,8	—	A
Peptidkette:					
CO-Dab	s	172,3	172,4	—	A, C
α -Dab	d	54,5	54,8	146,0	B
β -Dab	t	22,2	22,2	135,0	B
γ -Dab	t	37,6	37,6	146,5	B
Gln: NH-C=N	s	164,6	164,6	—	A, C, F
α -Gln	d	52,7	52,8	141,5	B
β -Gln	t	28,1	28,2	133,0	B
γ -Gln	t	31,7	31,0	128,0	B
γ CO-Gln	s	178,0	178,0	—	B, F
CO-(OH)Asp	s	173,4	173,7	—	A, C
α -(OH)Asp	d	58,0	57,7	142,0	A
β -(OH)Asp	d	72,7	73,0	147,8	A
β CO-(OH)Asp	s	177,2	177,3	—	A
CO-(OH)Orn	s	167,6	167,6	—	A, D
α -(OH)Orn	t	52,3	52,3	144,0	A, D
β -(OH)Orn	t	27,7	27,7	131,9	A, D
γ -(OH)Orn	t	21,1	21,1	131,0	A, D
δ -(OH)Orn	t	52,7	52,7	143,2	A, D
CO-Orn	s	174,6	174,7	—	A
α -Orn	d	51,5	51,5	139,0	A
β -Orn	t	28,6	28,7	135,5	A
γ -Orn	t	24,2	24,2	136,0	A
δ -Orn	t	39,9	39,9	143,0	A
CO-Ser'	s	172,5	172,7	—	A, C
CO-Ser	s	172,9	173,2	—	A, C
CO-Ser ^f	s	173,2	173,4	—	A
α -Ser'	d	56,9	57,0	145,5	A
α -Ser	d	56,9	57,1	145,4	A
α -Ser	d	56,9	57,1	145,5	A
β -Ser'	t	62,0	61,8	143,5	A, B
β -Ser	t	62,2	62,2	143,5	A, B
β -Ser	t	62,2	62,2	143,5	A, B
CO-allo-Thr	s	172,0	172,1	—	A, C
α -allo-Thr	d	60,1	60,1	141,1	A, B

¹³ C-Atom	Mult ^c	Pyoverdine			Zuordnung ^d
		Pp 1	Pp 2	³ J(C,H) ^e	
β-allo-Thr	d	68,2	68,2	150,0	A, B
γ-allo-Thr	q	19,3	19,3	127,1	A, B
CO-Thr ^f	s	173,3	173,4	—	A
α-Thr	d	60,1	60,2	141,0	A, B
β-Thr	d	68,5	68,5	150,0	A, B
γ-Thr	q	19,8	19,8	127,2	A, B

^a Chemische Verschiebung δ [ppm] relativ zu TMS; DSS als innerer Standard; $\text{CH}_3(\text{DSS}) = -1,61$ ppm. Bezeichnungen: Chr = Chromophor; Acyl = Bernstein-säure(amid).

^b 0,1 M Phosphatpuffer.

^c Multiplicität bestimmt durch DEPT.

^d Zuordnung über A: Vergleich mit Literaturdaten B: C,H-COSY; C: H,C-long-range-COSY; D: Modifizierung von (OH)Orn; E: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung; F: Heteronukleare Doppelresonanz.

^e C,H-Kopplung ermittelt aus dem gated-decoupled-¹³C-NMR.

^f Zuordnung unsicher.

ve Umwandlung von Dihydro-Chr in Chr in wäßriger Lösung pH 7) und **2** in **1** (Hydrolyse des Bernsteinsäureamids in die Säure in wäßriger Lösung pH 7) bewiesen. Abbildung 1 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum von Pp 1 bei pH 6,9. Die allgemeinen NMR-Untersuchungen sind in Tab. II–IV zusammengefaßt. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Doppelresonanzexperimente, H,H,-COSY, C,H-COSY, inverses H,C-long-range-COSY sowie anhand der pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung.

Die strukturellen Aussagen dieser Daten sind mit den bisher entwickelten Vorstellungen (Aminosäurezusammensetzung, Natur des Chromophors bzw. der Acylseitenkette) in allen Punkten im Einklang.

Die Hydroxamsäure wird durch 1-Hydroxy-3-amino-piperidon (c(OH)Orn) aufgebaut. Der Ring entsteht, indem die Hydroxylaminofunktion von (OH)Orn mit der α -Carboxylgruppe derselben Aminosäure kondensiert. Ein Hinweis auf die cyclische Struktur von (OH)Orn ist das ¹³C-NMR-Signal bei 167,7 ppm der Carbonylfunktion des Piperidonringes [4]. Im Vergleich zu Pyoverdinen, in denen (OH)Orn N⁵-formyliert oder N⁵-acetyliert vorliegt, ist das Signal deutlich zu höherem Feld verschoben [2, 5]. Das Vorliegen von c(OH)Orn wurde des weiteren durch chemische Untersuchungen nachgewiesen: Durch Reduktion von Pp 1 mit TiCl_3 wurde im Molekül 1-Hydroxy-3-amino-piperidon zu 3-Amino-piperidon (cOrn) umgewandelt (Desoxy-Pp 1; $[\text{MH}]^+$: *m/z* 1390). Die durch Reduktion der Hydroxamsäure entstandene Amidbindung ist nunmehr weniger hydrolyseempfindlich als die Peptidbindungen im Molekül. Daher ließ sich nach Partialhydrolyse von Desoxy-Pp 1 (6 N HCl/80 °C/10 min) und anschließender Dansylierung des Hydrolysats in guten Ausbeuten 3-Dansylaminopiperidon isolieren und identifizieren (RP-HPLC: Koinjektion eines authentischen Standards; PI-FABMS: $[\text{MH}]^+$ mit *m/z* 348). Das Vorliegen dieses Chelatliganden legt gleichzeitig die C-terminale Struktur der Peptidkette in Form von 3-Amino-1-hydroxy-piperidon fest.

Strukturaufklärung

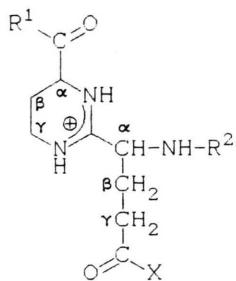
Chelatisierende Gruppen

Die Catecholseinheit von **1** und **2** ist durch die Untersuchungen am Chr mit beschrieben worden. **3** enthält den Dihydro-Chr, der aufgrund der Übereinstimmung der NMR-chemischen Verschiebungen mit den Literaturdaten von Pseudobactin A [8] und Pyoverdin (**4**) von *P. fluorescens* „E2“ [6] bestätigt werden konnte.

Die α -Hydroxycarboxylgruppe wird durch den peptidischen Einbau von L-threo-(OH)Asp in die Peptidkette (vgl. A. Einbaumodus der Aminosäuren) gebildet.

Primärstruktur des Peptidbereiches

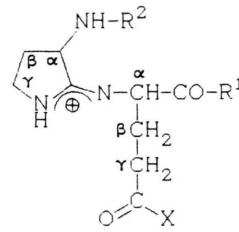
Die vollständige Charakterisierung des Peptidbereiches erfolgt in vier Abschnitten.



A : R^1 , R^2 = Fortsetzung der Peptidkette

$X = NH_2$

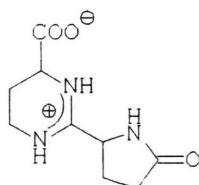
A': $R^1 = OH$; $R^2 = H$; $X = OH$



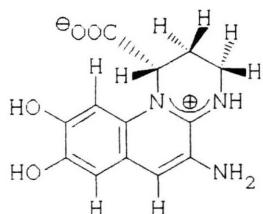
B : R^1 , R^2 = Fortsetzung der Peptidkette

$X = NH_2$

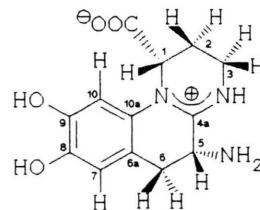
B': $R^1 = OH$; $R^2 = H$; $X = OH$



A''



4



5

A. Einbaumodus der polyfunktionellen Aminosäuren

Der Peptidbereich enthält ausschließlich polyfunktionelle Aminosäuren. Um den Einbaumodus der Aminosäuren festzulegen, muß daher bestimmt werden, welche der funktionellen Gruppen ungebunden vorliegen.

– Aminofunktionen: Sie wurden durch Dansylierung von Ferri-Pp1, anschließender Totalhydrolyse mit HCl und Identifizierung der dansylierten Aminosäuren mit RP-HPLC nachgewiesen. Die Derivatisierung mit Dansylchlorid wurde in Acetonitril/Lithiumcarbonat-Puffer durchgeführt

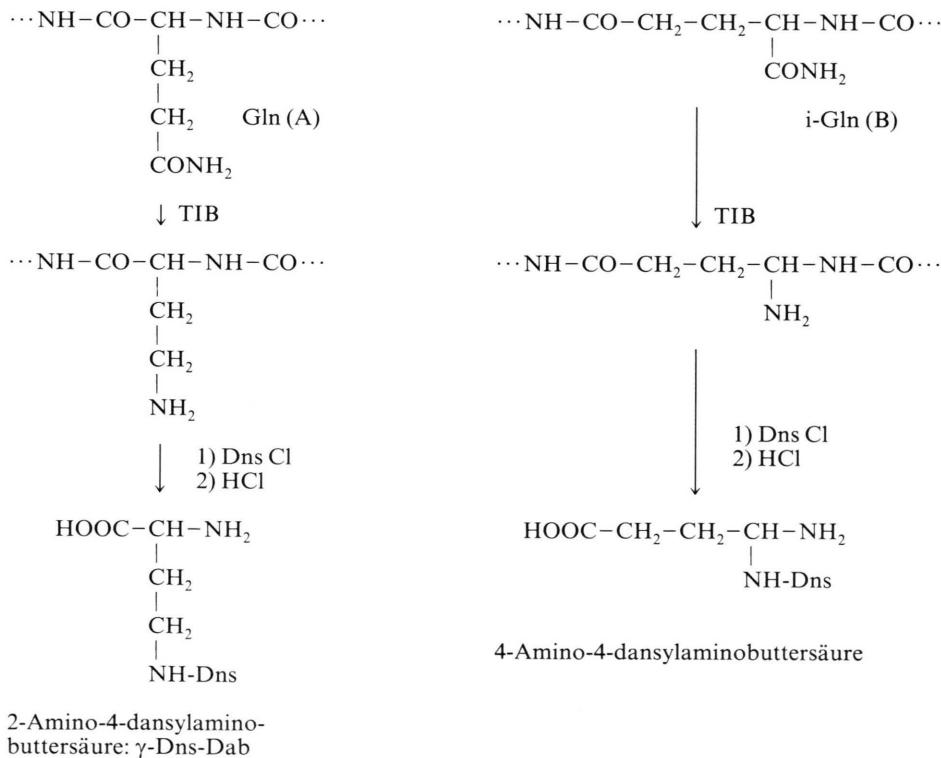
[20]. Durch Einsatz des Ferri-Komplexes – in dem die Hydroxamatgruppe sowie die Hydroxylgruppen des Chromophors durch das Zentralmetall geschützt sind – wird eine eventuelle Dansylierung dieser Gruppen vermieden [18]. Als einzige Dansyl-Aminosäure konnte δ -Dns-Orn nachgewiesen werden.

– Hydroxylgruppen: Da die IR-Spektren von **1**, **2** und **3** keine Esterbanden enthalten, liegen die Hydroxylgruppen von Ser, Thr, allo-Thr und (OH)Asp nicht esterartig verknüpft vor. Aus den chemischen Verschiebungen der β -CH₂-Resonanzen von Ser, Thr und allo-Thr geht ebenfalls ein-

deutig hervor, daß keine Veresterung der Hydroxylgruppen dieser Aminosäuren vorliegt (Ser [1], Thr [1], allo-Thr [6]).

– Carboxylgruppen: Die pH-abhängigen ^1H -NMR-Messungen zeigen, daß die β -Carboxylgruppe von β -(OH)Asp frei vorliegt. Die Protonierung der β -Carboxylgruppe führt zu einer Tieffeldverschiebung der β -CH-Resonanz um $\Delta\delta = 0,35$ ppm (Pp 1 bei pH 6,9: 4,47 ppm; pH 3,0: 4,60 ppm; pH 1,0: 4,82 ppm). Die α -Protonenresonanz wird im gleichen Bereich nur um $\Delta\delta = 0,01$ ppm verschoben [4, 6].

– Primär-Amide: Für das Vorliegen von Gln spricht die pH-unabhängige (i. U. zu Glu) ^{13}C -Resonanz der γ -CO-Gruppe bei 178,0 ppm. Eine eindeutige Zuordnung der γ -CO-Resonanz erfolgte mit Hilfe einer inversen (H,C)-long-range-Korrelation, die auf ^{2}J - und ^{3}J -Kopplungen fokussiert wurde; dabei konnte die Kopplung zwischen den β - und γ -Glutaminprotonen und dem Carbonylkohlenstoff der γ -Amidfunktion beobachtet werden. Durch Anwendung einer Variante des Hofmann-Abbaus kann auf chemischem Wege zwischen Gln (A) und iso-Gln (B) unterschieden werden [4, 21]:



Bei der Umsetzung des Pyoverdins mit dem Reagenz (I,I-(Bis(trifluoracetoxy)iod)benzol (TIB) erfolgt der Abbau der Amidgruppe zum Amin selektiv (Peptidbindungen werden nicht angegriffen). Enthalten die Pyoverdine Gln (A), so führt der Abbau und die anschließende Totalhydrolyse zu 2,4-Diaminobuttersäure, bei iso-Gln (B) zu 4,4-Diaminobuttersäure (nur als Dansylderivat stabil), die sich in 4-Oxobuttersäure umwandelt. Wird vor der Hydrolyse dansyliert, können die Endprodukte durch RP-HPLC (Koinjektion authentischer Proben) voneinander unterschieden werden. Die Analyse von **1** (und **2**) ergab neben δ -Dns-Orn (s. o.) und β -Dns-Ala (Abbau der Acylseitenkette) 2-Amino-4-dansylaminobuttersäure und keine 4-Amino-4-dansylaminobuttersäure.

B. Peptidsequenz

Die C- und N-Termini sind, wie oben ausgeführt, blockiert. Durch selektive hydrolytische Spaltung und anschließende Hydrierung ließe sich zwar aus $c(OH)Orn$ am C-Terminus Orn erzeugen, die C-terminalen Abbaumethoden versagen jedoch bei dieser Aminosäure [17]. Der enzymati-

Tab. V. Sequenzionen in PI-FAB-Massenspekten von Pyoverdin Pp 1.

Aminosäure Rest	n	N-terminale Fragmente (<i>m/z</i>)			n	C-terminale Fragmente (<i>m/z</i>)		
		A _n	B _n	C _{n+2}		X _n	Y _{n+2}	Z _{n+2}
Ser	1	417	445	—	10	1075	1049	—
Thr	2	518	546	563	9	—	962	947
Ser	3	—	633	650	8	—	—	846
Orn	4	—	—	—	7	759	—	—
OHAsp	5	—	—	—	6	686	660	—
Gln	6	—	—	—	5	—	—	—
Dab	7	1060	1088	—	4	—	—	—
	8	—	—	—	3	—	—	—
allo-Thr	9	—	—	—	2	—	—	—
cOHOrn	10	—	—	—	1	—	—	—

sche Abbau kann wegen der Präsenz von D-konfigurierten Aminosäuren nicht angewendet werden.

a) Das PI-FAB-Massenspektrum von **1** enthält neben dem Quasi-Molekülion und dem retro-Diels-Alder-Fragmention weitere Fragmentionen, die Informationen über die Sequenz der Peptidkette liefern (s. Tab. V). Der Tabelle ist zu entnehmen, daß C- und N-terminale Sequenzionen in gleichem Maße auftreten. In der Literatur wird von starker Dominanz der N-terminalen Fragmente bedingt durch bevorzugte Stabilisierung der Ladung im Chr berichtet [1]. Das hiervon abweichende Fragmentierungsverhalten von **1** ist plausibel: Die Komponenten **1**, **2** und **3** enthalten im mittleren Peptidbereich eine cyclische Substruktur mit einer stark basischen Amidingruppe (s. Abschnitt D), die die positive Ladung ebenfalls stabilisiert. **1**, **2** und **3** fragmentieren analog. Die N-terminalen Fragmente der drei Komponenten weisen aufgrund der bekannten Massenunterschiede im Chr bzw. in der Acylseitenkette unterschiedliche Massen auf, während die C-terminalen Fragmente in allen Komponenten identisch sind. Dies erlaubt eine Unterscheidung der C- und N-terminalen Sequenzionen. Eine Reduktion des C-terminalen c(OH)Orn führt zu Massenverschiebungen der C-terminalen Fragmente um 16 u und ermöglicht ihre Identifizierung. Wegen der geringen Intensität der entsprechenden Ionen bedarf die Ableitung der Sequenz zusätzlicher Absicherung.

b) Die Verbindung **1** wurde partiell hydrolysiert. Wie die FAB/MS-Analyse der Hydrolysatgemische ergab, enthielt das unter den Bedingungen 6 N HCl/90 °C/10 min entstandene Gemisch die meisten Sequenzinformationen (s. Tab. VI). Aus diesem Hydrolysat wurden folgende Chromophor-

peptide isoliert und der Aminosäurenanalyse unterworfen: Chr-Ser, Chr-Ser-Thr, Chr-Ser-Thr-Ser, Chr-Ser-Thr-Ser-Orn, Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp.

c) Desoxy-Pp 1 wurde unter denselben Bedingungen (s.o.) partiell hydrolysiert. Die anschließende Dansylierung der frei gewordenen Aminogruppen im Hydrolysat erlaubte bevorzugt eine Isolierung der C-terminalen Peptidbruchstücke (Dns-Ser)-allo-Thr-cOrn und (Dns-allo-Thr)-cOrn, die durch Dansyl-Endgruppenanalyse bzw. -Aminosäurenanalyse [20] charakterisiert wurden. Es konnten keine Fragmente, die unter Bindungsbruch von Gln und Dab entstehen würden, beobachtet werden. Die Bildung des dansylierten Kondensationsproduktes [Glu + Dab]^{*} wurde nicht registriert.

C. Konfiguration der Aminosäuren in der Sequenz

Die Aminosäuren Ser und Thr kommen im Molekül in unterschiedlichen Konfigurationen vor. Die Positionsbestimmung im Peptid konnte durch Isolierung und Untersuchung geeigneter Bruchstücke durchgeführt werden:

1) Thr/allo-Thr: Durch Dansyl-Aminosäurenanalyse des Chromophorpeptids Chr-Ser-Thr konnte die Position von Thr bestimmt werden. Indirekt folgt daraus, daß allo-Thr im C-terminalen Peptidteil vorliegt.

2) 1 D-Ser/2 L-Ser: Die chromophorhaltigen Bruchstücke Chr-L-Ser und Chr-L-Ser-L-Thr-D-Ser wurden nach Totalhydrolyse und TAP-Derivatisierung der Aminosäuren auf Chirasil-L-Val charakterisiert. Indirekt kann aus dieser Bestimmung abgeleitet werden, daß das C-terminale Ser L-konfiguriert ist.

Tab. VI. PI-FABMS-Analyse von Partialhydrolysaten^a des Pyoverdins Pp 1.

[MH] ⁺ m/z	Chromophorpeptide
1425	Suc-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser-Thr-(OH)Orn
1325	Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser-Thr-(OH)Orn
1407	Sim-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser-Thr-(OH)Orn
1195	Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser-Thr
1194	Suc-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser
1176	Sim-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser
1094	Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser
1107	Suc-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]
1089	Sim-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]
1007	Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]
896	Suc-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp
878	Sim-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp
796	Chr-Ser-Thr-Ser-Orn-(OH)Asp
765	Suc-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn
747	Sim-Chr-Ser-Thr-Ser-Orn
665	Chr-Ser-Thr-Ser-Orn
651	Suc-Chr-Ser-Thr-Ser
633	Sim-Chr-Ser-Thr-Ser
551	Chr-Ser-Thr-Ser
564	Suc-Chr-Ser-Thr
546	Sim-Chr-Ser-Thr
464	Chr-Ser-Thr
463	Suc-Chr-Ser
445	Sim-Chr-Ser
363	Chr-Ser

[MH] ⁺ m/z	Oligopeptide
679	(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser-Thr-(OH)Orn
475	Orn-(OH)Asp-[Glu+Dab-18]
448	(OH)Asp-[Glu+Dab-18]-Ser
361 ^{a, b}	(OH)Asp-[Glu+Dab-18]
337	Ser-Thr-(OH)Orn
321	Thr-Ser-Orn
250	Thr-(OH)Orn
230 ^c	[Glu+Dab-18]

Thr = allo-Threonin oder Threonin; Sim = Succinimid; Suc = Bernsteinsäure.

^a 10 min, 90 °C, 6 N HCl.

^b 2 h, 80 °C, 6 N HCl.

^c 12 h, 80 °C, 6 N HCl.

D. Das Kondensationsprodukt [Gln + Dab]*

Die Korrelation des Molgewichts und der Aminosäurenzusammensetzung ergibt, daß der Peptidbereich außer c(OH)Orn zusätzlich eine durch zweifache Kondensation von Gln und Dab entstandene cyclische Substruktur [Gln + Dab]* entält. Dieser Cyclus wird langsamer hydrolytisch aufgespalten als die sonstigen Peptidbindungen.

Die Ergebnisse der ¹³C-NMR- (s. Tab. III und IV: 164,7 ppm für den Amidinkohlenstoff) und der ¹⁵N-NMR-Spektroskopie (¹⁵N-angereicherte Probe von **1** in DMSO-d₆: -263,1 ppm/-266,3 ppm relativ Nitromethan für die Amidinstickstoffe mit |J_{NH}| = 95 Hz) weisen auf eine zweite Amidingrup-

pe (neben der des Chr) hin, die dem Kondensationsprodukt zugeordnet werden kann. Die Einbaumodi der Aminosäuren zeigen, daß die γ -Amidfunktion von Gln frei vorliegt, während die beiden Aminogruppen von Dab gebunden sind. Je nach Sequenz -Gln-Dab- oder -Dab-Gln- lassen sich zwei Strukturen **A** und **B** angeben.

Die nun folgenden Untersuchungen dienten der Entscheidung zwischen beiden Alternativen:

Inverse (H,C)-long-range-Korrelation

Durch homonukleare Doppelresonanz-Experimente ließen sich die Spinsysteme von Dab (>CH-CH₂-CH₂-) und Gln (>CH-CH₂-

CH_2-) festlegen ($^1\text{H-NMR}$ s. Tab. II). Es wurden zwei inverse H,C -long-range-Korrelationen durchgeführt, die auf $J_{\text{CH}} = 4$ Hz bzw. 8 Hz optimiert wurden. Dabei wurden zwei $^3J_{\text{C},\text{H}}$ -Kopplungen (Kopplung zwischen den β -Dab-Protonen und dem Carbonylkohlenstoff bei 172,5 ppm sowie zwischen den β -Gln-Protonen und dem Amidinkohlenstoff bei 164,7 ppm detektiert, die nur in Struktur A vorkommen können.

Isolierung des Kondensationsproduktes

Für das nach der Partialhydrolyse des Pyoverdins isolierte Kondensationsprodukt $[\text{Glu} + \text{Dab}]^*$ (Gln wird zu Glu hydrolysiert) könnte ausgehend von den Alternativen A und B Struktur A' oder B' formuliert werden. Die FABMS-Untersuchungen der Partialhydrolysate zeigten, daß sich durch spezielle Hydrolysebedingungen (6 n $\text{HCl}/80^\circ\text{C}/12$ h) die Bildung des Kondensationsproduktes mit der Masse m/z 230 und einer um 18 u leichteren Begleitkomponente ($[\text{MH}]^+$ mit m/z 212) optimieren läßt. Die Reinigungsprozedur und im besonderen die Ionenaustauschchromatographie bewirkten eine vollständige Umwandlung des Kondensationsproduktes zugunsten der leichteren Komponente. Schreibt man dem Kondensationsprodukt Struktur A' zu, läßt sich daraus durch Pyroglutamylbildung die Struktur A'' ($[\text{pGlu} + \text{Dab}]^*$) generieren. Über die Bildung von Pyroglutaminsäure aus N-terminaler Glutaminsäure (oder Glutamin) während der Ionenaustauschchromatographie wird in der Literatur berichtet [22].

Auch die zuvor beschriebene Beobachtung, nämlich das Fehlen des dansylierten Kondensationsproduktes bei der Isolierung dansylierter Peptidbruchstücke, läßt sich nun erklären. Die der Dansylierung vorausgehende pH-Wert-Änderung (Lithiumcarbonat/Puffer pH 9,5) bewirkt, daß durch Pyroglutamylbildung keine freie Aminogruppe mehr zur Derivatisierung zur Verfügung steht. Die Isolierung von A'' erfolgte durch Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie.

Aus der Massenfeinbestimmung von A'' (PI-FAB/MS: 212,10357) wurde die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$ abgeleitet. Die Fragmentierung von m/z 212 nach Kollisionsaktivierung (FAB-Tandem-MS-Analyse des Hydrolysats) sowie die Fragmente im EI-Massenspektrum von A'' ($\text{M}^+ \cdot : m/z$ 211) zeigen Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsverhalten von Tetrahydropyrimidin-

Derivaten (charakteristisches Fragment m/z 83) [16, 23] sowie pyroglutamylhaltigen Peptiden (charakteristisches Fragment m/z 84) [24].

Die Lage der $^1\text{H-NMR}$ -Signale lassen sich mit den Literaturdaten für Tetrahydropyrimidin-Derivate [2, 16, 25] korrelieren; Tab. VII zeigt im Vergleich die Daten von $[\text{pGlu} + \text{Dab}]^*$ und dem Tetrahydropyrimidin-Derivat Ectoin. Die Spinsysteme innerhalb der beiden Ringe wurden durch homonukleare Doppelresonanzexperimente ermittelt. Auffällig ist die Tieffeldlage des Methin- und β -Methylenprotonen der Pyroglutamyleinheit. Die Tieffeldverschiebung des Methinprotons ist auf einen entschirmenden Einfluß der direkt benachbarten protonierten Amidingruppe zurückzuführen. Die Betrachtung des Molekülmodells verdeutlicht weiterhin, daß ein β -Gln-Proton unmittelbar in den Einflußbereich der Amidingruppe gerät und besonders stark entschirmt wird.

Die Ergebnisse der $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie sind in Tab. VIII mit den Daten von Ectoin [16, 26–28] zusammengefaßt. Die Zuordnung der quartären Kohlenstoffe basiert auf Literaturdaten des Ferribactin-Chromophors [25] und der Tetrahydropyrimidin-Substruktur (bestehend aus Ser und Dab) der Pyoverdine Pa-I und Pa-II [2, 16]. Die Zuordnung der protonentragenden Kohlenstoffe erfolgte durch heteronukleare Doppelresonanzexperimente. Die $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten wurden aus den gated-decoupled $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren ermittelt.

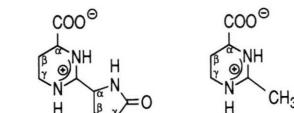
Tab. VII. $^1\text{H-NMR}$ -Daten^a von $[\text{pGlu} + \text{Dab}]^*$ und Ectoin.

Proton:	δ [ppm]	Proton:	δ [ppm]
α -Dab	4,24		4,09
β -Dab	2,27		2,11
γ -Dab	3,43/3,62		3,29/3,44
α -pGlu	4,81 ^b	$-\text{CH}_3$	2,20
β -pGlu	2,34/2,82		
γ -pGlu	2,61		

^a δ [ppm] relativ TMS; Ectoin [2, 16].

Zuordnung: homonukleare Doppelresonanz, Literaturvergleich.

^b Bei 5 °C ermittelt.



Tab. VIII. ^{13}C -NMR-Daten^a von [pGlu+Dab]* im Vergleich zu den Daten von Ectoin.

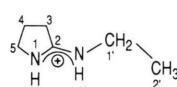
Kohlenstoff	Mult ^b	[pGlu+Dab]* δ [ppm]	$^{1}\text{J}_{\text{C},\text{H}}$	Ectoin δ [ppm]	$^{1}\text{J}_{\text{C},\text{H}}$ [Hz]
CO-Dab	—	177,2	—	177,4	—
α -Dab	d	54,2	146	53,9	145
β -Dab	t	22,5	136	22,3	134
γ -Dab	t	38,2	143	38,2	143
NH-C=N	—	164,6	—	161,6	—
α -pGlu	d	55,6	152		
β -pGlu	t	27,2	137		
γ -pGlu	t	30,0	133		
γ CO-pGlu	—	183,5	—		
$-\text{CH}_3$	q			19,2	132

^a δ relativ TMS; [pGlu+Dab]* in D_2O , Ectoin in D_2O bei pH 3 vermessen.
Zuordnungsmethoden: Vergleich mit Literaturdaten, heteronukleare Doppelresonanz.

^b Multiplizität durch gated-decoupled- ^{13}C -NMR.

Tab. IX. NMR-Daten* von 2-Ethylamino- Δ^1 -pyrrolin in D_2O .

	δ (^1H)	δ (^{13}C)	$^{1}\text{J}_{\text{C},\text{H}}$
C-2	—	171,2	—
C-3	2,55	32,9	130
C-4	1,99	23,3	130
C-5	3,52	53,5	139
C-1'	3,19	38,7	138
C-2'	1,15	14,6	127



* δ in ppm, relativ TMS; J in Hz.

Die ^{13}C -Resonanzen des Pyroglutamylrestes zeigen weitgehende Übereinstimmung für diesen Rest in einem Thyrotropin-release-Faktor-Derivat (in D_2O ; α -pGlu: 56,6 ppm; β -pGlu: 25,03 ppm; γ -pGlu: 29,0 ppm; γ CO-pGlu: 182,2 ppm) [29].

Alle NMR-Daten weisen ausnahmslos auf die Struktur eines Tetrahydropyrimidins mit Pyroglutamyleinheit hin, während die Daten eines als Analogstruktur zu B synthetisierten Pyrrolidin-Derivates (s. Tab. IX) – im besonderen die $^{1}\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten – deutliche Unterschiede zeigen.

Aus dem isolierten Kondensationsprodukt A'', 3,4,5,6-Tetrahydro-2-pyroglutamyl-pyrimidin-4-carbonsäure, lässt sich die Struktur der Tetrahydropyrimidin-Einheit der Peptidkette als 3,4,5,6-Tetrahydro-2-glutamyl-pyrimidin-4-carbonsäure ableiten. In jüngster Zeit wurden vermehrt Tetrahydropyrimidin-Substrukturen von Dab mit einer zweiten Aminosäure als Bestandteil von Si-

derophoren beschrieben (Ser [2, 30], (OH)Orn [31], Tyr [25]), darunter biogenetische Vorläufer des Pyoverdins-Chromophors. Kürzlich wurde eine weitere Pyoverdin-Struktur publiziert, die ebenfalls eine Tetrahydropyrimidin-Substruktur aus Gln und Dab enthält [32]. Die Autoren postulieren für die Substruktur die Alternative A, ohne weitere Strukturen analog B zu berücksichtigen. Die Strukturuntersuchung stützt sich lediglich auf ^1H -Resonanzen für α -peptidisch gebundene Dab sowie auf die bei anderen Tetrahydropyrimidin-Strukturen beobachtete ^{13}C -Resonanz für den Amidinkohlenstoff.

Eine eindeutige Unterscheidung konnte im vorliegenden Fall jedoch erst durch ein inverses H,C-Korrelations-Experiment sowie durch die die Charakterisierung des isolierten Tetrahydropyrimidin-Derivates [pGlu + Dab]* getroffen werden.

Damit konnte der Peptidbereich der Pyoverdine von *P. putida* vollständig in seiner Struktur aufge-

klärt werden. Nach der Kurzschreibweise [1, 4] sind **1**, **2** und **3** folgendermaßen zu benennen:

Pyoverdin-Q-STsOD'q*B*StO'*-SUCA (**1**)

bzw. SUC (**2**) und

Pyoverdin-QH-STsOD'q*B*STO'*-SUC (**3**).

Experimenteller Teil

Massenspektrometrie

GC/MS: Kratos MS 25 F mit Carlo Erba HRGC MF6 500 (Kapillarsäule SE-54); EI: Varian MAT 212; FABMS: HSQ 30, Finnigan MAT (Bremen), ausgerüstet mit einer FAB-Kanone der Fa. Ion-Tech LTD (Teddington, GB) und Varian MAT 731 (FAB-Kanone: s. HSQ 30), FAB-Gas: Xe. Als Matrices wurden Thioglycerin oder Glycerin/Milchsäure verwendet.

Gaschromatographie

HRGC 4160 Gerät von Carlo Erba mit einem FID-Detektor und Integrator Shimadzu Chromatopac C-R3A; Silica-Kapillarsäulen: SE 52 (Länge 25 m; ID 0,32 mm; Filmdicke 0,25 µm; Chrompack), Chirasil-L-Val (Länge 25 m; ID 0,22 mm; Filmdicke 0,11 µm; Chrompack); Trägergas: He.

UV/VIS-Spektroskopie

Perkin-Elmer Hitachi 200; IR-Spektroskopie: IR-Spectrophotometer 283 (Perkin-Elmer); CD-Spektroskopie: Dichtograph Mark III (ISA).

NMR-Spektroskopie

Bruker AM 300 (^1H -, ^{13}C -NMR); Bruker AMX 500 (^1H , ^1H - bzw. ^{13}C , ^1H -COSY); Bruker AMX 400 (^1H , ^{13}C -COSY); Ausführung der Messungen in 0,5 ml D_2O -Puffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 6,9 bzw. pH 3,0); ^1H -NMR: 10–20 mg und ^{13}C -NMR: 20–60 mg **1**, **2** oder **3** in der Chlorid-Form. Für die 2D-NMR-Experimente wurden 20 mg **1** (H,H -COSY), 80 mg **1** (C,H -COSY bzw. H,C -long-range-COSY) in 0,5 ml D_2O gelöst (ca. pH 4,5). Parameter der 2D-Experimente: H,H -COSY (Bruker AMX 500): TD 1 = 128, TD 2 = 2048, NS = 16, SI 1 = 1024, SI 2 = 1024; C,H -COSY (Bruker AMX 500): TD 1 = 128, TD 2 = 2048, NS = 128, SI 1 = 1024, SI 2 = 1024. Inverse H,C -long-range-COSY (Bruker AMX 400): delay (D_2)

auf $J_{\text{H},\text{C}} = 4$ Hz ($\text{D}_2 = 125$ ms) bzw. 8 Hz ($\text{D}_2 = 62,5$ ms) fokussiert [33]; TD 1 = 128, TD 2 = 4096, NS = 128, SI 1 = 1024, SI 2 = 2048 ($\text{D}_2 = 62,5$ ms) bzw. 4096 ($\text{D}_2 = 125$ ms). DSS mit $\delta(^1\text{H}) = 0,00$ ppm bzw. $\delta(^{13}\text{C}) = -1,61$ ppm als interner Standard. HPLC: Analytisches Gradienten-System der Fa. Knauer (Bad Homburg): 2 HPLC-Pumpen vom Typ 64.00, Gradientenprogrammer 50 B, dynamische Mischkammer, Hochtemperaturofen; Spektralphotometer 87.00 sowie präparativ-isokratisches System: Präparative HPLC-Pumpe 8805 und Spektralphotometer von DuPont; HPLC-Materialien von Machery & Nagel: Nucleosil 100-C18 (7 µ), Polygosil 60-C18 (25–40 µ). Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgten mit der Chromstar-Software der Fa. Bruker-Franzen Analytik (Karlsruhe).

Herkunft von *Pseudomonas putida*

Der Bakterienstamm *Pseudomonas putida* wurde von Dr. H. Korth (Hygiene-Institut der Universität zu Köln) isoliert und von Dipl.-Ing. agr. H. Willems (Institut für Pflanzenpathologie der Universität zu Göttingen) aufgrund morphologischer und phänotypischer Merkmale taxonomisch eingeordnet.

Bakterienzucht

Die Anzucht erfolgte 3–4 Tage in 3-l-Fermentern. Das Nährmedium enthielt 10,0 g Glucose, 2,0 g Glutaminsäure, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 4,0 g KH_2PO_4 pro Liter. Der pH-Wert wurde zwischen 7,0 und 8,0 gehalten.

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 und Auf trennung der Dansyl-derivate erfolgte nach bereits beschriebenen Verfahren [1, 4, 17, 18].

Isolierung von [$p\text{Glu} + \text{Dab}$]*

80 mg eines Gemisches aus **1**, **2** und **3** wurden in 50 ml 6 N HCl gelöst und in einem 100 ml Bombenrohr (aus Duranglas mit Teflon-beschichteter Schraubkappe) 12 h bei 80 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 20 ml Wasser aufgenommen und

portionsweise auf Sep-Pak RP-18 Kartuschen aufgetragen, um die chromophorhaltigen Pyoverdinbruchstücke abzutrennen. Der Durchlauf wurde durch Gelfiltration an Bio-Gel P2 (Gelbett: 2,6 × 90 cm) mit 0,1 N Essigsäure chromatographiert (Flußrate: 30 ml/h; Detektion: 214 nm, 280 nm). Die erste Fraktion enthielt das Kondensationsprodukt sowie die Aminosäuren der Pyoverdine. Zur weiteren Anreicherung des Kondensationsproduktes wurde diese Fraktion auf Sephadex G 10 chromatographiert (Gelbett: 2,6 × 60 cm; Laufmittel: 0,05 N; Flußrate: 25 ml/h; Detektion: 214 nm). [pGlu + Dab]* konnte durch Ionenaustausch-Chromatographie (CM-Sephadex G 25: Gelbett: 2,6 × 20 cm; 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5 mit Puffergradienten: 0–0,5 M NaCl als Pufferzusatz in 5 h; Flußrate 70 ml/h; Detektion:

214 nm) isoliert werden. Die Entsalzung erfolgte mit RP-HPLC (Säule: Nucleosil 100 C18; Laufmittel: Wasser; Detektion: 220 nm; Flow: 0,8 ml/min).

Dank

Wir möchten Herrn Prof. Dr. H. Budzikiewicz für die Förderung der vorliegenden Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. B. Diehl (Fa. Spektral-service, Köln) und Herrn Dr. D. Wendisch (Bayer AG, Leverkusen) für die 2D-NMR-Messungen sowie Herrn Prof. Dr. G. Snatzke † (Institut für Strukturchemie der Universität Bochum) für die CD-Messungen bestens danken.

- [1] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, Liebigs Ann. Chem. **1989**, 375.
- [2] S. Gipp, J. Hahn, K. Taraz und H. Budzikiewicz, Z. Naturforsch. **46c**, 534 (1991).
- [3] K. Poppe, K. Taraz und H. Budzikiewicz, Tetrahedron **43**, 2261 (1987).
- [4] G. Mohn, K. Taraz und H. Budzikiewicz, Z. Naturforsch. **45b**, 1437 (1990).
- [5] K. Geisen, K. Taraz und H. Budzikiewicz, Monatsh. Chem. **123**, 151 (1992).
- [6] K. Taraz, D. Seinsche und H. Budzikiewicz, Z. Naturforsch. **46c**, 522 (1991).
- [7] M. Teintze, M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong und D. van der Helm, Biochemistry **20**, 6446 (1981).
- [8] M. Teintze und J. Leong, Biochemistry **20**, 6457 (1981).
- [9] C. Yang und J. Leong, Biochemistry **23**, 3534 (1984).
- [10] M. Persmark, T. Frejd und B. Mattiasson, Biochemistry **29**, 7348 (1990).
- [11] J. S. Buyer, J. M. Wright und J. Leong, Biochemistry **25**, 5492 (1978).
- [12] J. M. Meyer und M. A. Abdallah, J. Gen. Microbiol. **107**, 319 (1978).
- [13] W. Keller-Schierlein und A. Deer, Helv. Chim. Acta **46**, 1907 (1963).
- [14] K. R. Leimer, R. H. Rice und C. W. Gehrke, J. Chromatogr. **141**, 121 (1977).
- [15] V. Schurig, Angew. Chem. **96**, 733 (1984).
- [16] S. Gipp, Dissertation, Köln (1991).
- [17] G. Mohn, Dissertation, Köln (1990).
- [18] K. Geisen, Dissertation, Köln (1990).
- [19] J. Michels, Diplomarbeit, Köln (1989).
- [20] Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner und B. L. Karger, Anal. Biochem. **115**, 123 (1981).
- [21] A. S. Radhakrishna, M. E. Parham, R. M. Riggs und G. M. Loudon, J. Org. Chem. **44**, 1746 (1979).
- [22] T. Kasai und P. O. Larsen, Acta Chem. Scand. **B33**, 213 (1979).
- [23] D. J. Brown, in: The chemistry of Heterocyclic Compounds, Vol. **16/I**, S. 322ff., The Pyrimidines (A. Weissberger und E. C. Taylor, Hrsg.), Wiley, New York 1970.
- [24] C. Bogentoft, J.-K. Chang, H. Sievertsson, B. Currie und K. Folkers, Org. Mass Spectrom. **6**, 735 (1972).
- [25] K. Taraz, R. Tappe, H. Schröder, U. Hohlneicher, I. Gwose, H. Budzikiewicz, G. Mohn und J. F. Lefeuvre, Z. Naturforsch. **46c**, 527 (1991).
- [26] E. A. Galinski, H.-J. Pfeiffer und H. G. Trüper, Eur. J. Biochem. **149**, 135 (1985).
- [27] R. Regev, I. Peri, H. Gilboa und Y. Avi-Dor, Arch. Biochem. Biophys. **278**, 106 (1990).
- [28] W. Schuh, H. Puff, E. A. Galinski und H. G. Trüper, Z. Naturforsch. **40c**, 780 (1985).
- [29] H. Kalbacher, W. Voelter und M. Vajda, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **95**, 67 (1977).
- [30] P. Demange, A. Bateman, C. Mertz, A. Dell, Y. Piedmont und M. A. Abdallah, Biochemistry **29**, 11041 (1990).
- [31] R. Tappe, unveröffentlicht.
- [32] P. Demange, A. Bateman, J. K. Macleod, A. Dell und M. A. Abdallah, Tetrahedron Lett. **31**, 7611 (1990).
- [33] A. Bax und M. F. Summers, J. Am. Chem. Soc. **108**, 2093 (1986).