

Neue Siderophore des Pyoverdin-Typs aus *Pseudomonas fluorescens* [1]¹

Karl Geisen, Kambiz Taraz und Herbert Budzikiewicz*

Institut für Organische Chemie, Universität Köln, D-W-5000 Köln, Greinstraße 4,
Bundesrepublik Deutschland

New Pyoverdin Type Siderophores from *Pseudomonas fluorescens*

Summary. The structure of four new pyoverdins (Pf12-IA, -II A, -I B und II B) isolated from the culture medium of *Pseudomonas fluorescens* 12 was elucidated by combination of spectroscopic methods and degradation reactions. The pyoverdins comprise (1*S*)-5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1*H*-pyrimido[1,2-*a*]quinoline-1-carboxylic acid whose amino group carries a 3-carboxypropionyl- (I A), succinamoyl- (II A), 4-carboxy-4-oxobutanoyl- (I B) or L-4-amino-4-carboxybutanoyl-residue (II B) and whose carboxyl group is bound amidically to the N-terminus of D-Ser-L-Lys-Gly-L-(N⁵-CHO-N⁵-OH)Orn-D-Ser-L-Ser-Gly-L-Lys-D-(N⁵-CHO-N⁵-OH)Orn-L-Glu-L-Ser. According to the short-hand-nomenclature suggested in [2, 3] the pyoverdins may be described as pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-SUC (I A), pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-SUCA (II A), pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-KGL (I B) and pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-GLU (II B). The pyoverdins described here possess the most complex structure encountered so far as their peptide part comprises eleven amino acids and the cyclo-tetrapeptide substructure. In addition, they are of special interest as for the first time glutamic acid could be identified as a chromophore side chain which is the key compound for the citric acid cycle to which belong all dicarboxylic acids found so far in pyoverdins.

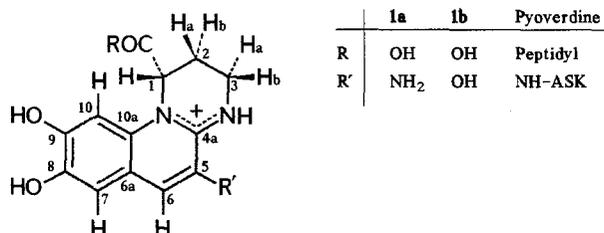
Keywords. Citric acid cycle; *Pseudomonas fluorescens*; Pyoverdins; Siderophores; Structure elucidation.

Einleitung

Eine Gruppe des Genus *Pseudomonas* (die sog. Fluoreszentengruppe) produziert unter Eisenmangel peptidische Siderophore, die als Pyoverdine oder gelegentlich auch als Pseudobactine bezeichnet werden. Sie enthalten (1*S*)-5-Amino-2,3-dihydro-

¹ Verwendete Abkürzungen: ASK = Acylseitenkette, Chr = Chromophor 1a, (HO)Chr = Chromophor 1b, Dns = Dansyl-Rest, DP = Dansylpeptid, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, FAB = Fast Atom Bombardment (PI = positive Ionen), (HO)Orn = N⁵-Hydroxyornithin, (CHO, HO)Orn = N⁵-Formyl-N⁵-hydroxyornithin, PITC = Phenylisothiocyanat, RP-HPLC = Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, Kgl = α -Ketoglutarsäure bzw. 4-Carboxy-4-oxobutanoyl-Rest, R_t = Retentionszeit, Suc = Bernsteinsäure bzw. 3-Carboxypropionyl-Rest, Suca = Succinamoyl-Rest, Suci = Succinimido-Rest, TAB = Trifluoracetyl-*n*-butylester, TEA = Triethylamin

8,9-dihydroxy-1*H*-pyrimido[1,2-*a*]-chinolin-1-carbonsäure (**1a**) oder ihr 5,6-Dihydroderivat als Chromophor. Der Chromophor ist über die Carboxylgruppe mit einem Peptid aus 6–12 Aminosäuren verbunden, dessen Struktur bei verschiedenen Species, Subspecies oder auch Stämmen unterschiedlich ist. Die Komplexierung des Eisens erfolgt über die Catecholatenheit des Chromophors und über zwei Hydroxamsäuren (aus N⁵-Acyl-N⁵-hydroxyornithin) bzw. einer Hydroxamsäure und der α -Hydroxycarbonsäure-Funktion der β -Hydroxyasparaginsäure. An die 5-Aminogruppe des Chromophors ist der Acylrest einer Dicarbonsäure oder deren Monoamid gebunden („Acylseitenkette“ = ASK). Bis heute wurden Bernsteinsäure (Suc), Bernsteinsäureamid (Suca), α -Ketoglutarinsäure (Kgl), Äpfelsäure und Äpfelsäureamid als ASK in Pyoverdinen nachgewiesen [4, 5]. Ein Stamm kann mehrere Pyoverdin-Komponenten mit gleichem Peptidteil, jedoch verschiedenen ASK produzieren. Häufig wird die Kombination Suc, Suca und Kgl gefunden [2, 6].



Bisher sind ca. 20 Pyoverdine mit unterschiedlichem Peptidteil beschrieben worden [4], doch nur in 10 Fällen wurde die Peptidstruktur durch spektroskopische (FABMS, 2D-NMR) und chemische (Edman-Abbau, Partialhydrolysen, Endgruppen- und Aminosäureanalysen von Bruchstücken) Methoden ermittelt [2, 3, 5–11]. Die fast immer auftretenden zyklischen Unterstrukturen des Peptids (C-terminales cyclo-N⁵-Hydroxyornithin oder seltener Zyklen aus mehreren Aminosäuren) lassen sich in der Regel durch FABMS allein nicht zweifelsfrei aufklären. Darüber hinaus können Aminosäuren sowohl *D*- als auch *L*-konfiguriert vorliegen. Die eindeutige Strukturaufklärung eines Pyoverdinpeptids erfordert daher eine spezielle chemische Sequenzierungstechnik (vgl. [2, 3]). Der Peptidteil ist von Bedeutung für die optimale Positionierung der drei Ligandengruppen zur Bindung des Fe³⁺-Ions sowie für die spezifische Erkennung des arteigenen Ferripyoverdins durch die Bakterienzelle [12]. Ein Schritt zum Verständnis dieser Funktionen ist daher ein Einblick in die Variabilität der Peptidstrukturen durch Aufklärung einer möglichst großen Zahl von Pyoverdinen. Die Bedeutung der unterschiedlichen ASK ist bisher noch ungeklärt.

In dieser Arbeit soll die vollständige Strukturaufklärung von vier Pyoverdinen, isoliert aus Kulturen von *Pseudomonas fluorescens* (Stamm 12), beschrieben werden: Pf 12-I A (**2**), Pf 12-II A (**3**), Pf 12-I B (**4**) und Pf 12-II b (**5**). Alle vier Pyoverdine enthalten das gleiche Peptid, das aus 11 Aminosäuren mit einem C-terminalen Cyclotetrapeptid besteht. Sie unterscheiden sich nur durch ihre Acylseitenketten: Suc (**2**), Suca (**3**), Kgl (**4**) und *L*-Glutaminsäure (**5**). Letztere ist eine neuartige ASK und wie Kgl über die γ -Carboxylgruppe mit dem Chromophor verbunden. Somit wurde zum ersten Mal die Ausgangsverbindung für den Zitronensäurezyklus nachgewiesen, dem alle bisher bei Pyoverdinen gefundenen Dicarbonsäuren angehören. Der relative Anteil der Komponenten **2–5** an der gesamten Pyoverdinproduktion

von *P. fluorescens* 12 hängt stark von den Wachstumsbedingungen ab, insbesondere von der Wachstumsdauer [13].

Ergebnisse und Diskussion

Isolierung der Pyoverdine

Die Pyoverdine **2–5** wurden in Form ihrer Fe^{3+} -Komplexe aus Eisenmangelkulturen von *P. fluorescens* 12 nach bereits beschriebener Methode durch Adsorption an XAD-4 isoliert [14]. Die Trennung der Komponenten erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie in 3 Schritten:

1. An DEAE-Cellulose mit wäßrigem Pyridiniumacetat-Puffer bei *pH* 5.0: Fraktion 1: Fe^{3+} -**3** und Fe^{3+} -**5**, Fraktion 2: Fe^{3+} -**2** und Fe^{3+} -**4**.

2. Auftrennung von Fraktion 1 an phosphorylierter Cellulose mit Pyridiniumformiatpuffer bei *pH* 3.0 in die Einzelkomponenten Fe^{3+} -**3** und Fe^{3+} -**5**.

3. Auftrennung von Fraktion 2 an DEAE-Sephadex mit Pyridiniumacetat-Puffer bei *pH* 4.0 in Fe^{3+} -**2** und Fe^{3+} -**4**.

Die Ferrikomplexe wurden mit 8-Hydroxychinolin [15] dekomplexiert und auf Bio-Gel P-2 gereinigt.

Charakterisierung

Die Reinheitskontrolle der Ferripyoverdine und Pyoverdine erfolgte durch HPLC an Polygosil 60-C18 (7 μ). Als Laufmittel für die Ferripyoverdine diente ein Natriumcitrat-Puffer (0.035 M, *pH* 5.0) mit 5% Acetonitril (R_f : Fe^{3+} -**5**: 6.6 min; Fe^{3+} -**2**: 8.4 min; Fe^{3+} -**3**: 11.1 min; Fe^{3+} -**4**: 13.1 min). Bei Verwendung eines Acetat-Puffers (*pH* 3–5) ist der Peak von Fe^{3+} -**4** aufgrund der Gleichgewichtsumwandlungen von Kgl (s. u.) sehr breit, beim angegebenen Citrat-Puffer jedoch scharf. Dieses HPLC-System war geeignet für das Verfolgen der Umwandlungsreaktionen von Fe^{3+} -**3**, **4** und **5** in **2** (s. u.). Die eisenfreien Pyoverdine wurden mit einem Laufmittelgemisch aus Ammoniumacetat-Puffer (0.02 M, *pH* 4.0) unter Zusatz von EDTA (1 mM) und 7% Acetonitril auf der RP-HPLC-Säule chromatographiert (R_f : **5**: 7.9 min; **4**: 12.4 min; **3**: 12.6 min; **2**: 14.0 min – sehr breiter Peak von **4**; Citrat hat bei **4** nicht den oben beschriebenen Effekt). Die Tabelle 1 enthält einige physikalische Daten der Pyoverdine und Ferripyoverdine.

Die UV/VIS-Spektren von **2–5** zeigen die charakteristischen Absorptionen der Pyoverdine [15]: Das bei neutralem *pH*-Wert bei ~ 400 nm auftretende Absorptionsmaximum wird in saurer Lösung zu kürzeren Wellenlängen verschoben und spaltet in eine Doppelbande auf. Die rotbraunen Fe^{3+} -Komplexe zeigen zusätzlich zum Absorptionsmaximum bei ~ 400 nm (konstant zwischen *pH* 3 und 7) die typischen charge-transfer-Banden bei ~ 470 und ~ 550 nm.

Bei der Hochspannungs-Papierelktrophorese zeigen die Pyoverdine und Ferripyoverdine folgendes Verhalten: Bei *pH* 6.5 sind Fe^{3+} -**2** und Fe^{3+} -**4** einfach negativ geladen (Fe^{3+} -**2**: Mobilität 0.23 relative zu Asparaginsäure [16]) und Fe^{3+} -**3** und Fe^{3+} -**5** neutral. Bei *pH* 2.7 ändert sich die Ladung von Fe^{3+} -**2** in Übereinstimmung mit der Protonierung von zwei Carboxylgruppen (pK_a zwischen 4 und 5) von -1 nach $+1$, während bei gleichem *pH*-Wert Fe^{3+} -**4** neutral und Fe^{3+} -**3** und Fe^{3+} -**5** einfach positiv geladen sind. Bei ihnen wird beim Übergang

von pH 6.5 nach pH 2.7 eine Carboxylgruppe protoniert (die α -COOH-Gruppe der Glu- und Kgl-ASK sind stärker sauer, s. u.). Die Mobilitäten der Pyoverdine entsprechen, verglichen mit den Ferripyoverdinen, einer etwas positiveren Gesamtladung.

FAB-Massenspektrometrie. Die Massen der einfach positiv geladenen Ionen ($[M + H]^+$) der Pyoverdine unterscheiden sich jeweils von denen ihrer Fe^{3+} -Komplexe um 53 u ($+^{56}Fe^{3+} - 3^1H^+$). Alle vier Pyoverdine zeigen das durch retro-Diels-Alder-Zerfall des gesättigten Rings des Chromophors unter Verlust des aromatischen Teils einschließlich der ASK [2, 3, 6, 17] entstandene Fragment m/z 1218 [$\cong [M + H^+] - 303$ u (2), -302 u (3), -331 u (4) bzw. -332 u (5)]. Dies weist darauf hin, daß der einzige Unterschied der Pyoverdine in den ASK liegt.

Aminosäurenanalyse. Die Ferripyoverdine wurden mit HCl (6 N, vor Hydrolyse Entfernen der Fe^{3+} -Ionen durch Ausschütteln mit Ether) oder HI [6 N, Reduktion von (HO)Orn zu Orn] hydrolysiert (21 h, 110 °C) [14]. Die erhaltenen Aminosäuren wurden dann als TAB-Derivate (N/O-Trifluoracetyl-*n*-butylester [18]) durch GC/MS identifiziert und durch GC quantifiziert. Die Ermittlung ihrer Konfiguration erfolgte durch GC der Trifluoracetyl-isopropylester (nach HI-Hydrolyse) an Chirasil-*L*-Val [3]. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

2 Gly, 2 *D*-Ser, 2 *L*-Ser, 1 *L*-Glu, 1 *D*-(HO)Orn, 1 *L*-(HO)Orn, 2 *L*-Lys

bei 2, 3 und 4. 5 ergab darüber hinaus ein weiteres Äquivalent *L*-Glu. 2 und 3 lieferten außer den genannten Aminosäuren ein Äquivalent Bernsteinsäure (als Dibutylester identifiziert), während bei 4 nach Hydrolyse und TAB-Derivatisierung kein weiteres Hydrolyseprodukt nachweisbar war (Kgl zersetzt sich unter den Hydrolysebedingungen [19]).

Die **Komplexkonstanten der Ferripyoverdine** sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Sie wurden durch Änderung der Extinktion bei 450 nm nach Zugabe von EDTA zur Lösung der Fe^{3+} -Komplexe ermittelt [15, 20]. Die Werte sind bei pH 5 ver-

Tabelle 1. Physikalische Daten der Pyoverdine 2–5 und ihrer Ferrikomplexe

Verbindung	$\log \varepsilon (\lambda_{max})^a$	$[M + H]^+$ m/z^b	Komplexkonstante K	
			pH 5 ^c ($\times 10^{18}$)	pH 7 ^d ($\times 10^{26}$)
2	4.22 (397)	1 521		
3	4.23 (399)	1 520		
4	4.21 (402)	1 549		
5	4.18 (398)	1 550		
Fe^{3+} -2	4.17 (397)	1 574	5.65	1.0
Fe^{3+} -3	4.20 (397)	1 573	6.02	1.2
Fe^{3+} -4	4.23 (400)	1 602	5.69	1.1
Fe^{3+} -5	4.11 (397)	1 603	5.92	1.2

^a In 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0

^b Mit FAB-Massenspektrometrie

^c Mit $K(FeEDTA) = 10^{18}$ [20]

^d Mit $K(FeEDTA) = 10^{22}$ [20]

gleichbar mit denen der Fe^{3+} -Komplexe der strukturell ähnlichen Pyoverdine C, D und E [2] (6.34 , 6.47 und $6.59 \cdot 10^{18}$ [21]), bei $pH 7$ dagegen um den Faktor 5 größer als jene (2.03 , 2.15 und $2.18 \cdot 10^{25}$ [21]).

NMR-Spektroskopie. Die Tabellen 2 bis 5 geben die ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen von **2–5** wieder. Die Zuordnungen wurden durch Literaturvergleich [2, 3, 14, 22–25], Doppelresonanzexperimente, H, H-COSY, H, C-COSY, pH -Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen und durch Vergleich mit modifiziertem **2**, in dem (CHO, HO)Orn zu Orn umgewandelt worden ist (s. u.), getroffen. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **2**, **3** und **5** sind bis auf die Signale der ASK nahezu identisch. **4** zeigt typische „Anomalien“, die mit den Gleichgewichtsumwandlungen von Kgl zusammenhängen (s. u.). Die ^1H -NMR-Spektren von **2–5** sind stark pH -abhängig, was neben der Protonierung freier Carboxylgruppen (s. u.) auch auf sterische Effekte (Veränderung des anisotropen Einflusses des Chromophors auf die Protonen der N-terminalen Aminosäuren durch Konformationsänderung des Pyoverdinpeptids) zurückgeführt werden kann. In Abb. 1 ist das ^1H -Spektrum von **2** in einer bei $pH 6.8$ gepufferten D_2O -Lösung wiedergegeben.

Strukturaufklärung

Der Chromophor **1a** in **2–5** kann aufgrund seiner NMR-Daten (Tabellen 2 und 3) eindeutig identifiziert werden [2, 4, 7, 14]. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Vergleich der ^1H - und ^{13}C -Spektren von aus den Totalhydrolysat von **2–5** isoliertem **1b** mit authentischem Material [2, 3, 6, 26, 27]. Das CD-Spektrum von **1b** aus **2–5** (positiver Cotton-Effekt bei $350–400$ nm, in $1 N$ HCl) stimmt mit dem von **1b** aus Pseudobactin [27], das durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde [7], überein. In **2–5** ist daher der asymmetrische Kohlenstoff C-1 des Chromophors ebenfalls *S*-konfiguriert. Die Pyoverdine **2–5** selbst besitzen ebenso wie Pseudobactin [7] und andere Pyoverdine [2, 3] einen positiven Cotton-Effekt im Bereich des π - π^* -Übergangs des Chromophors ($350–400$ nm, gemessen in $0.1 N$ Tris-Puffer, $pH 7.2$).

Acylseitenketten

Neben dem Nachweis von Bernsteinsäure im Hydrolysat erfolgte die Identifizierung der Acylreste Suc in **2** und Suca in **3** aufgrund der NMR-spektroskopischen Daten (Tab. 4 und 5, Vergleich mit den Pyoverdinen D/E [2, 14], II/III [6] und GM-II/GM-I [3]) und durch die Überführung von **3** in **2** (Hydrolyse von Fe^{3+} -**3** in Fe^{3+} -**2** in kalter wäßriger Lösung bei $pH 9$, 10 Tage, vgl. [3]). Die chemischen Verschiebungen der Suc- ^1H - und ^{13}C -Signale sind im Gegensatz zu den Suca-Signalen pH -abhängig, was zusammen mit der Massendifferenz von 1 u beweist, daß die nicht mit dem Chromophor verknüpfte Carboxylgruppe des Bernsteinsäurerestes in **2** frei und in **3** als Amid vorliegt. Dies entspricht den Elektrophorese-Ergebnissen, nach denen **2** eine zwischen $pH 4–5$ protonierbare Carboxylgruppe mehr als **3** besitzt.

Die Molekülmasse von **4** (28 u schwerer als **2**) ließ annehmen, daß **4** α -Ketoglutarensäure (Kgl) als ASK enthält. Der Beweis für das Vorliegen von Kgl in **4** wurde durch Reduktion von Fe^{3+} -**4** mit NaBH_4 , anschließender Totalhydrolyse

Tabelle 2. $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen^a von **2**, **3**, **4** und **5** in gepuffertem D_2O bei pH 6.8^b (ohne Acylseitenketten)

Proton	2	3	4	5	Zuordnung ^c
γ -Lys ₁	0.89/0.99	0.94/1.02	0.83/0.97	0.95/1.02	A, B
γ -Lys ₂	1.22	1.23	1.25	1.24	A, B
δ -Lys ₁	1.22/1.40	1.23/1.41	^e	1.24/1.41	A, B
δ -Lys ₂	1.40/1.55	1.41/1.55	1.42/1.56	1.41/1.55	A, B
γ -(HO) Orn	} 1.70	1.70	1.70	1.70	A
γ -(HO) Orn					
β -Lys ₂	1.64/1.78	1.64/1.78	1.64/1.78	1.64/1.78	A
β -Lys ₁	1.67/1.77	1.67/1.77	1.67/1.77	1.67/1.77	A
β -(HO) Orn	} 1.75	} 1.75	} 1.75	} 1.75	A
β -(HO) Orn					
β -Glu	2.02/2.09	2.02/2.10	2.02/2.10	2.01/2.09	A, B
γ -Glu	2.33	2.33	2.33	2.33	A, B
2 a/2 b-Chr	2.48/2.67	2.49/2.68	2.46/2.65	2.49/2.68	A, B, C, D
ϵ -Lys ₁	2.48/2.58	2.50/2.58	^e	2.50/2.59	A, B
ϵ -Lys ₂	2.87/3.54	2.87/3.54	2.87/3.54	2.87/3.53	A, B
3 a/3 b-Chr	3.36/3.66	3.37/3.67	3.33/3.66	3.37/3.67	A, B, D
δ -(HO) Orn	} 3.56	} 3.56	} 3.55	} 3.56	A, B, D, E
δ -(HO) Orn					
α -Gly ₁	3.69/3.88	3.70/3.88	^e	3.70/3.88	A, F
β -Ser	3.87	3.87	3.87	3.87	A, B
β -Ser	3.89	3.89	3.89	3.89	A, B
β -Ser	3.92	3.92	3.92	3.91	A, B
α -Gly ₂	3.93	3.93	3.93	3.93	F
β -Ser ₁	4.02	4.02	4.02	4.01	A, B
α -Lys ₂ ^d	4.02	4.02	4.02	4.02	A, B
α -Glu	4.10	4.10	4.10	4.10	A, B
α -Ser ₁	4.32	4.33	4.30	4.33	A, B
α -(HO) Orn ^d	4.35	4.36	4.35	4.36	A, B
α -Lys ₁ ^d	4.38	4.38	4.39	4.38	A, B
α -(HO) Orn ^d	4.41	4.41	4.42	4.41	A, B
α -Ser	4.44	4.44	4.44	4.44	A, B
α -Ser	4.45	4.45	4.46	4.45	A, B
α -Ser	4.50	4.51	4.52	4.51	A, B
1-Chr	5.72	5.73	5.68–5.72	5.74	D
10-Chr	6.99	7.01	6.86–6.94	7.05	C, D
7-Chr	7.07	7.09	7.06–7.10	7.09	C, D
6-Chr	7.85	7.86	7.81–7.90	7.89	D
CHO, <i>cis</i>	7.93	7.94	7.93	7.94	D, E
CHO, <i>cis</i>	7.95	7.96	7.96	7.95	D, E
CHO, <i>trans</i>	8.28	8.28	8.28	8.29	D, E
CHO, <i>trans</i>	8.29	8.29	8.30	8.29	D, E

^a Chemische Verschiebung δ (ppm) relativ zu *DSS* ($\delta = 0$ ppm) als interner Standard^b 0.05 M Phosphatpuffer in D_2O ^c Zuordnungsmethoden: A: H,H-COSY am Bsp. von **2** und **5**, B: homonukleare Doppelresonanz, C: Differenz-NOE, D: Literaturvergleich, E: Vergleich mit Desformyl-desoxy-**2**, F: H,C-COSY am Bsp. von **2**^d α -Lys und α -(HO) Orn nicht sicher unterscheidbar^e δ nicht exakt bestimmbar, da breite, diffuse Signale und Überlagerung durch andere Signale

Tabelle 3. ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen^a von **2**, **3**, **4** und **5** in gepuffertem D_2O bei pH 6.8^b (ohne Acylseitenketten)

Kohlenstoff	Mult. ^c	2	3	4	5	Zuordnung ^d	
γ -Lys ₂	t	21.4	21.4	21.3	21.4	A, B	
2-Chr	t	23.1	23.1	23.0	23.1	A, B	
γ -Lys ₁	t	23.4	23.3	23.3	23.3	A, B	
	<i>trans</i>	t	23.2	23.2	23.1	23.2	D
γ -(HO)Orn	<i>trans</i>	t	23.6	23.5	23.5	23.5	D
γ -(HO)Orn	<i>cis</i>	t	23.8	23.8	23.7	23.8	A, B, D
	<i>cis</i>	t	24.2	24.1	24.1	24.1	A, B, D
δ -Lys ₁	t	26.9	26.9	26.7	26.9	A, B	
δ -Lys ₂	t	27.8	27.8	27.8	27.8	A, B	
β -Glu	t	28.2	28.2	28.2	28.2	A, B, C	
	<i>cis</i>	t	} 28.9 (2)	} 28.9 (2)	} 28.9 (2)	} 28.9 (2)	A, B, D
β -(HO)Orn	<i>cis</i>	t					
β -(HO)Orn	<i>trans</i>	t	} 29.0 (2)	} 29.0 (2)	} 29.0 (2)	} 29.0 (2)	D
	<i>trans</i>	t					
β -Lys ₂	t	} 30.8 (2)	30.7	} 30.7 (2)	30.7	A, B	
β -Lys ₁	t		30.9		30.9	A, B	
γ -Glu	t	34.8	34.7	34.7	34.7	A, B, C	
3-Chr	t	36.1	36.1	36.0	36.1	A, B	
ε -Lys ₂	t	39.2	39.2	39.2	39.2	A, B	
ε -Lys ₁	t	40.1	40.1	40.2	40.1	A, B	
α -Gly ₁	t	} 43.7 (2)	43.6	} 43.7 (2)	43.6	A, B	
α -Gly ₂	t		43.7		43.7	A, B	
	<i>trans</i>	t	} 47.0 (2)	} 47.0 (2)	} 47.0 (2)	} 47.0 (2)	A, B, D
δ -(HO)Orn	<i>trans</i>	t					
δ -(HO)Orn	<i>cis</i>	t	} 51.1 (2)	} 51.0 (2)	} 51.0 (2)	} 51.0 (2)	A, B, D
	<i>cis</i>	t					
α -(HO)Orn ^e	d	54.0	53.9	53.9	53.9	A, B	
α -Lys ₁ ^e	d	54.4	54.4	54.2	54.4	A, B	
α -(HO)Orn ^e	d	54.7	54.6	54.6	54.6	A, B	
α -Lys ₂ ^e	d	56.4	56.4	56.4	56.4	A, B	
α -Ser	d	56.5	56.4	56.4	56.4	A, B	
α -Ser	d	} 57.0 (2)	56.9	56.9	56.9	A, B	
α -Glu	d		57.1	57.0	57.0	A, B	
α -Ser	d	} 57.4 (2)	57.3	} 57.3 (2)	57.3	A, B	
α -Ser	d		57.5		57.5	A, B	
1-Chr	d	59.0	58.7	59.2	58.7	A, B	
β -Ser	t	61.8	61.7	61.7	61.7	A, B	
β -Ser	t	62.0	62.0	61.8	62.0	A, B	
β -Ser	t	62.1	62.1	62.0	62.1	A, B	
β -Ser	t	62.1	62.1	62.1	62.1	A, B	
10-Chr	d	101.2	101.1	101.2	101.1	B, E	
7-Chr	d	113.2	113.7	112.8	113.8	B, E	
6a-Chr	s	113.4	114.2	113.1	114.1	B	

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Kohlenstoff	Mult. ^c	2	3	4	5	Zuordnung ^d
5-Chr	s	116.0	116.7	114.0	116.7	B
10a-Chr	s	134.0	133.5	135.3	133.4	B
6-Chr	d	139.8	139.8	142.3	139.8	B, E
8-Chr	s	146.9	146.4	147.5	146.3	B
4a-Chr	s	149.9	150.0	150.0	150.0	B
9-Chr	s	159.8	157.6	162.5	157.5	B
CHO, <i>cis</i>	d	160.3	160.4	160.3	160.4	B, D, E
CHO, <i>cis</i>	d	160.5	160.6	160.5	160.6	B, D, E
CHO, <i>trans</i>	d	164.7	164.8	164.7	164.8	B, D, E
CHO, <i>trans</i>	d	164.8	164.9	164.8	164.9	B, D, E
CO-Chr	s	172.2	172.1	172.2	172.2	B, E
CO-Ser ^f	s	172.3	172.2	172.3	172.2	B
CO-Gly ^f	s	172.6	172.5	172.5	172.5	B
CO-Gly ^f	s	172.7	172.5	172.7	172.5	B
CO-Ser ^f	s	} 173.7 (2) }	} 173.6 (2) }	173.6	173.6	B
CO-Ser ^f	s			173.6	173.6	B
CO-Ser ^f	s	173.8	173.6	173.9	173.6	B
CO-(HO)Orn ^f	s	175.1	175.1	175.1	175.1	B
CO-(HO)Orn ^f	s	175.2	175.2	175.2	175.2	B
CO-Lys ^f	s	175.6	175.6	175.6	175.6	B
α CO-Glu ^f	s	175.7	175.7	175.7	175.7	B
CO-Lys ^f	s	176.4	176.3	176.3	176.3	B
γ COOH-Glu	s	182.2	182.2	182.2	182.2	B, C, E

^a Chemische Verschiebung δ (ppm) relativ zu *TMS*, *DSS* als interner Standard mit $\delta(\text{DSS}) = -1.61$ ppm

^b 0.1 M Phosphatpuffer in D_2O

^c Multiplizität bestimmt durch DEPT

^d Zuordnungsmethoden: A: H,C-COSY am Bsp. von **2**, B: Literaturvergleich, C: *pH*-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung, D: Vergleich mit Desformyl-desoxy-**2**, E: heteronukleare Doppelresonanz

^e α -(HO)Orn und α -Lys nicht sicher unterscheidbar

^f Reihenfolge der Zuordnung nicht sicher

des Reduktionsproduktes mit 6 N HCl bzw. 6 N HI und Identifizierung von α -Hydroxyglutarsäure (HCl-Hydrolysat) als TAB-Derivat bzw. Glutarsäure (HI-Hydrolysat) als Dibutylester durch GC/MS erbracht [6, 14]. Fe^{3+} -**4** ließ sich durch oxidative Decarboxylierung mit H_2O_2 [28] in Fe^{3+} -**2** überführen (Charakterisierung des dekomplexierten Produktes durch HPLC, Aminosäurenanalyse und anhand des Vergleichs der NMR- und FABMS-Daten mit authentischem **2**). Der Verlauf dieser Reaktion beweist, daß Kgl wie in Pyoverdin C [2, 14] und Pyoverdin I [6] über die γ -Carboxylgruppe an den Chromophor gebunden ist. Hiermit in Übereinstimmung ist auch die Tatsache, daß nach den Elektrophorese-Experimenten die ASK von **4** eine stark saure Carboxylgruppe enthält, die erst unterhalb von *pH* 2.7 protoniert wird (freie α -Ketoglutarsäure: $pK_a(\alpha) = 2.3$; $pK_a(\gamma) = 4.8$ [29]).

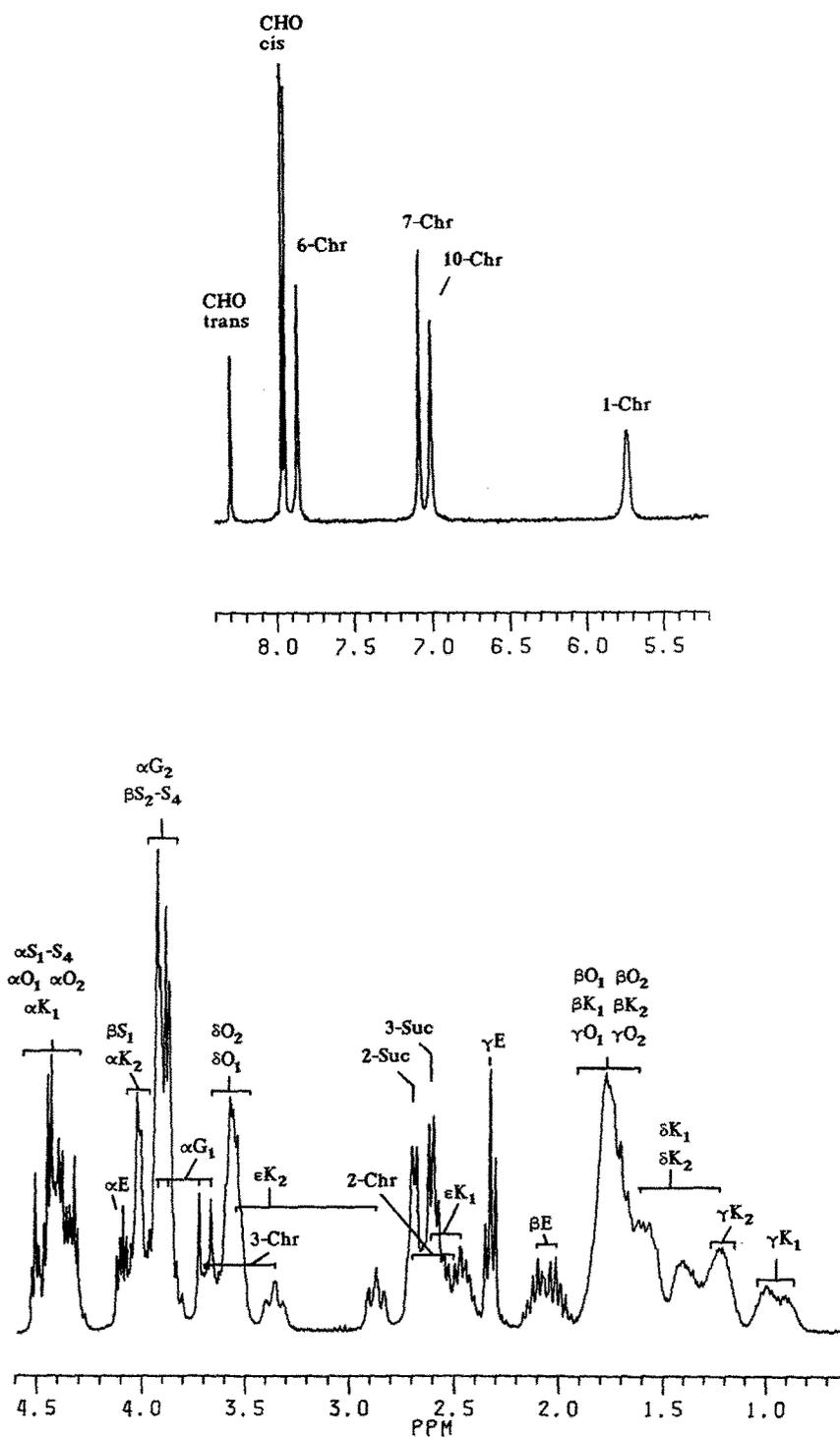


Abb. 1. 300 MHz-¹H-NMR-Spektrum von 2 in gepuffertem D₂O (Phosphatpuffer pH 6.8), interner Standard DSS, Aminosäuren-Code entsprechend den IUPAC-Regeln [ausgenommen O=(HO)Orn]

Tabelle 4. $^1\text{H-NMR}$ -chem. Verschiebungen^{a, b} der Acylseitenketten von **2**, **3**, **4** und **5**^c

		H-2	H-3	
2 (Suc)	–NH–CO–	CH ₂ –	CH ₂ –	COOH
<i>pH</i> 6.8		2.69	2.61	
<i>pH</i> 3.0		2.77	2.72	
3 (Suca)	–NH–CO–	CH ₂ –	CH ₂ –	CONH ₂
<i>pH</i> 6.8		2.79	2.72	
<i>pH</i> 3.0		2.81	2.74	
4 (Kgl)	–NH–CO–	CH ₂ –	CH ₂ –	CO–COOH ^d
<i>pH</i> 6.8		2.79/2.61/2.33 ^e		
<i>pH</i> 3.0		2.81/2.68/2.35 ^e		
		H-2	H-3	H-4
5 (Glu)	–NH–CO–	CH ₂ –	CH ₂ –	CH(NH ₂)–COOH
<i>pH</i> 6.8		2.75	2.25	3.83
<i>pH</i> 3.0		2.76	2.27	3.84

^a Chemische Verschiebung δ (ppm) relativ zu DSS

^b Zuordnung durch Literaturvergleich, homonukleare Entkopplung und H,H-COSY

^c In D₂O mit 0.05 M (*pH* 6.8) bzw. 0.1 M (*pH* 3.0) Phosphatpuffer

^d Mehrere Strukturisomere, s. Text

^e Schwerpunkte der breiten Signale, keine genaue Zuordnung möglich, da kompliziertes Spinsystem

4 zeigt wie Pyoverdin C [2, 14] und Pyoverdin I [6] im ^1H - und im ^{13}C -NMR-Spektrum eine Verbreiterung und zum Teil Aufspaltung einiger Signale, insbesondere der der aromatischen Chromophorprotonen und -kohlenstoffatome, sowie der Signale des Kgl-Restes selbst. Die Ursache hierfür liegt in den verschiedenen Strukturen der Kgl-Seitenkette, die in Lösung im Gleichgewicht miteinander stehen. Die ^{13}C -NMR-Daten (Tab. 5), vor allem die chemische Verschiebung der C-4(α -C)-Resonanzen (zwei gleichintensive, verbreiterte Signale bei 94.3 und 95.5 ppm), sprechen dafür, daß in neutraler Lösung überwiegend zwei diastereomere Lactamformen [30, 31] ($-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\text{C}}(\text{OH})-\text{COOH}$) vorliegen (vgl. [6, 14]): Bei der offenkettigen Ketoform müßte C-4 ein ^{13}C -Signal bei ca. 200 ppm ergeben [32], was im Widerspruch zu den Ergebnissen von Demange et al. [33] weder bei **4** noch bei Pyoverdin C und Pyoverdin I beobachtet wird. Zum Vergleich: α -Ketoglutaramsäure ($\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{COOH}$) liegt bei neutralen *pH*-Werten nur zu weniger als 1% als α -Keton vor [28, 30, 34]. Denkbar ist auch eine hydratisierte Form (gem-Diol) [5, 33]. Ihr Vorliegen in größeren Anteilen ist jedoch nach den Untersuchungsergebnissen über freie α -Ketoglutar- und α -Ketoglutaramsäure [29, 30, 32] bei neutralen *pH*-Werten unwahrscheinlich. Art und Anteil der

Tabelle 5. ^{13}C -NMR-chem. Verschiebungen^{a, b} der Acylseitenketten von **2**, **3**, **4** und **5**^c

	C-1	C-2	C-3		C-4
2 (Suc)	-NH-CO-	CH ₂ -	CH ₂	-	COOH
<i>pH</i> 6.8	178.5	33.2	33.8		182.2
<i>pH</i> 3.0	177.9	32.6 ^d	32.5 ^d		180.8
3 (Suca)	-NH-CO-	CH ₂ -	CH ₂	-	CONH ₂
<i>pH</i> 6.8	177.3	31.8	30.9		178.8
<i>pH</i> 3.0	177.3	31.8	30.9		178.8
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
4 (Kgl)	-NH-CO-	CH ₂ -	CH ₂ -	CO-	COOH ^e
<i>pH</i> 6.8	176.6	30.1/31.5/32.9/33.9		94.3/95.5	180.4/180.8
<i>pH</i> 3.0	^f	30.2/ ^g	33.0/33.7	^f	180.4/180.8
5 (Glu)	-NH-CO-	CH ₂ -	CH ₂ -	CH(NH ₂)-	COOH
<i>pH</i> 6.8	176.8	32.4	26.7	55.0	175.2
<i>pH</i> 3.0	176.7	32.5	26.6	55.1	175.1

^a Chemische Verschiebung δ (ppm) relativ zu TMS, DSS als interner Standard mit δ (DSS) = -1.61 ppm

^b Zuordnung durch Literaturvergleich

^c In D₂O mit 0.1 M (*pH* 6.8) bzw. 0.2 M (*pH* 3.0) Phosphatpuffer

^d Reihenfolge unklar

^e Mehrere Strukturisomere

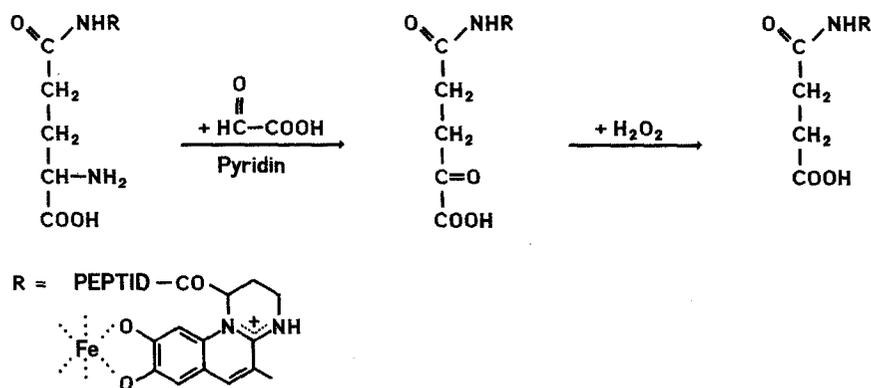
^f Konnten bei *pH* 3 nicht registriert werden

^g Durch ein anderes Signal verdeckt

im Gleichgewicht vorliegenden Strukturen und/oder die entsprechenden Umwandlungsgeschwindigkeiten sind *pH*-abhängig: Bei *pH* 3 konnten die ^{13}C -Signale von C-1 und C-4 nicht registriert werden. Alle anderen NMR-Signale von Kgl blieben unverändert. Weitere Untersuchungen über die Gleichgewichtsstrukturen der α -Ketoglutar säure als ASK in Pyoverdinen sind in Durchführung.

Aufgrund der Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und der FAB-Massenspektrometrie wurde vermutet, daß **5** als ASK des Chromophors *L*-Glu enthält. Einen Beweis hierfür erbrachte die folgende Reaktion: Fe^{3+} -**5** ließ sich durch Umsetzung mit Glyoxalsäure (CHO-COOH) unter katalytischem Einfluß von Pyridin [35] unter schonenden Bedingungen selektiv transaminieren. Das entstandene Produkt, Fe^{3+} -**4**, wurde durch HPLC und FABMS charakterisiert und mit H₂O₂ in Fe^{3+} -**2** übergeführt, das durch FABMS, Aminosäurenanalyse und nach Dekomplexierung mit ^1H -NMR identifiziert werden konnte.

Dieser Reaktionsverlauf ist nur möglich, wenn in **5** *L*-Glutaminsäure über die γ -Carboxylgruppe mit dem Chromophor verknüpft ist. Ein weiterer Beweis für diese Struktur ist den NMR-Spektren von **5** zu entnehmen. Die ^1H - und ^{13}C -Signale der Glu-ASK können eindeutig durch Vergleich mit den NMR-Spektren von **2**



oder 3 identifiziert werden. Ihre chemischen Verschiebungen (Tab. 4 und 5) sind nur mit einer an der γ -Carboxylgruppe substituierten (amidierten) Glu $R - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$ zu vereinbaren. Als Vergleich wurden die ^1H - und ^{13}C -Daten von Glutamin und Isoglutamin, ebenfalls bei pH 6.8 und pH 3.0 ermittelt, herangezogen (Gln: α -CO: 175.1 ppm, α -C: 55.3, β -C: 27.3, γ -C: 32.0, γ -CO: 178.8, α -H: 3.77, β -H: 2.14, γ -H: 2.45; Iso-Gln: α -CO: 173.6 ppm, α -C: 53.9, β -C: 28.7, γ -C: 34.0, γ -CO: 181.8, α -H: 4.04, β -H: 2.13, γ -H: 2.39; jeweils bei pH 6.8). Die geringe pH -Abhängigkeit der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Signale der Glu-ASK zwischen pH 6.8 und pH 3.0 (freie Glutaminsäure: $\text{p}K_a(\alpha) = 2.1$, $\text{p}K_a(\gamma) = 4.3$ [36]) unterstützen diese Interpretation. Die NMR-Signale von Gln sind im Gegensatz zu denen von Iso-Gln ebenfalls zwischen pH 6.8 und pH 3 nicht pH -abhängig (vgl. auch Glu im Peptid, unten).

Die beschriebenen Reaktionen zur Überführung von 5 in 2, von 4 in 2 und von 3 in 2 beweisen gleichzeitig, daß alle vier Pyoverdine die gleiche Peptidstruktur besitzen.

Peptidstruktur

Die durch FABMS ermittelten Molekülmassen der Pyoverdine sind um 18 u kleiner als aus einem linearen Peptid mit den angegebenen Aminosäuren zuzüglich zweier Formylgruppen errechnet wird. Dies ließ auf eine intramolekulare Zyklisierung des Peptids durch Bildung einer zusätzlich Amid- oder Esterbindung schließen. Zur Strukturaufklärung des Peptids war daher die Klärung folgender Fragen bereits vor der Sequenzierung sinnvoll:

- a) Wie werden die Hydroxamsäuren aus den beiden N^5 -Hydroxyornithin-Resten gebildet? Liegt eine Zyklisierung zum N-Hydroxy- α -piperidon vor?
- b) Welche funktionellen Gruppen der difunktionellen Aminosäuren Lys (2-mal), Ser (4mal) und Glu sind im Pyoverdinpeptid noch frei?

Hydroxamsäuren

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen belegen, daß beide (HO)Orn-Reste N^5 -formyliert sind. Die ^1H -NMR-Spektren aller vier Pyoverdine enthalten bei 7.93–7.96 ppm (2 Signale, *cis*) und 8.28–8.30 ppm (2 Signale, *trans*) die charakteristischen Resonanzen der Formylprotonen zweier N^5 -Formyl-(HO)Orn-Reste, die aufgrund der *cis/trans*-Isomerie von Formylhydroxamsäuren [37] jeweils in ein

Signalpaar mit dem Intensitätsverhältnis 3 : 1 (*cis/trans*) aufgespalten sind [2, 6]. Aus dem gleichen Grund ergeben beide Formylkohlenstoffe je zwei ^{13}C -Signale bei 160.3 – 160.7 ppm (*cis*) und 164.7 – 165.0 ppm (*trans*). Die *cis/trans*-Isomerie führt auch zur Aufspaltung der Methylenkohlenstoff- ^{13}C -Signale von Ornithin, die erwartungsgemäß bei den $\delta\text{-CH}_2$ -Kohlenstoffen am deutlichsten ist (Tab. 3). Aufgrund dieser Daten konnten N^6 -Formyl-Lys (geringere Aufspaltung der Formylsignale mit einer Bevorzugung des *trans*-Isomeren [2, 6]) und O-Formyl-Ser (keine Aufspaltung) ausgeschlossen werden.

Durch sehr milde saure Hydrolyse (0.1 N HCl, Raumtemperatur, 48 h) ließen sich die Formylgruppen quantitativ und selektiv abspalten [2, 6]. Im ^1H -NMR-Spektrum von **2** in 0.1 N DCl trat schon nach kurzer Zeit bei 8.25 ppm das Signal des nicht austauschbaren Protons von Ameisensäure auf, während die Formyl- ^1H -Signale *beider* Formylhydroxamsäuren an Intensität abnahmen und die $\delta\text{-CH}_2$ -(HO)Orn-Protonenresonanzen von 3.56 ppm nach 3.34 bzw. 3.28 ppm verschoben wurden. Das Desformylierungsprodukt von **2** (Desformyl-**2**) ergab in PI-FABMS ein $[M + H]^+$ -Ion bei m/z 1465.

Hydroxylamine können im Gegensatz zu Hydroxamsäuren mit H_2 unter Pt-Katalyse schon bei Atmosphärendruck zu den entsprechenden Aminen hydriert werden [38]. Auf diese Weise wurde Desformyl-**2** in das Hydrierungsprodukt Desformyl-desoxy-**2** übergeführt, das durch Elektrophorese, FABMS ($[M + H]^+$: m/z 1433), Aminosäurenanalyse (2 Äquivalente Orn nach HCl-Hydrolyse), ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie ($\delta\text{-CH}_2$ -Orn: ^1H : $\delta = 3.02$ ppm; ^{13}C : $\delta = 39.8/39.9$ ppm) charakterisiert wurde. Die NMR-Spektren bestätigten die selektive Umwandlung von (HO)Orn in Orn. Sie belegen zusammen mit der Reaktionsfolge **2** \rightarrow Desformyl-**2** \rightarrow Desformyl-desoxy-**2** und den Molekülmassen der Produkte, daß in der Ausgangsverbindung **2** zweifellos beide (HO)Orn N^5 -formyliert vorliegen.

Freie funktionelle Gruppen

Aminogruppen. Die in **2**–**5** und in Desformyl-desoxy-**2** frei vorliegenden Aminogruppen wurden durch Dansylierung der Ferripyoverdine und Pyoverdine, anschließende Totalhydrolyse mit HCl und Identifizierung der dansylierten Aminosäuren mit RP-HPLC nachgewiesen. Die Derivatisierung mit Dansylchlorid wurde hier wie auch bei den Dansylpeptiden (s. u.) in Acetonitril/ Li_2CO_3 -Puffer durchgeführt [39]. Bei Fe^{3+} -**2**, -**3** und -**4** konnte ausschließlich ϵ -Dns-Lys, bei Fe^{3+} -**5** zusätzlich Dns-Glu (Acylseitenkette des Chromophors) nachgewiesen werden. Desformyl-desoxy-**2** lieferte ϵ -Dns-Lys und δ -Dns-Orn (molares Verhältnis: 1 : 2).

Hydroxylgruppen von Ser. Die Hydroxylgruppen aller vier Serinreste sind nicht verestert. Das folgt eindeutig aus der chemischen Verschiebung der Protonen und ^{13}C -Kohlenstoffe der $\beta\text{-CH}_2$ -Gruppen (Veresterung bewirkt eine deutliche Tieffeldverschiebung der $\beta\text{-CH}_2$ - ^1H - bzw. - ^{13}C -Signale, vgl. Ser in Pseudobactin 7SR1 [8] und Thr in den Pyoverdinen I–II [6]). Eine Bestätigung hierfür ist die Beobachtung, daß Fe^{3+} -**2**, -**3** und -**5** resistent gegen NaBH_4 in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ sind (in Fe^{3+} -**4** wird Kgl reduziert, s. o.; vgl. Pyoverdine I–III).

Carboxylgruppe von Glu. Nach den Elektrophorese-Ergebnissen und den Molekülmassen liegt im Peptid eine Carboxylgruppe frei vor. Sie muß eine Säurekonstante $pK_a = 4$ – 5 besitzen, was alle α -Carboxylgruppen der Aminosäuren ausschließt. Aus den NMR-Daten folgt, daß es sich um die $\gamma\text{-COOH}$ -Gruppe von Glu

handelt. Das dem γ -COOH-Kohlenstoff von Glu entsprechende ^{13}C -Signal (182.2 ppm bei pH 6.8) wurde durch heteronukleare Doppelresonanz (Einstrahlen in die Protonenresonanzen der benachbarten γ -CH₂-Gruppe) identifiziert. Dieses Signal verschiebt sich bei pH 3 nach 180.3 ppm (am Bsp. von 2) und kann auch aufgrund seiner chemischen Verschiebung nur dem γ -COOH-Kohlenstoff von Glu zugeordnet werden (α -COOH einer C-terminalen Aminosäure: $\delta \leq 180$ ppm [22, 23, 25] – nicht pH -abhängig zwischen pH 3.0–6.8; vgl. Glu-ASK). Auch die ^1H - und ^{13}C -Signale der γ - und β -CH₂-Gruppe von Glu sind deutlich pH -abhängig (pH 3.0: γ -H: 2.46 ppm, β -H: 2.06/2.15, γ -C: 33.2, β -C: 27.5; pH 6.8: s. Tab. 2 u. 3). Die pH -Abhängigkeit nimmt dabei von γ nach α ab.

Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse muß die Zyklisierung des Peptids über die Aminogruppen eines der beiden Lys und der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure erfolgen. Das andere Lys, Ser (4×), Glu und (HO)Orn (2×) sind „normal“ peptidisch im Pyoverdinpeptid eingebaut und nicht an einer Cyclisierung beteiligt.

Peptidsequenz

Die PI-FAB-Massenspektren von 2–5 enthalten Fragmentionen, welche eine N-terminale Sequenz bis zu 7 Aminosäuren nach dem Chromophor herleiten lassen (Tab. 6). Fragmente, die noch den Chromophor enthalten, dominieren. Insbesondere einige C-terminale Fragmentionen sind wenig intensiv und nicht bei allen Messungen zu beobachten. Ihre Identifizierung ist nicht eindeutig und daher die Herleitung der Sequenz allein mit Hilfe der FAB-Fragmente unsicher. Über die Sequenz der restlichen, C-terminalen 4 Aminosäuren geben die FAB-Spektren keine Auskunft.

Tabelle 6. Sequenzspezifische Fragmentionen im PI-FAB-Massenspektrum von 2 (Nomenklatur der Fragmente s. [42, 43])

	$\text{Suc}-\text{Chr}-\text{NH}-\overset{\text{Y}_{11}}{\text{C}}-\overset{\text{Z}_{11}}{\text{C}}-\overset{\text{X}_{10}}{\text{C}}-\text{CO}-\overset{\text{Y}_{10}}{\text{N}}-\overset{\text{Z}_{10}}{\text{C}}-\overset{\text{X}_9}{\text{C}}-\overset{\text{Y}_9}{\text{N}}-\overset{\text{Z}_9}{\text{C}}-\dots$ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: center;">R^1 A₁</div> <div style="text-align: center;">R^2 C₁</div> <div style="text-align: center;">A₂</div> <div style="text-align: center;">C₂</div> </div>							
	Ser $n=1$	Lys $n=2$	Gly $n=3$	(CHO, HO)Orn $n=4$	Ser $n=5$	Ser $n=6$	Gly $n=7$	
A	417	545	602	760	847	934	991	
C+2	462	590	647	805	892	979	1036	
	$n=11$	$n=10$	$n=9$	$n=8$	$n=7$	$n=6$	$n=5$	$n=4$
X	–	–	975	918	–	673	–	–
Y+2	1164	1077	949	–	734	647	560	503
Z+2	–	1062	–	877	–	632	–	–

Tabelle 7. $[M+H]^+$ -Ionen von Chromophorpeptiden und Oligopeptiden nach Partialhydrolyse^a von **2**, bestimmt durch PI-FABMS

<i>m/z</i>	Struktur	Gelchromatographie-Fraktion ^e
1 009	Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser-Ser-Gly ^b	
991	Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser-Ser-Gly ^b	
909	Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser-Ser-Gly	
952	Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser-Ser ^b	
934	Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser-Ser ^b	
852	Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser-Ser	
865	Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser	2
847	Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser	2
765	Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser	3
778	Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn	2 ^f
760	Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn	2 ^f
678	Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn	3 ^f
648	Suc-Chr-Ser-Lys-Gly	3
630	Suci-Chr-Ser-Lys-Gly	3
548	Chr-Ser-Lys-Gly	4
591	Suc-Chr-Ser-Lys	3
573	Suci-Chr-Ser-Lys	3
491	Chr-Ser-Lys	5
463	Suc-Chr-Ser	7
445	Suci-Chr-Ser	6
363	Chr-Ser	8
854	(HO)Orn-Ser-Ser-Gly-[Lys + (HO)Orn + Glu + Ser] ^d	
836	(HO)Orn-Ser-Ser-Gly-cyclo[Lys-(HO)Orn-Glu-Ser]	
724	Ser-Ser-Gly-[Lys + (HO)Orn + Glu + Ser] ^d	1
706	Ser-Ser-Gly-cyclo[Lys-(HO)Orn-Glu-Ser]	1
637	Ser-Gly-[Lys + (HO)Orn + Glu + Ser] ^d	1
619	Ser-Gly-cyclo[Lys-(HO)Orn-Glu-Ser]	1
550	Gly-[Lys + (HO)Orn + Glu + Ser] ^d	1
532	Gly-cyclo[Lys-(HO)Orn-Glu-Ser]	1
493	[Lys + (HO)Orn + Glu + Ser] ^d	1
475	cyclo[Lys-(HO)Orn-Glu-Ser]	1
380	(HO)Orn-Ser-Ser-Gly ^c	
323	(HO)Orn-Ser-Ser ^c	

^a 6 N HCl, 90°C, 10 min^b 6 N HCl, 90°C, 5 min^c 12 N HCl, 37°C, 15 h^d Bis zu vier Isomere^e Gelchromatographie eines Partialhydrolysats, erhalten mit 6 N HCl (80°C, 30 min), auf Bio-Gel P-2^f Zusätzlich die entsprechenden Chromophorpeptide mit C-terminalem cyclo(HO)Orn in dieser Fraktion (s. Text)

Durch Untersuchung von Partialhydrolysaten der Pyoverdine wurde versucht, weitere Informationen zu erhalten. Verschiedene Hydrolysebedingungen (s. Exp. Teil) wurden angewendet und die entstandenen Bruchstücke im Gemisch durch FABMS nachgewiesen. Am Beispiel von **2** traten drei Reihen von N-terminalen Peptiden (Chromophorpeptide), zwei Reihen von C-terminalen Peptiden und einige nicht-terminale Peptide auf (Tab. 7). Die entsprechenden Glieder der N-terminalen Reihen unterscheiden sich um die Abspaltung bzw. Zyklisierung (zum Succinimid, vgl. [2, 3]) der ASK Bernsteinsäure und die der C-terminalen Reihen um die Abspaltung von Wasser. Die Unterscheidung zwischen N-terminalen Bruchstücken mit ASK, ohne ASK und C-terminalen Bruchstücken wurde durch Vergleich mit den FAB-Massenspektren der Partialhydrolysate von **3**–**5** und Desoxy-desformyl-**2** erleichtert. Größere Chromophorpeptide als die mit der Molekülmasse m/z 1 009, m/z 991 und m/z 909 (Bsp. 2) konnten nicht beobachtet werden. Das kleinste, sich um 18 u unterscheidende C-terminale Peptidpaar ist das mit den Molekülmassen m/z 475 und m/z 493. Diese Ergebnisse wiesen sehr deutlich darauf hin, daß auf der C-terminalen Seite des Peptids ein Cyclotetrapeptid aus Lys, (HO)Orn, Glu und Ser vorliegt, über dessen genauere Struktur den PI-FAB-Massenspektren der Partialhydrolysate keine Hinweise zu entnehmen waren. Die Herleitung der linearen Sequenz zwischen Chromophor und Zyklus



war durch die PI-FABMS-Analyse der Partialhydrolysate eindeutig.

Durch Gelchromatographie der Partialhydrolysate an Bio-Gel P-2 konnten nur kleinere Chromophorpeptide rein isoliert werden. Größere Chromophorpeptide und Oligopeptide ohne Chromophor lagen in Gemischfraktionen vor (Tab. 7). Diese Methode war daher nicht geeignet, Bruchstücke in reiner Form zu erhalten, mit denen die Sequenz des C-terminalen Tetrapeptidzyklus aufgeklärt und die Position aller *D*- und *L*-Enantiomeren von (HO)Orn und Ser im Peptid bestimmt werden konnte. Aufgrund der Reaktivität der Hydroxylaminofunktion von (HO)Orn bereitete die RP-HPLC von Chromophorpeptiden, die diese Aminosäure enthielten, Schwierigkeiten. Darüber hinaus zyklisiert C-terminales (HO)Orn nach längerem Stehen entsprechender Chromophorpeptide in nicht ausreichend saurer Lösung zum N-Hydroxy- α -piperidon [3]. Die Chromophorpeptide mit den Molekülmassen m/z 778, m/z 760 und m/z 678 gehen daher schon beim Aufarbeiten der Gelchromatographie-Fraktionen z. T. in die entsprechenden um 18 u leichteren Bruchstücke über (Tab. 7).

Sequenzierung durch Isolierung von Dansylpeptiden

Die Methode der Wahl zur vollständigen Strukturaufklärung des Pyoverdinpeptids war die Isolierung von Oligopeptid-Bruchstücken, die zwecks empfindlicherer UV-Detektion und effizienterer chromatographischer Auftrennung als Dansylderivate vorliegen, mit RP-HPLC und ihre Charakterisierung durch FABMS, Aminosäurenanalyse und Endgruppenbestimmung. Vorteilhafterweise wurde von Desformyl-desoxy-**2** (in dem (HO)Orn zum stabileren Orn umgewandelt ist) ausgegangen, das zuerst dansyliert und anschließend partialhydrolysiert wurde [2]. Auf diese Weise entstehen (neben dansylierten Chromophorpeptiden, s. u.) Dansylpeptide, die nur an den δ - bzw. ϵ -Aminogruppen von Orn bzw. Lys dansyliert sind. Sie besitzen

noch einen freien N-Terminus und können gegebenenfalls einem Edman-Abbau unterworfen werden.

Die Dansylierung von Desformyl-desoxy-2 erfolgte in Acetonitril/Li₂CO₃-Puffer [39]. Das Produkt wurde dann zur Ermittlung der optimalen Hydrolysezeit (größte Ausbeute an dansyliertem Tetrapeptidzyklus) mit 6 N HCl (90 °C) 10, 20, 30 oder 60 min hydrolysiert, durch Adsorption an einer RP-18-Kartusche (Sep-Pak) von Salzen und dem größten Teil der Dansylsulfonsäure befreit und mittels PI-FABMS analysiert. Es wurden die Molekülionen von mono- und didansylierten Peptiden ohne Chromophor sowie dansylierten Chromophorpeptiden detektiert.

Tabelle 8. $[M+H]^+$ -Ionen der Dansylpeptide ohne Chromophor nach Partialhydrolyse^a von dansyliertem Desformyl-desoxy-2

<i>m/z</i>	Struktur	Fraktion ^{d, c}
251	DnsNH ₂	9
252	DnsOH	1
366	(δ-Dns)Orn	6
380	(ε-Dns)Lys ^b	
423	Gly-(δ-Dns)Orn	7
437	(ε-Dns)Lys-Gly	8
453	(δ-Dns)Orn-Ser	6
467	Ser-(ε-Dns)Lys	10
494	Lys-(δ-Dns)Orn ^b	
495	(δ-Dns)Orn-Glu	7
510	Gly-(δ-Dns)Orn-Ser	6
524	Ser-(ε-Dns)Lys-Gly	9
540	(δ-Dns)Orn-Ser-Ser	6
581	Ser-Lys-(δ-Dns)Orn	3
582	(δ-Dns)Orn-Glu-Ser ^b	
597	(δ-Dns)Orn-Ser-Ser-Gly, Gly-(δ-Dns)Orn-Ser-Ser	3, 6
623	Lys-(δ-Dns)Orn-Glu ^b	
692	cyclo[Lys-(δ-Dns)Orn-Glu-Ser]	7
710	[Lys + (δ-Dns)Orn + Glu + Ser] ^c	3, 4
749	Gly-cyclo[Lys-(δ-Dns)Orn-Glu-Ser]	5
767	Gly-[Lys + (δ-Dns)Orn + Glu + Ser] ^c	3, 4
836	Ser-Gly-cyclo[Lys-(δ-Dns)Orn-Glu-Ser]	5
854	Ser-Gly-[Lys + (δ-Dns)Orn + Glu + Ser] ^c	3, 4
923	Ser-Ser-Gly-cyclo[Lys-(δ-Dns)Orn-Glu-Ser]	5
941	Ser-Ser-Gly-[Lys + (δ-Dns)Orn + Glu + Ser] ^c	3, 4
784	(ε-Dns)Lys-Gly-(δ-Dns)Orn	
1 015	(ε-Dns)Lys-Gly-(δ-Dns)Orn-Ser-Ser-Gly	

^a 6 N HCl, 10 min, 90 °C

^b 6 N HCl, 30–60 min, 90 °C

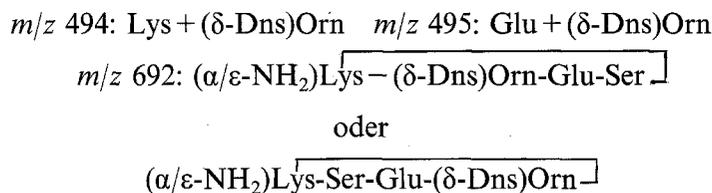
^c Bis zu vier Isomere

^d RP-HPLC der monodansylierten Peptide eines Partialhydrolysats (6 N HCl, 10 min, 90 °C), s. Abb. 3

^e In Fraktion 2 und 11 (Abb. 3) keine Dansylpeptide nachweisbar

Letztere gehen aus den in Tabelle 7 angegebenen Bruchstücken durch Dansylierung von Lys, Orn [anstelle von (HO)Orn] und dem Chromophor (bis zu zwei Dansylreste) hervor. Sie sollen hier nicht im einzelnen aufgeführt werden. Das größte beobachtete Dansyl-Chromophorpeptid war Suc-(Dns)₂Chr-Ser-(ε-Dns)Lys-Gly-(δ-Dns)Orn (*m/z* 1 694, 10 min Hydrolysat).

In Tabelle 8 sind die detektierten Dansylpeptide ohne Chromophor angegeben. Es handelt sich überwiegend um monodansylierte Bruchstücke. Sie bestätigten (ebenso wie die dansylierten Chromophorpeptide) die Sequenz des linearen Peptidteils zwischen Chromophor und dem Zyklus sowie die Annahme, daß ein C-terminaler Tetrapeptidzyklus aus Glu, Ser, Lys und Orn vorliegt (*m/z* 692). Darüber hinaus gaben die Ionen *m/z* 494 und *m/z* 495 schon an dieser Stelle Hinweise auf die Konnektivität der Aminosäuren im Tetrapeptidzyklus:



Offen blieb noch die Sequenzrichtung im Zyklus und ob Lysin über die α- oder ε-Aminogruppe im Zyklus eingebaut ist. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde der Tetrapeptidzyklus isoliert. Die Isolierung des Zyklus sowie weiterer dansylierter Bruchstücke erfolgte durch Auftrennung eines 10 min-Hydrolysats von dansyliertem Desformyl-desoxy-2 (Ausgangsmenge: 3 mg) durch RP-HPLC (Nucleosil 100-C 18, 5 μ). Da die vollständige Auftrennung des Hydrolysats in alle Einzelkomponenten sehr zeitaufwendig gewesen wäre, die didansylierten Peptide und dansylierten Chromophorpeptide keine Information über den Zyklus enthielten und allein anhand der monodansylierten Peptide (ohne Chromophor) alle offenen Fragen über die Sequenz des Pyoverdinpeptids beantwortet werden konnten, war nur

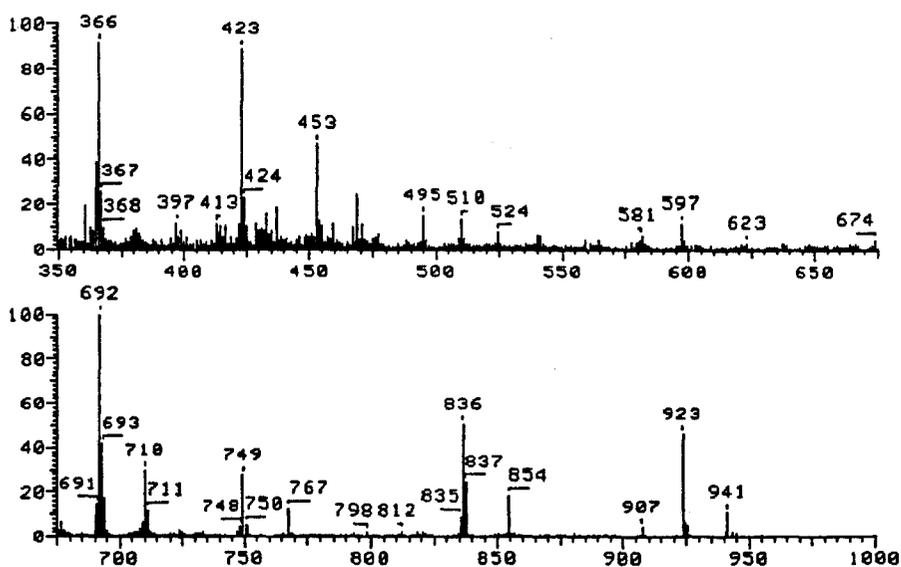


Abb. 2. PI-FAB-Massenspektrum der monodansylierten Peptide (s. Tab. 8)

deren Reinisolierung von Interesse. Es erwies sich daher als vorteilhaft, wenn das Partialhydrolysat im ersten Chromatographieschritt durch schnelle Elution (steiler Isopropanol-Gradient, wäßrige Komponente: 0.1 N Essigsäure) grob in zwei Fraktionen aufgetrennt wurde, nämlich in die zuerst eluierende Gruppe der monodansylierten Peptide (Fraktion A, Elution mit 10–25% Isopropanol) und die Gruppe der dansylierten Chromophorpeptide zusammen mit den didansylierten Peptiden (Fraktion B, Elution mit 25–60% Isopropanol). Die Fraktionen A und B wurden nach Entfernung der Puffersalze mit Sep-Pak RP-18 FAB-massenspektrometrisch vermessen. Abb. 2 gibt das FAB-Spektrum von Fraktion A an. Das Basision ist das $[M+H]^+$ -Ion m/z 692 des dansylierten Tetrapeptidzyklus DP(692) [im Folgenden sollen die Dansylpeptide mit „DP(m/z)“ bezeichnet werden]. Fraktion B ergab die schon im Gesamtgemisch beobachteten Molekülionen der didansylierten Peptide und dansylierten Chromophorpeptide und wurde nicht weiter bearbeitet.

Fraktion A wurde dann zur Auftrennung in Einzelkomponenten bei optimierten Elutionsbedingungen zuerst unter Anwendung eines Triethylamin/Ameisensäure-Puffers bei pH 2.80 chromatographiert. Es wurden 11 Fraktionen erhalten (Abb. 3) und ihre Zusammensetzung mit FABMS ermittelt (Tab. 8). Fast alle Fraktionen bestanden noch aus mehreren Dansylpeptiden. Durch einen weiteren Chromatographieschritt unter Verwendung eines Triethylamin/Essigsäure-Puffer bei pH 4.40 gelang es, aus den Fraktionen 5, 6, 6, 7 und 9 die Dansylpeptide DP(749), DP(836),

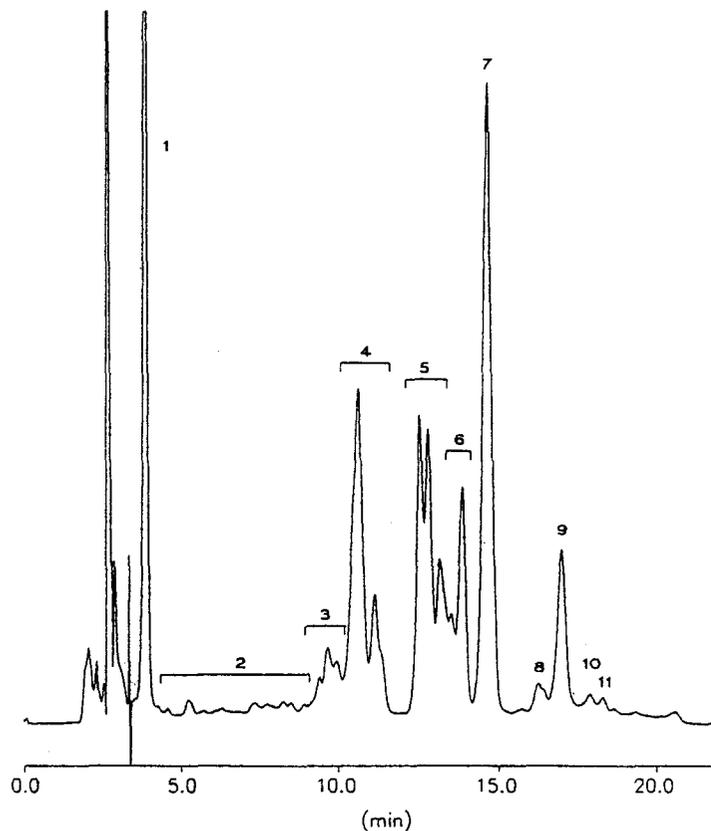


Abb. 3. RP-HPLC-Trennung der monodansylierten Peptide, Chromatographiebedingungen s. Exp. Teil

DP(923), DP(453), DP(510), DP(423), DP(495), DP(692) und DP(524) in analytisch reiner Form zu isolieren. Der dansylierte Tetrapeptidzyklus DP(692) war die Hauptkomponente in Fraktion 7. Sie alle wurden durch PI-FABMS, Endgruppenbestimmung und quantitative Aminosäurenanalyse charakterisiert.

Die Endgruppenbestimmung erfolgte durch Derivatisierung der Dansylpeptide mit Dansylchlorid, vollständige Hydrolyse (6 N HCl) und Identifizierung der Dansylaminosäuren mit RP-HPLC (Nucleosil 60-C 18 5 μ), die Aminosäurenanalyse durch Dansylierung nach der Totalhydrolyse und Quantifizierung der Dansylaminosäuren ebenfalls mit RP-HPLC. Die Dansylierung geschah nach der in [39] beschriebenen Methode. Die Chromatographiebedingungen, die eine klare Trennung aller möglichen Dansylderivate von Ser, Gly, Glu, Orn und Lys erlaubten, sind im Exp. Teil angegeben.

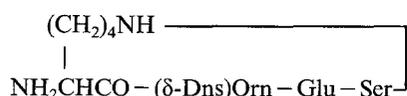
Tabelle 9. $[M+H]^+$ -Ionen, Aminosäurezusammensetzung und Endgruppenbestimmung der isolierten Dansylpeptide

Dansylpeptid	$[M+H]^+$ <i>m/z</i>	Zusammensetzung ^a					N-terminale Aminosäure ^a
		Ser	Gly	Glu	Lys	Orn	
DP (524)	524	1	1		1		Ser
DP (423)	423		1			1	Gly
DP (510)	510	1	1			1	Gly
DP (453)	453	1				1	Orn
DP (923)	923	3	1	1	1	1	Ser
DP (836)	836	2	1	1	1	1	Ser
DP (749)	749	1	1	1	1	1	Gly
DP (692)	692	1		1	1	1	Lys(α)
DP (495)	495			1		1	Orn

^a Ermittelt durch RP-HPLC der Dansylaminosäuren

Die Ergebnisse der Charakterisierung aller reinisolierten Dansylpeptide sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Zum einen bestätigten sie die schon in Tabelle 8 angegebenen Strukturen und damit ein weiteres Mal die Sequenz zwischen Chromophor und Zyklus. Darüber hinaus konnten durch die Endgruppenbestimmung von DP(692) und DP(495) die Fragen nach der Sequenzrichtung im Tetrapeptidzyklus und der Aminogruppe des Lysins, über die der Zyklus mit dem Restpeptid verbunden ist, beantwortet werden:

DP(495) ist das Dipeptid aus Glu und (δ -Dns)Orn, entstanden durch doppelten Bindungsbruch im Zyklus. Die Endgruppenbestimmung ergab (di-Dns)Orn, daher muß Orn mit der Aminogruppe von Glu verknüpft sein. Aufgrund des Auftretens von DP(494) nach 60minütiger Partialhydrolyse von dansyliertem Desformyl-desoxy-2 ist Lys an die Aminogruppe von (δ -Dns)Orn gebunden (s. o.). DP(494) konnte nicht aus einem 10 min-Partialhydrolysat isoliert werden. Der intakte, an der δ -Aminogruppe von Orn dansylierte Zyklus DP(692) ($[M+H]^+$ *m/z* 692; 1 Lys, 1 Orn, 1 Ser, 1 Glu) ergab bei der Endgruppenbestimmung (α -Dns)Lys neben (δ -Dns)Orn. Die ϵ -Aminogruppe von Lys ist daher innerhalb des Zyklus mit Ser und die α -Aminogruppe im intakten Pyoverdin mit dem linearen Restpeptid verbunden. Demnach hat der Tetrapeptidzyklus die folgende Struktur:



Zur Absicherung der Sequenz des C-terminalen Tetrapeptidzyklus wurde DP(692) einem Edman-Abbau unterworfen. Da die α -Aminogruppe von Lysin frei ist, sollte der Ring durch Phenylisothiocyanat zu öffnen sein, was sich durch eine anschließende Endgruppenbestimmung bestätigen ließ: nach Dansylierung und Totalhydrolyse des Umsetzungsproduktes mit PITC konnte (diDns)Orn nachgewiesen werden. In einer zweiten Abbaustufe wurde dann Dns-Glu identifiziert. Diese zwei Abbaustufen reichten aus, um die oben angegebene Sequenz des Tetrapeptidzyklus zweifelsfrei zu bestätigen.

Verteilung von D/L-Ser und D/L-(HO)Orn

Um die Position der *D*- bzw. *L*-Isomeren von Ser und (HO)Orn im Peptid zu ermitteln, wurde die Aminosäurezusammensetzung geeigneter Chromophorpeptide und Dansylpeptide durch Gaschromatographie der Trifluoracetyl-isopropyl-aminosäuren an Chirasil-*L*-Val bestimmt. In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse angegeben, mit denen nun zusammen mit den anderen Daten dieser Publikation die vollständige Struktur der Pyoverdine von *Pseudomonas fluorescens 12* angegeben werden kann. Sie ist in Abb. 4 dargestellt. Nach der in [2, 3] vorgeschlagenen „short hand“-Nomenklatur werden sie wie folgt bezeichnet:

- Pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-SUC (2)
- Pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-SUCA (3)
- Pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-KGL (4)
- Pyoverdin-Q-sKGO'sSGK*o'ES*-GLU (5)

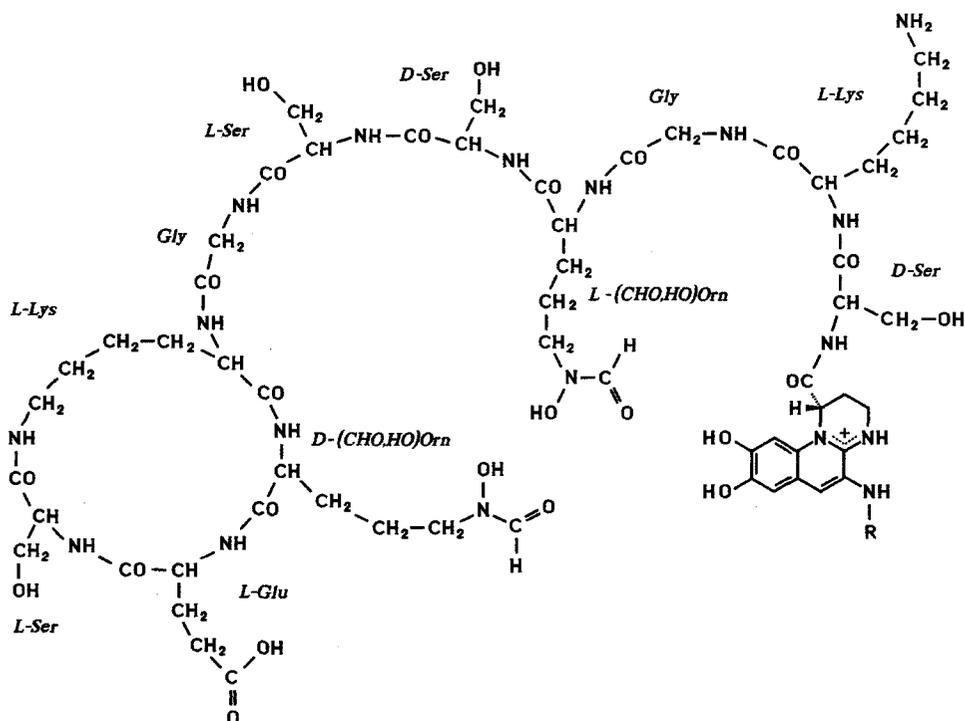
Tabelle 10. Konfigurationsanalyse der Aminosäuren in Chromophorpeptiden und Dansylpeptiden^a

Peptid	Aminosäuren				
	Ser	Gly	Glu	Lys	Orn
Chr-Ser-Lys-Gly	D	×		L	
Gemisch ^b aus:	D	×		L	L
Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-cyclo(HO)Orn					
+ Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn					
+ Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-cyclo(HO)Orn					
+ Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn					
+ Suci-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser					
+ Suc-Chr-Ser-Lys-Gly-(HO)Orn-Ser					
DP (923): Ser-Ser-Gly-cyclo[Lys-(δ -Dns)Orn-Glu-Ser]	1 D/2 L	×	L	L	(D) ^c
DP (836): Ser-Gly-cyclo[Lys-(δ -Dns)Orn-Glu-Ser]	L	×	L	L	(D)
DP (749): Gly-cyclo[Lys-(δ -Dns)Orn-Glu-Ser]	L	×	L	L	(D)

^a Ermittelt nach HCl- (Dansylpeptide) bzw. HI-Hydrolyse (Chromophorpeptide) als Trifluoracetyl-isopropyl-derivate durch GC an Chirasil-*L*-Val

^b Fraktion 2, Tab. 7

^c (δ -Dns)Orn wird nur zum geringen Teil hydrolytisch gespalten



Pyoverdin Pf12-IA (2): $R = -CO-CH_2CH_2-COOH$

Pyoverdin Pf12-IIA (3): $R = -CO-CH_2CH_2-CONH_2$

Pyoverdin Pf12-IB (4): $R = -CO-CH_2CH_2-CO-COOH$

Pyoverdin Pf12-IIB (5): $R = -CO-CH_2CH_2-CH(NH_2)-COOH$ (L)

Abb. 4. Die Strukturen der Pyoverdine Pf12-IA, Pf12-IB, Pf12-IIA und Pf12-IIB

Dank

Wir möchten der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung, Herrn Prof. Dr. G. Pulverer und Herrn Dr. H. Korth (Hygiene-Institut der Universität zu Köln) für die Überlassung des Bakterienstammes, Herrn Prof. Dr. G. Snatzke (Universität Bochum) für die CD-Messungen und Herrn Dr. H. Kolshorn (Universität Mainz) für die Aufnahme der zweidimensionalen NMR-Spektren bestens danken.

Experimenteller Teil

Massenspektrometrie

FAB: Die PI-FAB Spektren wurden am Gerät HSQ 30 von Finnigan MAT (Bremen), ausgerüstet mit einer FAB-Kanone (Xe) von Ion Tech. Ltd (Teddington, GB), aufgenommen. Als Matrices dienten Thioglycerin und Glycerin/Milchsäure (1:1). Die GC/MS-Messungen erfolgten an den Geräten Varian MAT CH7A mit dem Gaschromatograph Varian 2700 (Kapillarsäule SBP 1, 25 M) und Finnigan 3200 mit dem Gaschromatograph 9100 (Kapillarsäule BP 10, 25 m).

NMR-Spektroskopie

Die 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden am Gerät AM 300 von Bruker aufgenommen. Für die 1H -Spektren wurden 10–15 mg, für die ^{13}C -Spektren 30–80 mg Pyoverdin (2 und 4 als Na^+ -

Salz, **3**, **5** und Desformyl-desoxy-**2** als Chlorid) eingesetzt. Die Proben waren in 0.5 ml gepuffertem (0.05 M Phosphatpuffer *pH* 6.8 bzw. 0.1 M Phosphatpuffer *pH* 3.0 für ^1H -Spektren und 0.1 M Phosphatpuffer *pH* 6.8 bzw. 0.2 M Phosphatpuffer *pH* 3.0 für ^{13}C -Spektren) D_2O gelöst. Die chemischen Verschiebungen wurden mit *DSS* als internen Standard ermittelt, mit $\delta(\text{DSS})=0$ ppm für ^1H und $\delta(\text{DSS}) = -1.61$ ppm für ^{13}C [2, 3, 6]. Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie wurde am Gerät Bruker AM 400 durchgeführt. Für H,H-COSY wurde 30 mg **5** (in 0.5 ml D_2O mit 0.05 M Phosphatpuffer *pH* 6.8) bzw. **2** (in 0.5 ml ungepuffertem $\text{D}_2\text{O} = pH 4.5$) und für H,C-COSY 150 mg **2** (in 0.5 ml ungepuffertem $\text{D}_2\text{O} = pH 4.5$) eingesetzt. H,H-COSY: Pulsfolge des COSY-45 [40] mit Sättigung des Wassersignals, Datenmatrix $F_1 \times F_2 = 512 \times 1$ K. Heteronukleare ^1H - ^{13}C shift correlated spectroscopy (H,C-COSY) [41]: Datenmatrix $F_1 \times F_2 = 512 \times 2$ K.

UV/VIS-Spektroskopie, CD-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden an den Geräten Perkin-Elmer Lambda 7 und Beckmann Spektrophotometer 25, CD-Spektren am Gerät Dichrograph Mark III (ISA) aufgenommen.

Gaschromatographie

Es wurde ein Carlo Erba HRGC 4160 mit FID-Detektor verwendet. Als Kapillarsäulen wurden eingesetzt: SE 52 (25 m), CP-SIL 19 CB (25 m) sowie Chirasil-L-Val (25 m; alle Säulen von Chrompack). Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Integrator Chromatopac C-R3A von Shimadzu.

HPLC

Das HPLC-System bestand aus folgenden Geräten von Knauer (Bad Homburg): 2 Pumpen Typ 64, Gradientenprogrammer 50B, dynamische Mischkammer, Hochtemperaturofen und Spektralphotometer 87.00. Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme geschah mit der Chromstar Software von Bruker-Franzen Analytik (Bremen).

Ionenaustausch- und Gelchromatographie

Für die Niederdruck-Flüssigchromatographie wurden die folgenden Geräte eingesetzt: Peristaltikpumpen LKB Varioperpex 12000 und Pharmacia P-3, Gradientenmischer LKB Ultrograd 11300, Detektoren ISCO UA-5 Absorbance Monitor und LKB Uvicord III. Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte an Cellulose MN 2100 DEAE (Macherey & Nagel, Düren), DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) und Cellulose P 23 (Serva), die Gelchromatographie an Bio-Gel P-2 (200–400 mesh; Bio-Rad).

Elektrophorese

Die Hochspannungs-Papierelektrophorese wurde mit einem CAMAG-HVE-System 60600 auf dem Elektrophoresepapier MN 261 (CAMAG) durchgeführt.

Adsorption

Als Adsorptionsmaterialien zur Festphasenextraktion wurden Servachrom XAD-4 (0.3–1.0 mm; Serva) und Sep-Pak RP-18 Kartuschen (Waters) verwendet.

Chemikalien

Pyridin, HI, HCl und H_2O wurde wie bereits an anderer Stelle [3] beschrieben gereinigt. Isopropanol für die HPLC besaß „HPLC-Qualität“ (Lichrosolv, Merck, Darmstadt). Aminosäuren und Dansyl-

aminosäuren mit Ausnahme von (α -Dns)Lys, (α -Dns)Orn, (δ -Dns)Orn und (diDns)Orn stammten von Sigma (St. Louis, USA). Die Herstellung der monodansylierten Derivate von Lys und Orn sowie von (diDns)Orn erfolgte wie in [2] angegeben. Alle anderen verwendeten Reagenzien besaßen p.A.-Qualität, die Reagenzien für den Edman-Abbau des Tetrapeptidzyklus waren „zur Sequenzanalyse“ (Fluka).

Züchtung von Pseudomonas fluorescens 12

Der Stamm wurde in 101 Kulturen unter Schütteln und Durchleiten von steriler Luft (3 l/min) über einen Zeitraum von 3–5 Tage gezüchtet. Das Medium enthielt pro Liter 13.0 g Na-gluconat, 4.0 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 5.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Der pH-Wert wurde zwischen 7.2 und 8.0 gehalten.

Isolierung der Pyoverdine

Nach Abbruch der Kultur wurde dem Medium 10 g Fe(III)-citrat zugefügt und der pH auf 6.0 eingestellt. Die Zellen wurden durch Tangentialfiltration (Pellikon-System mit PTHK 0005-Membran-Kassette, Millipore) abgetrennt und das Filtrat auf eine Glassäule (10 \times 50 cm), gefüllt mit XAD-4, gebracht. Nach Adsorption der Ferripyoverdine aus dem Medium wurde das Harz zur Entfernung von anorganischen Salzen und überschüssigem Fe(III)-citrat mit 5 l Wasser gewaschen. Die Desorption der Ferripyoverdine erfolgte dann mit 3 l Aceton/Wasser (1 : 1). Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingengt und der dunkelbraune Rückstand (ca. 4 g/10 l Medium) bei -25°C unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt.

Vom Rohextrakt der Ferripyoverdine wurden 0.5–1.0 g auf einer DEAE-Cellulose-Säule (2.6 \times 20 cm) mit einem Pyridin/Essigsäure-Puffer 5.0 chromatographiert. Die Auftrennung erfolgte mit dem linearen Gradienten 0.02–0.2 M (bezogen auf Pyridin) in 4 h, dann 0.2–1 M in 2 h und einer Flußrate von 80 ml/h. Detektiert wurde bei 405 und 510 nm. Es wurden zwei Hauptfraktionen an braunen Ferripyoverdinen, Fraktion 1 und Fraktion 2, neben einer Vielzahl von braunen, gelben und grauen Nebenfraktionen (nicht mit den typischen UV/VIS-Spektren der Ferripyoverdine) erhalten. Fraktion 1 wurde in 0.2–0.4 g Portionen auf einer P-Cellulose-Säule (2.6 \times 28 cm) unter Verwendung eines Pyridin/Ameisensäure-Puffers pH 3.0 chromatographiert. Eluiert wurde mit dem linearen Gradienten 0.02–0.1 M (bezogen auf Pyridin) in 4 h und 0.1–0.5 M in 4 h, Flußrate und Detektion wie zuvor angegeben. Fraktion 1 trennte in Fe^{3+} -3 (zuerst eluierend) und Fe^{3+} -5 auf. Fraktion 2 wurde in 0.2–0.5 g Portionen auf einer DEAE-Sephadex-Säule (2.6 \times 30 cm) mit einem Pyridin/Essigsäure-Puffer pH 4.0 chromatographiert. Gradient: 0.01–0.05 M (bezogen auf Pyridin) in 4 h und 0.05–0.2 M in 2 h, Flußrate und Detektion wie oben. Unter diesen Bedingungen trennte Fraktion 2 in die Einzelkomponenten Fe^{3+} -2 (zuerst eluierend) und Fe^{3+} -4 auf. Die Eluate wurden bei 30°C im Vakuum eingengt, und die getrockneten Ferripyoverdine bei -25°C vor Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt. Es wurden 150 mg Fe^{3+} -2, 270 mg Fe^{3+} -4, 80 mg Fe^{3+} -3 und 130 mg Fe^{3+} -5 pro g Extrakt erhalten.

Reinheitskontrolle der Pyoverdine und Ferripyoverdine

Sie erfolgte durch HPLC an Polygosil 60-C18, 7 μ (4.6 \times 250 mm; Macherey & Nagel, Düren). Eluiert wurde isokratisch mit 0.035 M Natriumcitrat-Puffer (pH 5.0) und 5% Acetonitril im Falle der Ferripyoverdine und mit 0.02 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 4.0) mit 1 mM EDTA und 7% Acetonitril im Falle der Pyoverdine (1 ml/min). Detektiert wurde durch UV-Absorption bei 254 nm.

Dekomplexierung der Ferripyoverdine und quantitative Aminosäurenanalyse von 2–5

wurde wie in [14], die Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren in 2–5 durch GC der Trifluoracetyl-isopropyl-derivate auf Chirasil-L-Val wie in [3] beschrieben durchgeführt. Die eindeutige Identifizierung der Enantiomere erfolgte durch Koinjektion eines D/L-Standards.

Komplexbilanzen

Mit 0.1 M Natriumacetat *pH* 5.0 bzw. 0.1 M Natriumphosphat *pH* 7.0 gepufferte Lösungen von Fe^{3+} -**2**, -**3**, -**4** oder -**5** ($0.1 \cdot 10^{-5}$ mol/10 ml bei *pH* 5.0 bzw. $0.05 \cdot 10^{-5}$ mol/10 ml bei *pH* 7.0) wurden mit einer zunehmenden Menge EDTA ($0.2-2 \cdot 10^{-5}$ mol/10 ml bei *pH* 5.0 bzw. $1-50 \cdot 10^{-5}$ mol/10 ml bei *pH* 7.0) versetzt und bei Raumtemperatur bis zum Erreichen des Gleichgewichts stehen gelassen. Die Gleichgewichtskonzentration an Ferripyoverdin wurde durch Messen der Extinktion bei 450 nm bestimmt und hieraus die Komplexbilanz errechnet.

Nachweis der α -Ketoglutarinsäure

Der Nachweis von Kgl in **4** durch Reduktion von Fe^{3+} -**4** mit NaBH_4 wurde wie in [6, 14] angegeben durchgeführt.

Oxidative Decarboxylierung der α -Ketoglutarinsäure

Es wurden 10 mg Fe^{3+} -**4** in 10 ml 0.01 M Phosphatpuffer (*pH* 8) gelöst und nach Zugabe von 5 ml 30%igem H_2O_2 über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde der Ferri-Komplex zur Entfernung der Salze und des überschüssigen H_2O_2 auf eine Sep-Pak RP-18 Kartusche adsorbiert, mit 2 ml Wasser gewaschen und mit Acetonitril/Wasser 1 : 1 eluiert. Anschließend wurde das Produkt (Fe^{3+} -**2**) zur Reinigung von nicht umgesetztem Fe^{3+} -**4** an einer DEAE-Sephadex-Säule chromatographiert (s. o., Ausbeute: 97%). Nach Dekomplexierung wurde das Produkt durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, PI-FABMS und Aminosäureanalyse charakterisiert.

*Transaminierung der Glu-Seitenkette in **5***

10 mg Fe^{3+} -**5** und 14 mg Glyoxalsäure wurden in 5 ml einer wäßrigen 2 M Pyridin-Lösung (mit Essigsäure auf *pH* 7.4 eingestellt) gelöst und ca. 48 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde zur Decarboxylierung des entstandenen Fe^{3+} -**4** die Lösung mit 5 ml H_2O_2 versetzt. Nach Stehen über Nacht wurde das Produkt wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und nach Dekomplexierung charakterisiert (Ausbeute: 82% Fe^{3+} -**2**).

Partialhydrolyse der Pyoverdine, Isolierung von Chromophorpeptiden

1 mg Pyoverdin wurde in 1 ml Salzsäure unter N_2 -Atmosphäre hydrolysiert. Folgende Säurekonzentrationen und Hydrolysebedingungen wurden gewählt: 6 N HCl/90 °C/5, 10, 30, 60, 180 min; 0.03 N HCl/110 °C/3 h; 12 N HCl/37 °C/15 h. Nach Einengen zur Trockne wurden die Proben mit PI-FABMS analysiert.

Zur chromatographischen Auftrennung der Chromophorpeptide wurden 8 mg Pyoverdin **2** in 5 ml 6 N HCl 10 min unter N_2 bei 80 °C hydrolysiert. Nach Entfernen der Salzsäure im Vakuum wurde das Hydrolysat auf einer Bio-Gel P-2 Säule (Gelbett: 2.6×90 cm) mit 0.1 N Essigsäure chromatographiert (Flußrate: 30 ml/h; Detektion: 206, 254, 340 nm). Die erhaltenen Fraktionen (s. Tab. 7) wurden anschließend im Vakuum zur Trockne eingengt und mit PI-FABMS analysiert. Desweiteren wurden die Fraktionen mit RP-HPLC untersucht.

*Desformylierung von **2***

Eine Lösung von 30 mg **2** wurde in 10 ml konz. HCl/Wasser 1 : 100 (*v/v*) gelöst und 48 h bei Raumtemperatur vor Licht geschützt stehen gelassen. Während dieser Zeit wurde der Reaktionsverlauf mit RP-HPLC kontrolliert (Laufmittel s. o.: Charakt. d. Pyoverdine). Danach wurde das Produkt im Vakuum zur Trockne eingengt, durch PI-FABMS untersucht und ohne weitere Aufarbeitung der Hydrierung unterworfen.

Desformyl-desoxy-2

Das Produkt der Desformylierung wurde in 2 ml 1 N Essigsäure gelöst und zu einer Suspension von 30 mg vorhydriertem (3 h) PtO₂ in 4 ml 1 N Essigsäure gegeben. Zur Hydrierung wurde die Suspension in einer H₂-Atmosphäre 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Produkt an Bio-Gel P-2 chromatographiert (0.2 M Pyridin/Essigsäure-Puffer pH 6.5). Danach erfolgte die Charakterisierung des Hydrierungsproduktes durch PI-FABMS, Aminosäurenanalyse (nach HCl-Hydrolyse) und, nach Umionisieren, durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie.

Freie Aminogruppen in den Pyoverdinen

0.1 mg Pyoverdin, Ferri-Pyoverdin oder Desformyl-desoxy-2 wurden in 2 ml Li₂CO₃-Puffer (40 mM, pH 9.5) gelöst und mit 1.5 mg Dansylchlorid in 1 ml Acetonitril versetzt. Die Dansylierung erfolgte 2 h bei 37 °C. Zum Abbruch der Reaktion wurden 0.4 ml Ethylamin (2%ige wäßrige Lösung) zugegeben und die Umsetzung 5 min bei 37 °C fortgesetzt. Nach Hinzufügen von 0.5 ml 6 N HCl wurde zur Trockne eingeeengt, dann mit 1 ml 6 N HCl versetzt und 15 h bei 90 °C hydrolysiert. Schließlich wurde die Salzsäure im Vakuum abgezogen, der Rückstand in 1 ml TEA/Ameisensäure-Puffer (pH 2.9) gelöst und durch RP-HPLC analysiert. HPLC-Parameter: Säule (4.6 × 250 mm, auf 50 °C thermostatisiert) Nucleosil 60-C18, 5 μ (Macherey & Nagel, Düren); Elution (1 ml/min) mit dem zweistufigen linearen Gradienten 10–22% B in 18 min und 22–50% B von 18 bis 40 min mit 0.1 N Ameisensäure/TEA-Puffer pH 2.90 (A) und Isopropanol (B); Detektion durch Absorption bei 254 nm.

Dansylpeptide

3 mg Desformyl-desoxy-2 wurden mit 36 ml 40 mM Li₂CO₃-Puffer (pH 9.5) und 18 ml Dansylchlorid in Acetonitril (1.5 mg/ml) versetzt und 15 h bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt dansyliert. Nach Zugabe von 2 ml 6 N HCl wurde die Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockne eingeeengt, mit 5 ml 6 N HCl versetzt und 10 min bei 90 °C partialhydrolysiert. Anschließend wurde die Probe im Vakuum zur Trockne eingeeengt, in 2 ml Wasser gelöst (nicht lösliche Bestandteile = DnsOH wurden abzentrifugiert) und auf eine Sep-Pak RP-18 Kartusche aufgetragen. Das Adsorbat wurde mit 8 ml Wasser gewaschen und anschließend mit 4 ml Acetonitril/Eisessig 10:1 (v/v) eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeeengt, mit PI-FABMS analysiert und mit RP-HPLC präparativ aufgetrennt.

HPLC-Parameter: Säule (4.0 × 250 mm; 50 °C) Nucleosil 100-C18, 5 μ; Detektion bei 254 nm; Elution (1 ml/min): 1. Schritt: linearer Gradient 10–25% B in 10 min und 25–60% B von 10 bis 25 min mit 0.1 N Essigsäure (A) und Isopropanol (B), 2 Fraktionen wurden aufgefangen (s. o.); 2. Schritt (Fraktion 1 = monodansylierte Peptide): linearer Gradient 8–18% B in 22 min mit 0.1 N Ameisensäure/TEA pH 2.80 (A) und Isopropanol (B), 11 Fraktionen (s. o.); 3. Schritt (Fraktion 5, 6, 7, 9): linearer Gradient 10–25% B in 30 min mit 0.1 N Essigsäure/TEA pH 4.40 (A) und Isopropanol (B), Isolierung der Dansylpeptide in Tabelle 9. Alle Fraktionen wurden nach Entsalzen an Sep-Pak RP-18 mit PI-FABMS untersucht. Die Aufbewahrung der Dansylpeptide erfolgte nach Trocknen bei –25 °C.

Aminosäurenanalyse und Endgruppenbestimmung der Dansylpeptide

Aminosäurenanalyse: Jeweils 5–25% der isolierten Dansylpeptide wurden 15 h in 50 μl 6 N HCl bei 110 °C hydrolysiert. Danach wurde die Probe im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeeengt, mit 20 μl Wasser versetzt und erneut zur Trockne eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand in 50 μl 40 mM Li₂CO₃-Puffer (pH 9.5) gelöst und mit 25 μl Dansylchlorid in Acetonitril (1.5 mg/ml) versetzt. Die Dansylierung erfolgte 1 h bei 37 °C. Durch Zugabe von 10 μl Ethylamin-Lösung (2%ige in Wasser) und 5minütiger Reaktion bei 37 °C wurde überschüssiges Dansylchlorid verbraucht. Danach wurden 5 μl Ameisensäure zugegeben und 40 μl der Lösung auf die RP-Säule injiziert.

Analyse der freien Aminogruppen: 5–25% Dansylpeptid wurden wie oben beschrieben dansyliert und anschließend in 50 µl 6 N HCl bei 90 °C 15 h hydrolysiert. Nach Einengen zur Trockne im Vakuum wurde der Rückstand in 50 µl TEA/Ameisensäure-Puffer (pH 2.9) gelöst. Die Identifizierung der dansylierten Aminosäuren erfolgte durch Injektion von 20 µl auf die RP-Säule.

In beiden Fällen entsprachen die HPLC-Bedingungen denen bei der Bestimmung der freien Aminogruppen der Pyoverdine (s. o.).

Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren in Chromophor- und Dansylpeptiden

Diese erfolgte ebenfalls durch Gaschromatographie der Trifluoracetyl-isopropyl-derivate an Chirasil-L-Val, nur mit entsprechender Reduzierung der Reagenzienmengen. Die Hälfte der Chromophorpeptidfraktionen 2, 4, 5 und 8 (Tab. 7) wurden mit 0.25 ml HI hydrolysiert und mit 0.25 ml Isopropanol/Acetylchlorid 5:1 (1 h, 110 °C) und 0.5 ml Methylenchlorid/TFA 4:1 (5 min, 150 °C) derivatisiert, s. [3]. Entsprechend wurde ein Viertel der Dansylpeptide DP(749) DP(836) und DP(923) nach Hydrolyse mit 0.25 ml HCl derivatisiert (Tab. 10).

Dansyl-Edman-Abbau des Tetrapeptidzyklus

Ein Viertel des isolierten Dansyl-Tetrapeptidzyklus DP(692) wurde in 200 µl Pyridin/Wasser 1:1 (v/v) gelöst und mit 100 µl Phenylisothiocyanat (5%ig) in Pyridin versetzt. Nach kurzem Durchleiten von N₂ erfolgte bei 37 °C während 1 h die Kupplungsreaktion. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zweimal mit 400 µl Heptan/Ethylacetat 10:1 und danach viermal mit 400 µl Heptan/Ethylacetat 1:1 ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde im Vakuum zur Trockne eingengt und 1 h über P₄O₁₀ im Vakuum getrocknet. Dann wurden zum Rückstand 100 µl wasserfreie Trifluoressigsäure gegeben, N₂ durchgeleitet und das Peptid 30 min bei 37 °C gespalten. Die Trifluoressigsäure wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand 30 min über NaOH im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 200 µl Pyridin/Wasser 1:2 gelöst, dreimal mit Heptan/Ethylacetat 1:1 extrahiert und die wäßrige Phase zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde nach Lösen in 200 µl Wasser in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Eine Hälfte wurde zum Nachweis der frei gewordenen Aminogruppe mit Dansylchlorid wie oben beschrieben verwendet, mit der zweiten Hälfte wurde eine zweite Abbaustufe durchgeführt.

Literatur

- [1] Teil XLVI der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“. Für Teil XLV s. Taraz K., Tappe R., Schröder H., Hohlneicher U., Gwose I., Budzikiewicz H., Mohn G., Lefèvre J. F. (1991) *Z. Naturforsch.* **46c**: 527
- [2] Briskot G., Taraz K., Budzikiewicz H. (1989) *Liebigs Ann. Chem.*: 375
- [3] Mohn G., Taraz K., Budzikiewicz H. (1990) *Z. Naturforsch.* **45b**: 1437
- [4] Demange P., Wendenbaum S., Bateman A., Dell A., Abdallah M. A. (1987) *Bacterial Siderophores: Structure and Physicochemical Properties of Pyoverdins and Related Compounds*. In: Winkelmann G., van der Helm D., Neilands J. B. (ed.) *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. VCH, Weinheim, S. 167
- [5] Demange P., Bateman A., Mertz C., Dell A., Picmont Y., Abdallah M. A. (1990) *Biochemistry* **29**: 11041
- [6] Poppe K., Taraz K., Budzikiewicz H. (1987) *Tetrahedron* **43**: 2261
- [7] (a) Teintze M., Hossain M. B., Barnes C. L., Leong J., van der Helm D. (1981) *Biochemistry* **20**: 6447; (b) Teintze M., Leong J. (1981) *Biochemistry* **20**: 6457
- [8] Yang C. C., Leong J. (1984) *Biochemistry* **23**: 3534
- [9] Buyer S. J., Wright J. M., Leong J. (1986) *Biochemistry* **25**: 5492

- [10] van der Hofstad G. A. J. M., Marugg J. D., Verjans G. M. G. M., Weisbeek P. J. (1986) Charakterization and Structural Analysis of the Siderophore Produced by the PGPR *Pseudomonas putida* Strain WCS 358. In: Swinburn T. R. (ed.). Iron, Siderophores and Plant Diseases. Plenum Press, New York, S. 71
- [11] Pesmark M., Frejd T., Mattiasson B. (1990) *Biochemistry* **29**: 7348
- [12] Hohnagel D., Meyer J. M. (1988) *J. Bacteriol.* **170**: 4865
- [13] Schäfer H., Taraz K., Budzikiewicz H., *Z. Naturforsch.* (1991) **46c**: 398
- [14] Briskot G., Taraz K., Budzikiewicz H. (1986) *Z. Naturforsch.* **41c**: 497
- [15] Meyer J. M., Abdallah M. A. (1978) *J. Gen. Microbiol.* **107**: 319
- [16] Offort R. E. (1966) *Nature* **211**: 591
- [17] Wendenbaum S., Demange P., Dell A., Meyer J. M., Abdallah M. A. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**: 4877
- [18] Leimer K. L., Rice R. H., Gehrke C. W. (1977) *J. Chromatogr.* **141**: 121
- [19] Copper A. J. L., Ginos J. Z., Meister A. (1983) *Chem. Rev.* **83**: 321
- [20] Andereg G. A., L'Epplattenier F., Schwarzenbach G. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**: 1409
- [21] Briskot G. (1988) Dissertation. Univ. Köln
- [22] Wüthrich K. (1976) *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*. North-Holland, Amsterdam
- [23] Breitmaier E., Voelter W. (1987) *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. VCH, Weinheim
- [24] Bundi A., Wüthrich K. (1979) *Biopolymers* **18**: 285
- [25] Rabenstein D. L., Sayer T. L. (1976) *J. Magn. Res.* **24**: 27
- [26] Michels J., Benoni H., Briskot G., Lex J., Schmickler H., Taraz K., Budzikiewicz H., Korth H., Pulverer G., *Z. Naturforsch.* (im Druck)
- [27] Taraz K., Seinsche D., Budzikiewicz H., (1991) *Z. Naturforsch.* **46c**: 522
- [28] Meister A. (1953) *J. Biol. Chem.* **200**: 571
- [29] Jen J., Knoche W. (1969) *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **73**: 539
- [30] Copper A. J. L., Redfield A. G. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 527
- [31] Otani T. T., Meister A. (1957) *J. Biol. Chem.* **224**: 137
- [32] Viswanathan T. S., Johnson R. E., Fisher H. E. (1982) *Biochemistry* **21**: 339
- [33] Demange P., Wendenbaum S., Linget C., Mertz C., Cung M. T., Dell A., Abdallah M. A. (1990) *Biol. Metals* **3**: 155
- [34] Hersh L. B. (1971) *Biochemistry* **10**: 2884
- [35] (a) Mix H. (1961) *Z. physiol. Chem.* **325**: 106; (b) Mix H. (1961) *Z. Physiol. Chem.* **323**: 173; (c) Nakada H. J., Winehouse S. (1953) *J. Biol. Chem.* **204**: 831
- [36] Serjeaut E. P., Dempsey B. (1979) *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*. Pergamon Press, Oxford
- [37] Kolasa T. (1983) *Tetrahedron* **39**: 1753
- [38] Keller-Schierlein W., Deér A. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**: 1907
- [39] Tapuhi Y., Schmidt D. E., Lindner W., Karger B. L. (1981) *Anal. Biochem.* **115**: 123
- [40] Bax A., Freeman R. (1981) *J. Magn. Res.* **44**: 542
- [41] Bodenhauser G., Freeman R. (1977) *J. Magn. Res.* **28**: 471
- [42] Biemann K., Martin S. A. (1988) *Mass Spectrom. Rev.* **6**: 1
- [43] Roepstorff P., Fohlmann J. (1984) *Biomed. Mass Spectrom.* **11**: 601

Eingegangen 8. April 1991. Angenommen 25. April 1991