

**Strukturaufklärung der Siderophore und
massenspektrometrische Untersuchung eines ihrer
Rezeptorproteine von
Pseudomonas fluorescens G173**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Diana Uría Fernández
aus Oviedo/Spanien

Köln 2002

Berichtestatter: Prof. Dr. H. Budzikiewicz
Prof. Dr. H.-G. Schmalz
PD. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 16.05.2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis März 2002 im Institut für Organische Chemie II der Universität zu Köln und im Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Budzikiewicz für die interessante Aufgabenstellung und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Frau PD. Dr. Waffeschmidt, die die Durchführung der biochemischen Arbeiten betreute.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aho	N ⁵ -Acetyl-N ⁵ -hydroxyornithin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
Chr	Pyoverdinchromophor
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CM	Carboxymethyl oder Cytoplasma
c(OH)Orn	cyclo-N ⁵ -Hydroxyornithin
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
δ	Chemische Verschiebung
Dab	Diaminobuttersäure
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DSS	Natrium-(trimethylsilyl)-[d ₆]propansulfonat
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FepA	Rezeptor von <i>E. coli</i> für Enterobactin
FhuA	Rezeptor von <i>E. coli</i> für Ferrichrom
<i>fl.</i>	<i>fluorescens</i>
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
ID	Innendurchmesser
Int.	Intensität
IROMP	<i>Iron Regulated Outer Membrane Protein</i>
i.v.	In vacuo
J	Kopplungskonstante
ë	Wellenlänge
M	Molar

Abkürzungsverzeichnis

<i>m/z</i>	Masse/Ladung
MALA	Äpfelsäureamid
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
N	Normal
(OH)Asp	Hydroxyasparaginsäure
(OH)Orn	Hydroxyornithin
OM	Outer Membrane
Orn	Ornithin
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PP	Periplasma
p.A.	Pro analysis
pH	Potentia hydrogenii
PI	Positive Ionisierung
ppm	Parts per million
PSD	Post-source-decay
PVD	Pyoverdin
PyAc	Pyridiniumacetat
Q-TOF	Quadrupole-time-of-flight
RDA	Retro-Diels-Alder
rel. Int.	Relative Intensität
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RP	<i>Reversed Phase</i>
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SK	Seitenkette
S.	Seite

SUCA	Bernsteinsäureamid
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAP	N-Trifluoracetyl-O-isopropylester
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TOF	Time of flight
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
u	Atomare Masseneinheit
UV	Ultraviolett
Vis	Visible
vgl.	Vergleiche
WATERGATE	<i>Water supression by gradient-tailored excitation</i>
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	PSEUDOMONADEN	1
1.2	EISENTRANSPORT IN PSEUDOMONADEN.....	2
1.2.1	<i>Einleitung</i>	2
1.2.2	<i>Siderophore</i>	3
1.2.3	<i>Pyoverdine</i>	5
1.2.4	<i>Pyoverdin-verwandte Siderophore</i>	6
1.2.5	<i>Eisenaufnahme in Pseudomonaden</i>	7
1.2.6	<i>Das Pyoverdinrezeptorprotein</i>	9
2	AUFGABENSTELLUNG	11
3	SIDEROPHORE VON <i>Pseudomonas fluorescens</i> G173	13
3.1	ZUCHT DER BAKTERIEN UND ISOLIERUNG DER SIDEROPHORE	13
3.1.1	<i>Zucht der Bakterien</i>	13
3.1.2	<i>Aufarbeitung des Kulturmediums</i>	13
3.1.3	<i>Chromatographische Trennung</i>	14
3.1.4	<i>Dekomplexierung</i>	14
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER SIDEROPHORE.....	16
3.2.1	<i>UV/Vis-Spektroskopie</i>	16
3.2.2	<i>Aminosäurenanalyse</i>	17
4	MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	19
4.1	EINLEITUNG	19
4.1.1	<i>ESI-MS</i>	19
4.1.2	<i>Collision Induced Dissociation (CID)</i>	20
4.2	UNTERSUCHUNG DES XAD-EXTRAKTS AUS <i>P. FLUORESCENS</i> G173	24
4.2.1	<i>Molekulargewichtsbestimmung</i>	24
4.2.2	<i>Ion Trap-Oktapol-CID-Untersuchungen</i>	25
4.2.3	<i>Ion Trap-CID-Untersuchungen</i>	33
4.3	UNTERSUCHUNG DES XAD-EXTRAKTS AUS <i>P. FLUORESCENS</i> KOELN-G173.....	40
4.3.1	<i>Ion bei m/z 1209, 1: $[M+2H^+]^{2+} = 605,3$</i>	41
4.3.2	<i>Ion bei m/z 1235, 1: $[M+2H^+]^{2+} = 618,3$</i>	46
4.3.3	<i>Ion bei m/z 1251, 7: $[M+H^+]^+ = 1251,7$</i>	49
4.3.4	<i>Ion bei m/z 1207, 1 u: $[M+2H^+]^{2+} = 604,3$</i>	52
4.3.5	<i>Ion bei m/z 1223, 2: $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$</i>	55

4.3.6	Ion bei m/z 1249,2: $[M+2H^+]^{2+} = 625,3$	57
4.3.7	Ion bei m/z 1265,7 u: $[M+H^+]^+ = 1265,7$	59
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	62
5	NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	64
5.1	EINLEITUNG	64
5.2	PYOVERDIN G173	65
5.2.1	Zuordnung der 1H -Resonanzen von PVD G173	65
5.2.2	Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen von PVD G173	70
5.2.3	Sequenzierung der Peptidkette	74
5.3	FERRIBACTIN G173	76
5.3.1	Zuordnung der 1H -NMR-Resonanzen von Ferribactin G173	76
5.3.2	Zuordnung der ^{13}C -NMR-Resonanzen von DFB G173	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	81
6.1	<i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> G173	81
6.2	<i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> KOELN-G173	82
7	ISOLIERUNG DES IROMPs	83
7.1	ZUCHT DER BAKTERIEN	83
7.2	ISOLIERUNG DER ÄUßEREN MEMBRANEN	84
7.3	PROTEINBESTIMMUNG	85
7.3.1	Mikro-Lowry-Assay	85
7.4	ELEKTROPHORETISCHE VERFAHREN	86
7.4.1	Einleitung	86
7.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	87
8	MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN	88
8.1	MALDI-TOF-MASSENSPEKTROMETRIE	88
8.1.1	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization	88
8.1.2	Time-of-flight-Analysator	90
8.2	MALDI-MS-UNTERSUCHUNGEN AN DEM IROMP AUS <i>P. FL.</i> -KG173	92
8.2.1	Peptide mass fingerprint	92
8.2.2	Vergleich des Rezeptorproteins aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und <i>P. putida</i> WCS358 ..	93
8.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR SEQUENZIERUNG DES IROMPs	95
8.3.1	Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie	95
8.3.2	Q-TOF-Untersuchungen am IROMP -KG173	96
8.4	DATENBANKSUCHE	101

8.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
9	AUSBLICK.....	103
10	EXPERIMENTELLER TEIL	105
10.1	VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN.....	105
10.1.1	<i>Massenspektrometrische Instrumente.....</i>	<i>105</i>
10.1.2	<i>Spektroskopische Geräte</i>	<i>105</i>
10.1.3	<i>Geräte für analytische Trennungen.....</i>	<i>106</i>
10.1.4	<i>Sonstige Geräte.....</i>	<i>107</i>
10.1.5	<i>Materialien</i>	<i>108</i>
10.1.6	<i>Chemikalien.....</i>	<i>108</i>
10.1.7	<i>Bakterienstamm.....</i>	<i>108</i>
10.2	MASSENSPEKTROMETRISCHE MESSUNGEN.....	109
10.2.1	<i>ESI-Massenspektrometrie.....</i>	<i>109</i>
10.2.2	<i>MALDI-Massenspektrometrie.....</i>	<i>109</i>
10.2.3	<i>Q-TOF-Massenspektrometrie.....</i>	<i>110</i>
10.3	ISOLIERUNG DER SIDEROPHORE AUS <i>P. FL. G173</i> UND <i>P. FL. KOELN-G173</i>	111
10.3.1	<i>Mikrobiologische Arbeiten</i>	<i>111</i>
10.3.2	<i>Adsorption an XAD-4-Harz.....</i>	<i>111</i>
10.3.3	<i>Chromatographische Auftrennung der Ferrisiderophore</i>	<i>112</i>
10.3.4	<i>Dekomplexierung der Ferri-Siderophore.....</i>	<i>113</i>
10.3.5	<i>RP-HPLC</i>	<i>114</i>
10.4	ISOLIERUNG DES REZEPTORPROTEINS G173	115
10.4.1	<i>Zucht der Bakterien</i>	<i>115</i>
10.4.2	<i>Isolierung der äußeren Membranen.....</i>	<i>115</i>
10.4.3	<i>Micro-Lowry Proteinbestimmung.....</i>	<i>115</i>
10.4.4	<i>SDS-PAGE</i>	<i>116</i>
10.4.5	<i>Tryptische Verdauung.....</i>	<i>117</i>
10.5	SPEKTROSKOPIE	118
10.5.1	<i>UV/Vis-Spektroskopie.....</i>	<i>118</i>
10.5.2	<i>NMR-Spektroskopie</i>	<i>118</i>
10.6	AMINOSÄUREANALYSE	119
10.6.1	<i>Totalhydrolyse</i>	<i>119</i>
10.6.2	<i>Partialhydrolyse.....</i>	<i>119</i>
10.6.3	<i>TAP-Derivatisierung der Hydrolysate.....</i>	<i>119</i>
10.6.4	<i>GC/MS Analyse</i>	<i>119</i>

11	LITERATUR	120
12	ANHANG	136
12.1	EI-MASSENSPEKTRUM DER TAP-DERIVATISIERTEN AMINOSÄUREN	136
12.2	IN SOURCE-CID-OKTAPOL-ESI-MASSENSPEKTREN.....	138
12.3	NMR-SPEKTREN.....	141
12.4	PREDICT PROTEIN-ERGEBNISSE	144
12.4.1	<i>Pseudomonas putida</i> WCS358.....	144
12.4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	147

1 EINLEITUNG

1.1 Pseudomonaden

Morphologische Merkmale der Familie Pseudomonadaceae sind eine negative Gram-Färbung, eine stäbchenförmige Gestalt mit polarer Begeißelung (**Abb. 1.1**), obligat aerobes Wachstum bei oxidativem Atmungsstoffwechsel und die Fähigkeit, fast jede organische Verbindung als Kohlenstoffquelle zu verwenden.

Die Unterscheidung zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien erfolgt anhand ihres Verhaltens bei der Färbung nach Gram. Während Gram-positiven Bakterien nur mit einer Zellwand umgeben sind, sind die Gram-negativen zusätzlich von einer Zellmembran umhüllt, die ein Eindringen des Farbstoffs verhindert.

Die Gattung *Pseudomonas* umfaßt derzeit ca. 130 Arten [1]. Die zunehmende Anzahl der Stämme hat dabei in den letzten Jahren zu zahlreichen Reklassifizierungen geführt [2]. Die Gattung wird zur Zeit in fünf rRNA-Homologie-Gruppen unterteilt, deren erste und größte fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Pseudomonaden umfaßt [3]. Zu den sogenannten fluoreszierenden Pseudomonaden zählen u.a. die Arten *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* und *P. putida*, sowie die humanpathogene *P. aeruginosa* und die phytopathogenen *P. syringae* und *P. tolaasii*. Die zweite Untergruppe der nicht fluoreszierenden Pseudomonaden umfaßt u.a. die Arten *P. alcaligenes*, *P. fragi* und *P. stutzeri* [1-3].

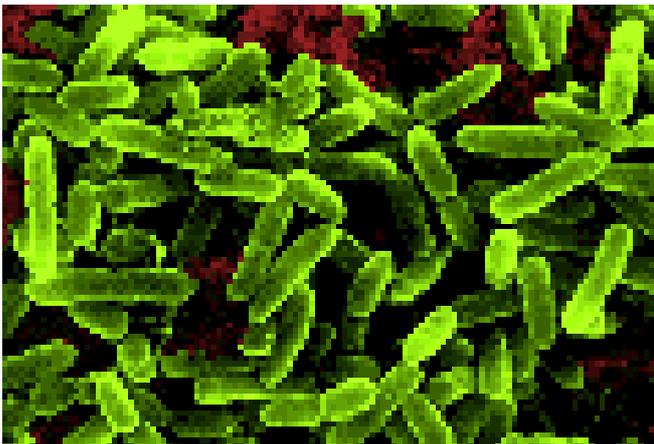


Abb. 1.1 *Pseudomonas aeruginosa* [4]

1.2 Eisentransport in Pseudomonaden

1.2.1 Einleitung

Eisen ist für Pro- und Eukaryoten ein essentielles Element [5]. Die biologische Bedeutung des Eisens liegt in seiner Eigenschaft, unter physiologischen Bedingungen in zwei stabilen Oxidationsstufen zu existieren. Das Fe(II)/Fe(III)-Redoxpotential wird durch organische Komplexliganden beeinflusst, was zu einer Rolle dieser Komplexe als Katalysatoren im Bereich der biochemischen Redoxreaktionen führt [6]. Eisen ist an dem Transport von Sauerstoff (Hämoglobin, Myoglobin) sowie am Elektronentransport (Cytochrome in der Atmungskette) beteiligt. Die eisenhaltigen Proteine und Eisen-Schwefel-Proteine spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Oxidation organischer Substrate [5, 6].

Während höhere Organismen ihren Eisenbedarf durch die Nahrungsaufnahme decken, sind Bakterien darauf angewiesen, Eisen aus dem Nährmedium aufzunehmen. Mikroorganismen benötigen zur Deckung ihres Bedarfs an Eisen Konzentrationen von 10^{-7} mol l⁻¹ [7, 8, 9]. Unter anaeroben (reduzierenden) Bedingungen ist diese Konzentration der Eisenionen kein limitierender Wachstumsfaktor, da Eisen in Form von Eisen(II)-Ionen vorliegt und deren Verbindungen in Wasser gut löslich sind. Unter aeroben (oxidierenden) Bedingungen und bei pH-Werten größer als zwei fällt Eisen in wässriger Lösung als Fe₂O₃ · nH₂O aus. Bei physiologischem pH-Wert beträgt die Konzentration an Eisen(III)-Ionen ca. 10^{-17} mol l⁻¹ und ist aus diesem Grund ein wachstumslimitierender Faktor.

Daher produzieren viele Mikroorganismen unter Eisenmangelbedingungen niedermolekulare, wasserlösliche Verbindungen, um Eisen gezielt aufzunehmen [10, 11, 12, 13]. Diese Chelatoren werden in das extrazelluläre Medium ausgeschieden, wo sie Eisen (III)-Ionen mit hoher Affinität binden. Diese Substanzen werden als Siderophore (griech. Eisenträger), bezeichnet [14, 15, 16].

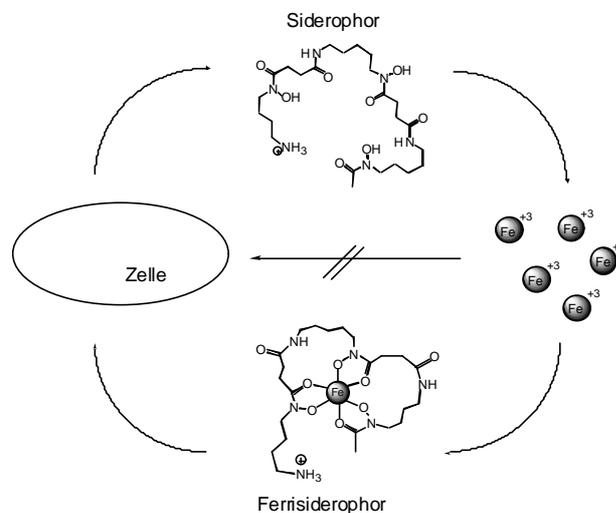


Abb. 1.2 Beispiel für den Transport von Eisen (III) in eine Zelle mit Hilfe eines Siderophores

1.2.2 Siderophore

Die Siderophore lassen sich nach Art ihrer Liganden in Hydroxamat-, Catecholat- und Siderophore mit gemischten Liganden unterteilen (**Abb. 1.3**). Eine vierte Gruppe wäre die der α -Hydroxycarbonsäuren, wie z.B. die β -Hydroxy-asparaginsäure.



Abb. 1.3 Beispiele für Hydroxamat- und Catecholat-Ferrisiderophore

Die Komplexbildungskonstante für Catecholate ist bei neutralem pH höher als die der Hydroxamate, die aber aufgrund der Protonierung des Catecholats bei niedrigen pH-Werten günstigere Bildungskonstanten zeigen.

1.2.2.1 Hydroxamat-Siderophore

Die Hydroxamat-Siderophore sind normalerweise Derivate von α -Amino- ω -hydroxyamino-alkanen oder von N^{ω} -Hydroxyamino-säuren. Beispiele sind Ferrioxamine, Ferrichrom (**Abb. 1.4**), Coprogen und Fusarinin [17].

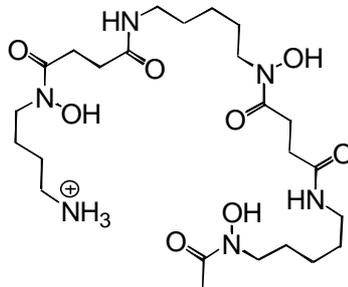


Abb. 1.4 Ferrichrom

1.2.2.2 Catecholat-Siderophore

Fast alle Catecholat-Siderophore leiten sich von der 2,3-Dihydroxybenzoesäure ab. Der Prototyp der Catecholat-Siderophore ist das Enterobactin oder auch Enterochelin genannt. Dies ist ein cyclischer Triester aus N -(2,3-Dihydroxy-benzoyl)- L -serin (**Abb. 1.5**). Das Enterobactin wird nicht von Pseudomonaden sondern von Enterobakterien hergestellt, kann aber auch von einigen Pseudomonas-Stämme wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* genutzt werden [17, 18].

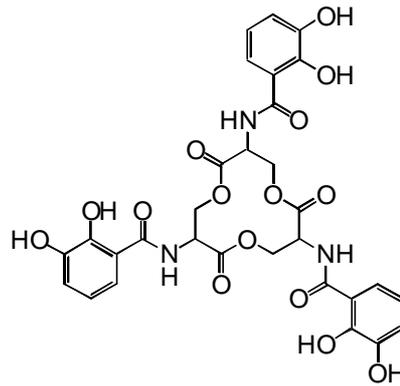


Abb. 1.5 Enterobactin

1.2.2.3 Siderophore mit gemischten Liganden

Eine sehr große Gruppe von Siderophoren besitzt unterschiedlichen Liganden. Beispiele hierfür sind das Rhizobactin und das Pyochelin (**Abb. 1.6**) [17, 19].

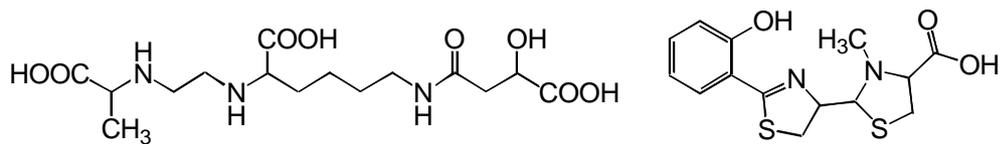


Abb. 1.6 Rhizobactin und Pyochelin

Zur Klasse der Siderophore mit unterschiedlichen Liganden zählen auch die Pyoverdine und ihre Derivate. Diese sind die wichtigsten Siderophore der fluoreszierenden Pseudomonaden (**Abb. 1.7**).

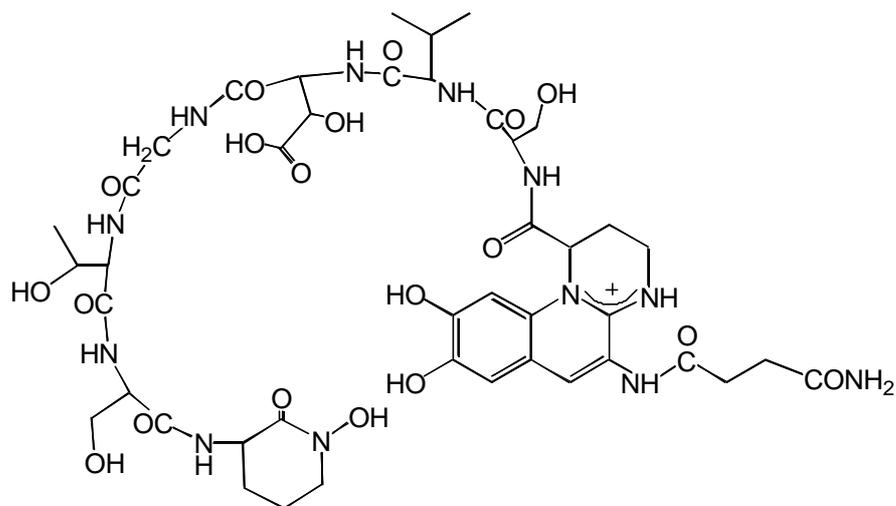


Abb. 1.7 Pyoverdin aus *Pseudomonas fluorescens* BTP2

1.2.3 Pyoverdine

1.2.3.1 Struktur

Pyoverdine sind Chromopeptide, die aus drei Struktureinheiten aufgebaut sind (**Abb. 1.8**):

- Dem [(1*S*)-5-Amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1*H*-pyrimido-[1,2]chinolin-1-carbonsäure]-Chromophor, der für die charakteristische Färbung und Fluoreszenz der eisenfreien Siderophore verantwortlich ist. Die Catecholfunktion des Chromophors stellt eine zweizählige Koordinationstelle für Eisen(III) zur Verfügung.

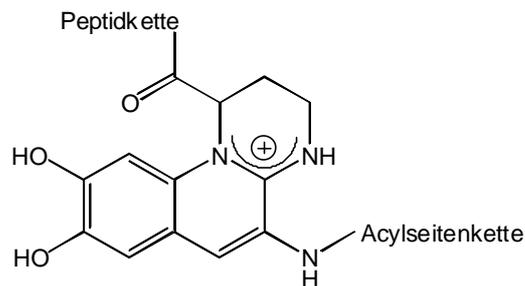


Abb. 1.8 Schematische Darstellung eines Pyoverdins

- Einer Acylseitenkette, bei der es sich um eine Dicarbonsäure des Citratcyclus oder um ein biosynthetisches Folgeprodukt handelt [20]. Als Acylseitenketten wurden bisher Bernsteinsäure und Äpfelsäure und deren Monoamide sowie Glutaminsäure und 2-Ketoglutaronsäure gefunden.
- Einer N-terminal an die Carboxylfunktion des Chromophors gebundenen Peptidkette aus 6-12 Aminosäuren, die z. T. D-konfiguriert und z. T. nicht proteinogen sind. Ausnahmen sind einige Pyoverdine wie z.B. das Pseudobactin 7SR1 [21], deren Peptidkette über die α -Aminofunktion von Lysin amidisch an den Chromophor gebunden ist. Bei vielen Pyoverdinen wurden cyclische Untereinheiten in der Peptidkette gefunden. Dabei kann es sich um cyclo- N^5 -Hydroxyornithin als C-terminale Aminosäure [22] oder um eine Tetrahydropyrimidinstruktur aus Diaminobuttersäure und der Carboxylfunktion der benachbarten Aminosäure [23, 24] handeln. Größere Cyclen entstehen durch amidische Verknüpfungen der C-terminalen Carboxylfunktion mit einer α -Aminofunktion von Lysin [25, 26] oder durch Esterverknüpfung der C-terminalen Carboxylfunktion mit einer Hydroxylfunktion von Serin oder Threonin zu einem Cyclopeptid [21, 27]. Die Peptidkette stellt zwei zweizählige Koordinationstellen zu Verfügung. Dabei handelt es sich um Hydroxamsäuren, wie z.B. N^5 -Formyl- N^5 -hydroxyornithin, und α -Hydroxycarbonsäuren, wie z.B. α -Hydroxyasparaginsäure.

1.2.4 Pyoverdin-verwandte Siderophore

Unter Eisenmangelbedingungen produzieren viele Pseudomonaden neben den Pyoverdinen andere strukturell verwandte Siderophore, die sich im Chromophor, nicht aber in der Peptidkette unterscheiden. Die bisher nachgewiesenen Chromophortypen sind in **Abb. 1.9-12** dargestellt. Sowohl das Ferribactin, das 5,6-Dihydropyoverdin als auch die 5,6-Dihydropyoverdin-7-sulfonsäure werden bei der Biosynthese der Pyoverdine produziert [28, 29, 30].

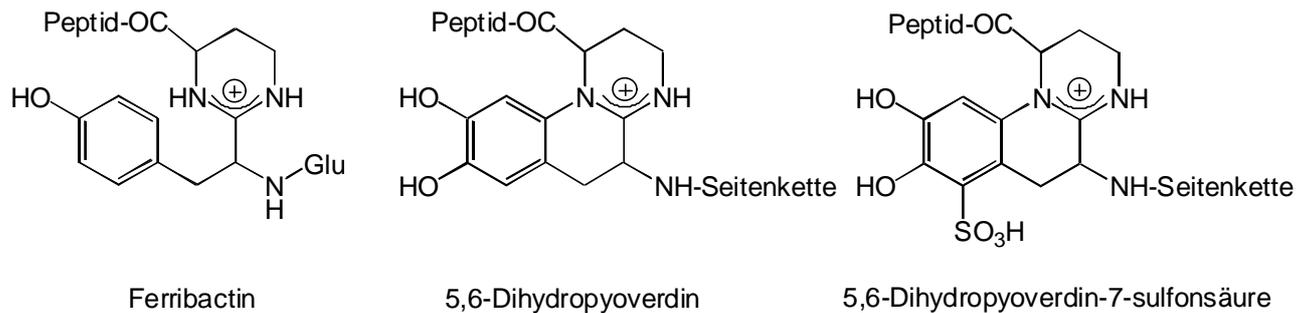


Abb. 1.9 Zwischenprodukte bei der Biosynthese von Pyoverdinen

Der Ferribactinchromophor wird aus L-2,4-Diaminobuttersäure und D-Tyrosin gebildet [31, 32]. Dies konnte durch Einfütterung von markierter (4-¹⁵N)-Diaminobuttersäure nachgewiesen werden: Der Ferribactinchromophor wird zunächst zum Trihydroxyderivat oxidiert und anschließend über eine Sulfonsäurezwischenverbindung cyclisiert. Im letzten Schritt wird das 5,6-Dihydropyoverdin zum Pyoverdin oxidiert.

Einige Bakterienstämme produzieren Isopyoverdine [33, 34, 35] (**Abb. 1.10**). Da auch 5,6-Dihydroisopyoverdine nachgewiesen werden konnten [36], wird für die Isopyoverdine ein analoger Biosyntheseweg wie für die Pyoverdine vorgeschlagen [29, 32].

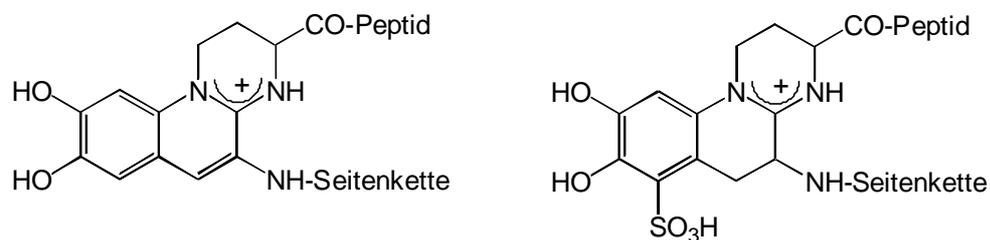


Abb. 1.10 Isopyoverdin und 5,6-Dihydroisopyoverdin-7-sulfonsäure

Pseudomonaden können auch Azotobactine produzieren (**Abb. 1.11**). Diese Siderophore enthalten einen Chromophor, der identisch mit dem des Azotobactins aus *Azotobacter* Stämmen ist [37, 38].

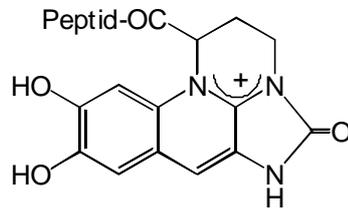


Abb. 1.11 Azotobactin

Andere Nebenkomponenten sind die Succinopyoverdine (**Abb. 1.12**). Ihr Chromophor unterscheidet sich von dem Pyoverdinchromophor durch das Auftreten eines Achtrings. Dieser lässt sich formal als Produkt einer Cyclisierung der Bernsteinsäureseitenkette mit dem Stickstoffatom des Chromophors Chr-4N erklären [39, 40].

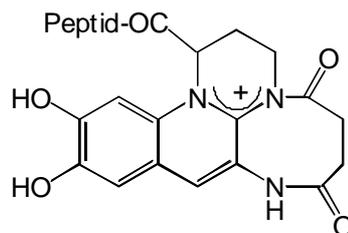


Abb. 1.12 Succinopyoverdin

1.2.5 Eisenaufnahme in Pseudomonaden

Unter Eisenmangel wird bei Pseudomonaden die Ausbildung von Siderophoren und spezifischen Membranrezeptoren, den sogenannten **Iron Regulated Outer Membrane Proteins** (IROMP's), beobachtet. Diese Rezeptorproteine dienen als Aufnahmesystem für die Siderophore. Sie erkennen die verschiedenen Ferrisiderophore (z.B. Transferrin, Häm oder Ferripyoverdin). Der Eisentransport für *Pseudomonas* ist in **Abb. 1.13** schematisch dargestellt [13, 41, 42].

Wenn die Rezeptorproteine (1) den Ferrisiderophor erkannt haben, findet in ihm eine Konformationsänderung statt. Die Energie für die Konformationsänderung wird von dem Ton-Komplex (3) produziert. Die Eisenkomplexe werden durch die äußere Membran (OM) in das Periplasma (PP) transportiert [14, 43]. Dieser Transport ist hochspezifisch, da die Struktur des Rezeptorproteins für jeden Siderophor unterschiedlich ist.

Der zweite Schritt ist der Transport durch die cytoplasmatische Membran (CM). Das Transportprotein (4 bzw. 5) besitzt keine so hohe Spezifität wie das Rezeptorprotein und ist in mehreren Fällen das gleiche für unterschiedlichen Siderophore.

Siderophore wie Lactoferrin oder Häm können von mehreren *Pseudomonas* Stämmen aufgenommen werden, was auf ein gleiches Rezeptorprotein hindeutet.

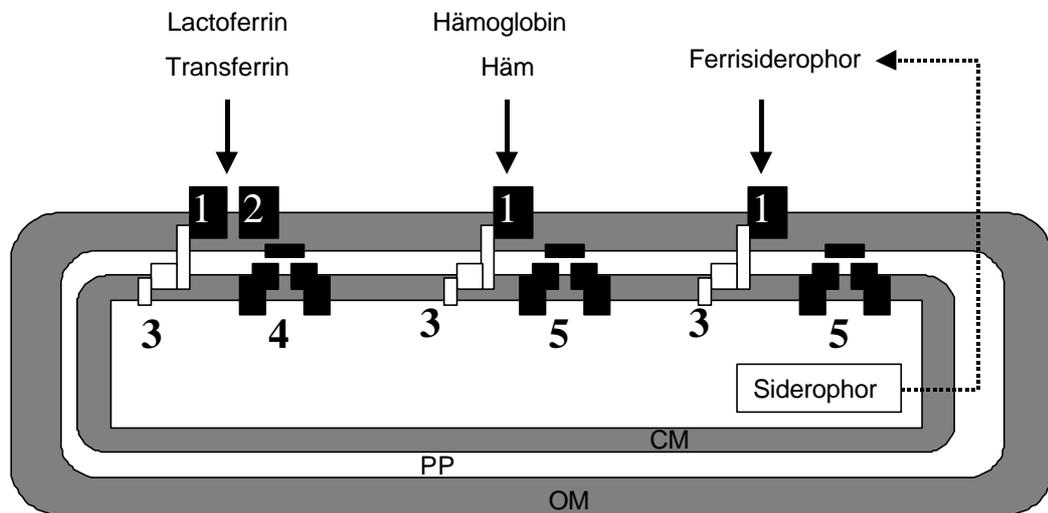


Abb. 1.13 Eisentransport in Gram-negativen Bakterien

- 1 Rezeptorprotein
- 2 Protein verbunden mit dem Lactoferrin- und Transferrin-Transport
- 3 Ton Komplex
- 4 Protein verbunden mit dem Lacto- und Transferrintransport durch die CM
- 5 Protein verbunden mit dem Siderophor- und Hämtransport durch die CM

Die Peptidkette der Siderophore ist in der Regel stammspezifisch. Bisher wurde nur in einigen Fällen beobachtet, daß unterschiedliche Stämme das gleiche Pyoverdin produzieren [26, 44, 45].

Aus Kreuzfütterungsexperimenten ist bekannt, daß einige Stämme in der Lage sind, einen nicht selbst produzierten Siderophor aufzunehmen [22, 46]. Eine Möglichkeit ist die Ausbildung eines entsprechenden Rezeptors auf der Zelloberfläche, der den fremden Siderophor erkennt. Dieser Mechanismus konnte für die Aufnahme von Enterobactin, einem von *Escherichia coli* produzierten Siderophor, durch *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden [18].

Eine zweite Möglichkeit, stammfremde Siderophore zu nutzen, besteht in der Erkennung durch den Rezeptor aufgrund struktureller Ähnlichkeiten des fremden mit dem stammeigenen Siderophor [47]. Für die Erkennung am Rezeptor ist nicht die gesamte Peptidsequenz von Bedeutung, sondern nur einige Teilsequenzen, vermutlich der Endbereich der Peptidkette [48, 49].

1.2.6 Das Pyoverdininrezeptorprotein

1.2.6.1 Integrale Membranproteine

Die Rezeptorproteine befinden sich bei Gram-negativen-Bakterien an der äußeren Membran. Die Zellmembranen bestehen aus Lipiden und Proteinen in einem Gewichtsverhältnis, das von 4:1 bis zu 1:4 variieren kann. Die Membranproteine sind in die Lipiddoppelschicht eingetaucht (**Abb. 1.14**). Ihre hydrophoben Teilbereiche sind in das Innere der Membran eingebettet, während die hydrophilen Teile der Oberfläche zugewandt sind.

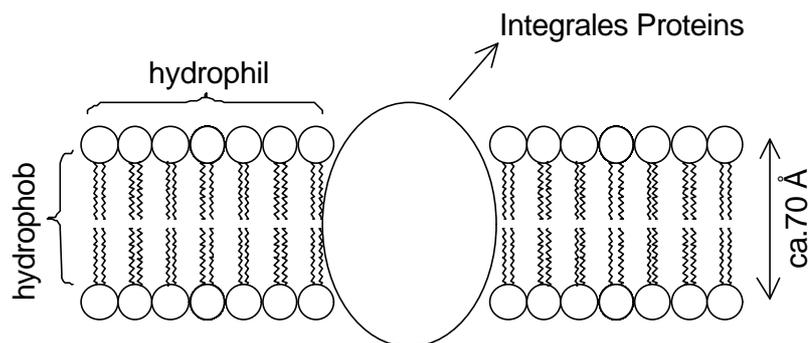


Abb. 1.14 Lipiddoppelschicht

Die Membranproteine werden als integral oder peripher klassifiziert, je nachdem ob sie in das lipophile Innere der Lipiddoppelschicht hineinreichen oder nicht. Zu den **integralen Proteinen** gehören die Proteine, die nur zum Teil in das Membraninnere hineinragen (z.B. viele Membranenzyme), und die Proteine, die sich durch die ganze Membran hindurch erstrecken. Letztere spielen vor allem eine Rolle für Strukturen, durch die das Zellinnere informiert wird über Veränderungen außerhalb der Zelle (Rezeptorsysteme), sowie als Bausteine für Kanäle und Poren, durch die Ionen und hydrophile Moleküle die Membran passieren können (z. B. Transportproteine) [50].

Integrale Proteine sind durch hydrophobe Wechselwirkungen fest an die Membran gebunden und lassen sich nur durch membranzerstörende Substanzen abtrennen: Organische Lösungsmittel, Detergentien und chaotrope Agentien, welche die Wasserstruktur zerstören. Manche integrale Proteine binden so fest an Lipide, daß sie nur unter denaturierenden Bedingungen abgetrennt werden können [51].

Aus diesen Gründen gibt es zur Zeit sehr wenig Informationen über die integrierten Proteine. Die Aufklärung der Siderophor-Transportproteine von *Escherichia coli* (FepA: Ferrienterobactinrezeptor und FhuA: Ferrichromrezeptor) [52, 53, 54] zusammen mit zwei Ferripyoverdininrezeptorproteinen für *P. aeruginosa* PAO1 und *P. putida* WCS357 sind fast die einzigen aktuellen Daten zu diesem Thema [55, 56].

1.2.6.2 Struktur der Siderophor-Rezeptorproteine

Bei den Ferrisiderophor-Rezeptorproteinen handelt es sich in allen Fällen um α -Faß-Proteine mit ca. 20 α -Falten-Transmembransegmenten, die sich zu einem Faß zusammenfügen (**Abb. 1.15**). Dieses Faß besteht ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren und befindet sich innerhalb der äußeren Membran.

Aus diesem Faß ragen mehrere α -Helix-Loops, die für die Erkennung und Bindung des Siderophors verantwortlich sind [57].

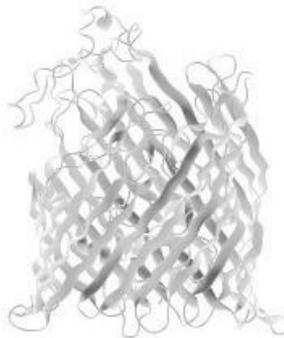


Abb. 1.15 Struktur des Siderophorrezeptorproteins FepA aus *E. coli*

Bei diesen Proteinen ist der N-Terminus innerhalb des Fasses und hilft bei der Bindung der Siderophore [57]. Die Domäne ist von ca. 40 Wasserstoffbrücken und mehreren Salzbrücken an den α -Falten festgehalten und blockiert das Innere des Fasses. Wenn das Ferrisiderophor sich in der Nähe des N-Terminus befindet, findet eine Konformationsänderung statt und der N-Terminus läßt den richtigen Siderophor in das Periplasma eindringen [57]. Die Bindung von Ferrichrom an sein Rezeptorprotein FhuA in *E. coli* ist beobachtet worden und ist in **Abb. 1.16** dargestellt [52, 53].

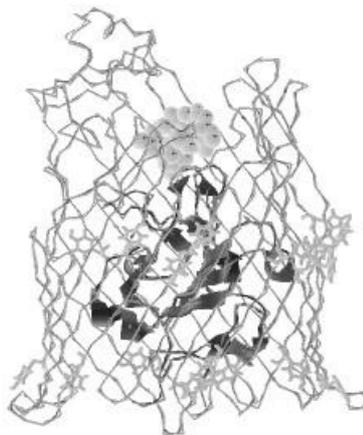


Abb. 1.16 Bindung von Ferrichrom an den FhuA-Rezeptor von *E. coli*

2 AUFGABENSTELLUNG

Aus Eisenmangelkulturen des von Dr. J.-M. Meyer (Laboratoire de Microbiologie, Université Louis-Pasteur, Straßburg/Frankreich) übernommenen Stammes *Pseudomonas fluorescens* G173 konnte ein bisher unbekanntes Pyoverdin isoliert werden. Für dieses Pyoverdin existierte bereits ein durch massenspektrometrische Sequenzierung ermittelter Strukturvorschlag (**Abb. 2.1**), der durch weitere Untersuchungen bestätigt werden sollte [58].

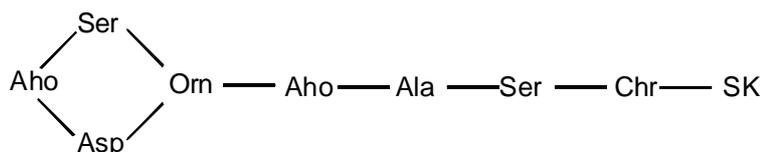


Abb. 2.1 Massenspektrometrisch ermittelter Strukturvorschlag für das Pyoverdin G173

Die vorgeschlagene Struktur unterscheidet sich von den bisher bekannten Peptidsiderophoren, die in zwei Gruppen geteilt werden können.

- Die erste Gruppe besteht aus linearen Pyoverdinen oder Pyoverdinen, bei denen c(OH)Om die C-terminale Aminosäure ist (z. B. WCS358, **Abb. 2.2**).



Abb. 2.2 Struktur des Pyoverdins aus *Pseudomonas putida* WCS358

- Die zweite Gruppe besteht auf Pyoverdinen mit einem cyclopeptidischen C-Terminus (Tri- oder Tetrapeptide), bei denen der Cyclus durch eine Amidbindung zwischen der α Aminogruppe eines Lysins und der C-terminalen Carboxylgruppe geschlossen ist. Die zweite komplexierende Aminosäure befindet sich neben Lysin (z. B. PAO1, **Abb. 2.3**).

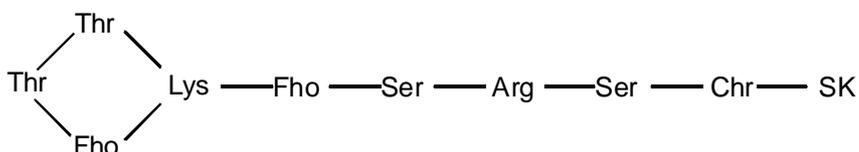


Abb. 2.3 Struktur des Pyoverdins aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Die Ferripyoverdine werden von einem Rezeptorprotein erkannt und in die Zellen transportiert. Die Primärstrukturen für die Rezeptorproteine für *P. aeruginosa* PAO1 und *P. putida* WCS358 sind bekannt [55, 56].

Bei dem Pyoverdin G173 handelt es sich um das erste mit einer cyclotetrapeptidischen Struktur, in welcher der Cyclus nicht durch Lysin, sondern durch Ornithin geschlossen ist. Außerdem befindet sich die zweite komplexierende Aminosäure nicht neben Ornithin. Diese Veränderungen führen zu einer neuen dreidimensionalen Struktur, welche die erfolgreiche Kreuzfütterung mit verwandten Stämmen verhindert.

Ziel dieser Arbeit war die Bestätigung des auf massenspektrometrischen Untersuchungen beruhenden Strukturvorschlages für das Pyoverdin aus *Pseudomonas fluorescens* G173 und die Isolierung und massenspektrometrische Untersuchung seines Rezeptorproteins. Während der Arbeit mutierte der Stamm vermutlich spontan und der neue Stamm produzierte neue Siderophore. Diese Siderophore sollten identifiziert und ihre Struktur aufgeklärt werden.

Die folgende Arbeit gliedert sich damit in zwei Teile. Teil I beschäftigt sich mit der Strukturaufklärung der produzierten Siderophore und Teil II mit der Isolierung und Untersuchung des Rezeptorproteins.

TEIL I

STRUKTURAUFKLÄRUNG DER SIDEROPHORE VON

***Pseudomonas fluorescens* G173**

UND

***Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173**

3 SIDEROPHORE VON *Pseudomonas fluorescens* G173

3.1 Zucht der Bakterien und Isolierung der Siderophore

3.1.1 Zucht der Bakterien

Der Bakterienstamm *Pseudomonas fluorescens* G173 wurde von Dr. Meyer (Universität Straßburg) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm mutierte vermutlich spontan. Die Mutante wird als *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 bezeichnet. Beide Stämme unterscheiden sich in den von ihnen produzierten Siderophoren.

Die Zucht der Stämme erfolgte unter Eisenmangelbedingungen auf Minimalmedium. Durch die Verwendung eines solchen Minimalmediums wird die Gefahr einer Fremdinfection mit anderen Bakterien oder Pilzen vermieden. Als Kohlenstoffquelle wurde Bernsteinsäure verwendet. Nährsalze wurden in Form von Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat und Kaliumsulfat zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Aufarbeitung des Kulturmediums

Nach Beendigung der Zucht wurden die Bakterienzellen durch Tangentialfiltration oder durch Zentrifugierung abgetrennt. Um die in Pyoverdinen enthaltenen Catecholgruppen vor Oxidation zu schützen und eine mögliche Hydrolyse der eventuell vorhandenen Hydroxamsäurefunktionen zu vermeiden, wurde die Kulturlösung mit einem Überschuß an Eisencitrat versetzt und so die Siderophore in ihre Ferri-Komplexe übergeführt. Zur Vermeidung eines weiteren Bakterienwachstums wurde dem Überstand Natriumazid zugesetzt.

Die Isolierung von Siderophoren kann durch Adsorption an XAD-4 erfolgen. Bei diesem Harz handelt es sich um ein vernetztes Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol, dessen aromatische Gruppen hydrophobe Verbindungen durch van der Waals-Kräfte adsorbieren [59]. Salze und andere polare Verbindungen werden von den an XAD-adsorbierten hydrophob Substanzen durch Waschen mit Wasser abgetrennt.

Die Ferrisiderophore wurden an XAD-4-Harz adsorbiert, von Salzen befreit und mit einem Lösungsmittelgemisch Methanol/Wasser (70:30, v:v) eluiert. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum zur Trockne eingengt.

3.1.3 Chromatographische Trennung

Die im XAD-Extrakt enthaltenen Ferrisiderophore lassen sich durch Kombination von Gelfiltrations- und Ionenaustauschchromatographie isolieren.

Die Gelfiltration dient zur Befreiung des XAD-Extrakts von niedermolekularen Substanzen. Dabei werden alle UV-aktiven Fraktionen aufgefangen.

3.1.3.1 XAD-Extrakt aus *Pseudomonas fluorescens* G173

Nach der Gelfiltration wurden die Ferrisiderophore durch Ionenaustauschchromatographie getrennt. Diese chromatographische Auftrennung der XAD-Extrakte ist in **Abb. 3.1** wiedergegeben.

Der ursprüngliche Stamm *P. fl.* G173 produzierte ein Gemisch, bei dessen Hauptkomponenten es sich um die Pyoverdine mit Bernsteinsäureamid und Äpfelsäureamid als Seitenkette handelt; als Nebenkomponten wurden Azotobactin, Ferribactin und Succinopyoverdin gefunden. Das SUCA-Pyoverdin und das Ferribactin wurden mittels NMR und ESI-MS untersucht, während die anderen Siderophore nur durch ESI-MS identifiziert und charakterisiert wurden.

3.1.3.2 XAD-Extrakt aus *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173

Der vermutlich mutierte Stamm *P. fl.* Koeln-G173 produziert hauptsächlich ein Gemisch aus verschiedenen Ferribactinen, die sich durch ihre Seitenkette unterscheiden. Bisher wurde nur Glutaminsäure als Seitenkette für Ferribactine gefunden, wobei in diesem Fall Variationen der Glutaminsäure mittels ESI-MS identifiziert werden konnten. Diese neuen Metaboliten und ihre mögliche biologische Bedeutung werden im Kapitel 4.4 diskutiert.

Die Trennung der neuen Ferribactine konnte auf Grund der großen Ähnlichkeit mit dem gewöhnlichen Ferribactin nicht durchgeführt werden. Der XAD-Extrakt wurde durch Gelchromatographie von kleinen Pyoverdinmengen und niedermolekularen Substanzen befreit und direkt dekomplexiert.

3.1.4 Dekomplexierung

Die Dekomplexierung der eisenhaltigen isolierten Siderophore erfolgte nach zwei bekannten Verfahren.

Die Pyoverdine, das Azotobactin und das Succinopyoverdin wurden an Sep-Pak RP₁₈ adsorbiert und mit Oxalatpuffer dekomplexiert. Nach Spülen mit Wasser wurden die Siderophore desorbiert [60].

Da Ferribactine von RP₁₈ Material nur mäßig adsorbiert werden, wurden sie mit 8-Hydroxychinolin dekomplexiert und anschließend durch Biogelfiltration gereinigt [61].

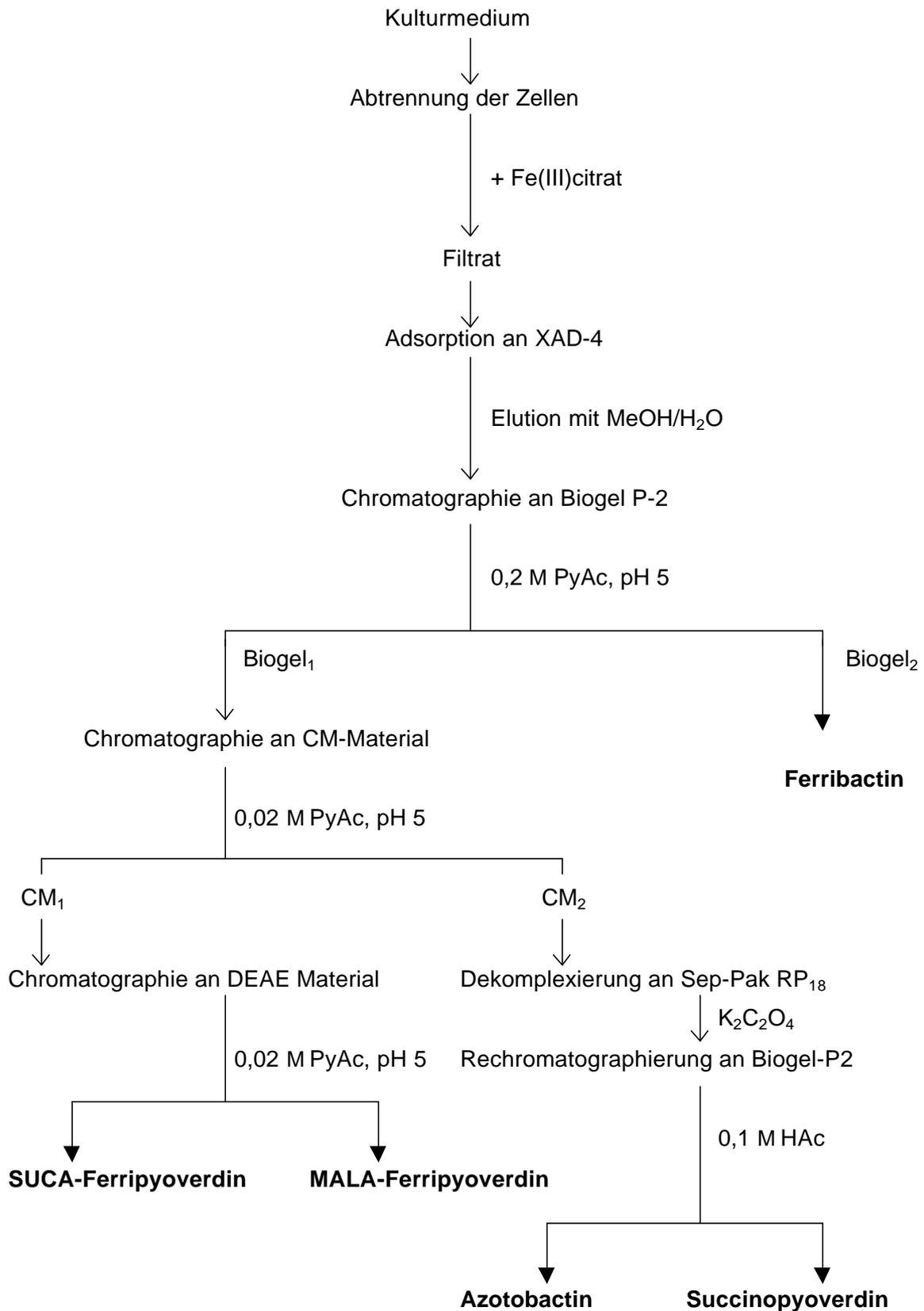


Abb. 3.1 Isolierung der Siderophore aus *Pseudomonas fluorescens* G173

3.2 Charakterisierung der Siderophore

3.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Pyoverdine und strukturell verwandte Siderophore lassen sich anhand ihrer UV/Vis-Spektren unterscheiden. In **Abb. 3.2** und **Abb. 3.3** sind die UV/Vis Spektren des eisenfreien Pyoverdins G173 und des Ferribactins G173 wiedergegeben. Sie zeigen in beiden Fällen das für diese Siderophore charakteristischen Absorptionsverhalten [62].

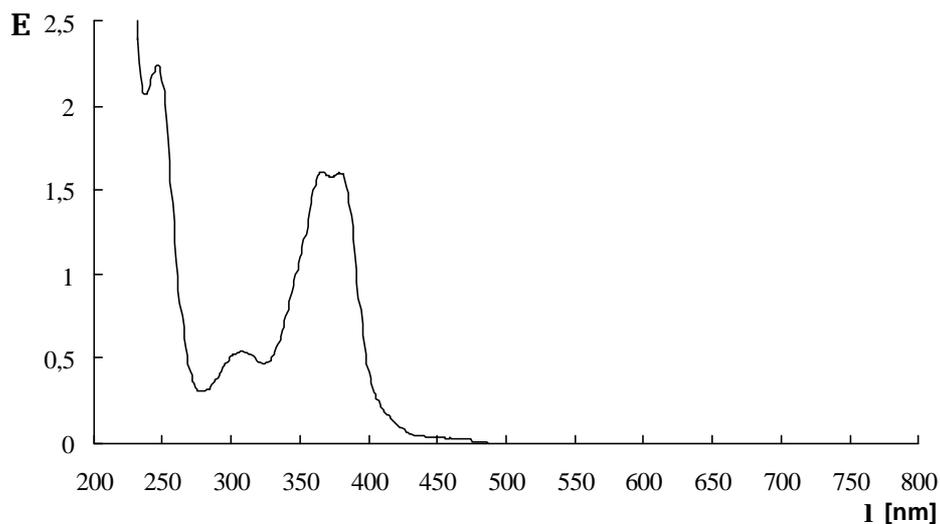


Abb. 3.2 UV/Vis-Spektrum des Pyoverdins G173 in Phosphatpuffer, pH 4,5

Die Absorptionsmaxima des Pyoverdins G173 liegen bei pH 4,5 bei 375 nm und 382 nm. Sie werden durch δ, δ^* -Übergänge im Pyoverdinchromophor hervorgerufen. Die Aufspaltung bei kleinen pH-Werten ist für den Pyoverdinchromophor charakteristisch [63, 64].

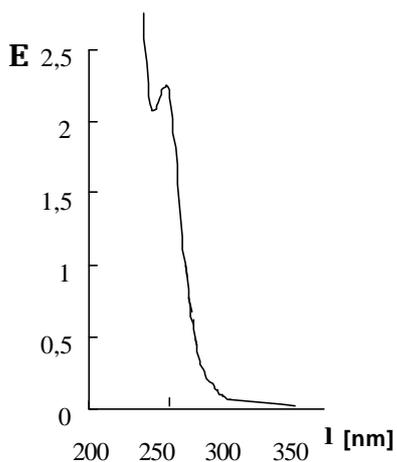


Abb. 3.3 UV/Vis-Spektrum des Ferribactins G173 in Phosphatpuffer, pH 4,5

Die bei ca. 270 nm beginnende Absorptionsbande ist auf das aromatische System des Ferribactinchromophors zurückzuführen.

3.2.2 Aminosäurenanalyse

Da die Peptidkette aller Siderophore eines Stammes die gleiche Aminosäuresequenz hat, wurde die Aminosäureanalyse nur mit dem Pyoverdin SUCA-G173 durchgeführt.

Zunächst wurde die Peptidkette mit 6 M HCl bei 110°C 24 Stunden hydrolysiert. Die entstandenen freien Aminosäuren wurden in ihre flüchtigen TAP-Derivate (N-Trifluoracetyl-O-isopropylester) übergeführt und mittels GC-MS untersucht [65].

Eine chirale Säule (Chirasil-L-Val) wurde verwendet, um die TAP-Derivate des Totalhydrolysats zu trennen. Die Derivate der L-Aminosäuren zeigen stärkere Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial als die der D-Aminosäuren, was die Enantiomertrennung ermöglicht. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen eines Standards und durch die Massenspektren der Aminosäurenderivate. Diese Spektren befinden sich in Anhang.

Die **Abb. 3.4** zeigt das Gaschromatogramm des derivatisierten Totalhydrolysats von SUCA-Pyoverdin G173. Anhand der Massenspektren konnten die TAP-Derivate folgender Aminosäuren eindeutig identifiziert werden: D- und L-Ser, L-Ala, L-Orn, D-Asp. Die Aminosäure Ornithin kann auch aus N⁵-Hydroxyornithin durch Zersetzung während der Hydrolyse entstehen [65].

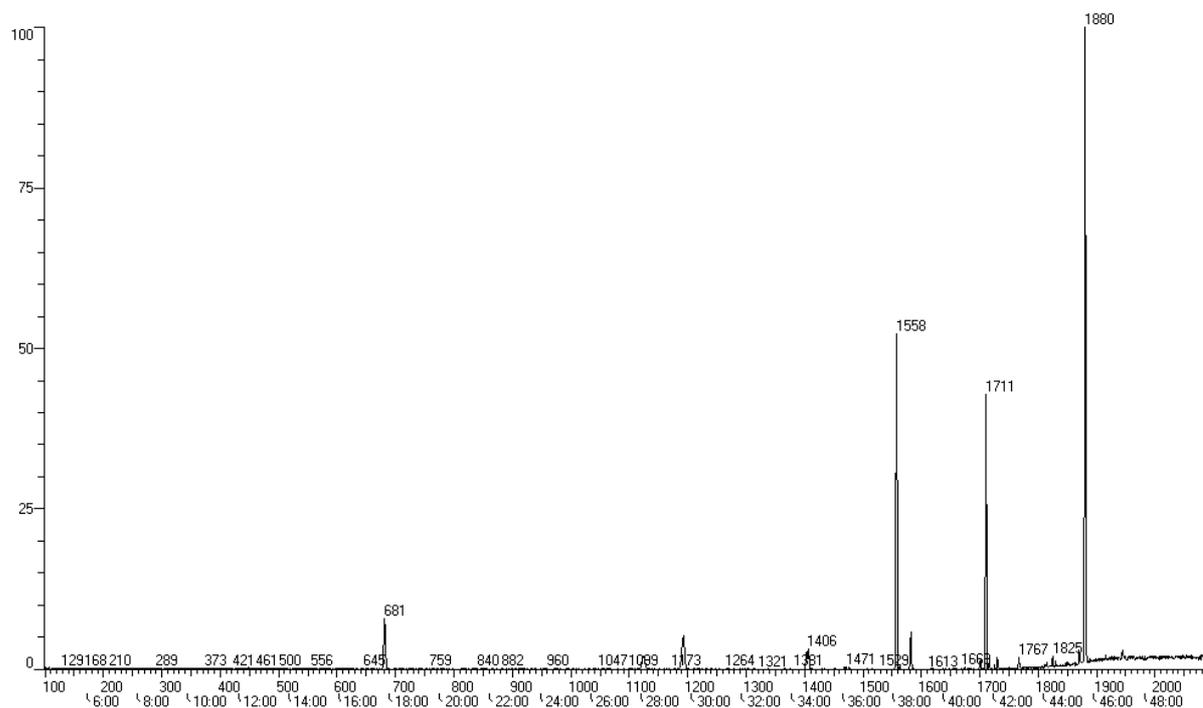


Abb. 3.4 Gaschromatogramm des TAP-derivatisierten Totalhydrolysats von Pyoverdin G173

(Die Massenspektren sind im Anhang abgebildet)

<i>TAP-Derivate</i>	<i>Standardretentionszeit</i>	<i>Retentionszeit</i>
D-Ala	15'55''	
L-Ala	17'10''	17'15''
D-Ser	28'20''	28'30''
L-Ser	29'35''	29'45''
D-Asp	35'40''	
L-Asp	36'30''	37'20''
D-Orn	44'10''	
L-Orn	45'12''	45'34''

Tab. 3.1 Retentionszeiten der TAP-Derivate

Zur Bestimmung der Konfiguration des an den Chromophor gebundenen Serins wurde eine Partialhydrolyse des Pyoverdins mit 5 M HCl bei 90° C für 2 Stunden durchgeführt. Die chromophorhaltige Fraktion wurde nach Neutralisierung an Sep-Pak RP₁₈ adsorbiert, mit Wasser gewaschen und anschließend eluiert. Dieses Eluat wurde dann totalhydrolysiert und TAP-derivatisiert, um eine GC-Analyse durchzuführen. Als Ergebnis wurde D-Serin gefunden.

4 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.1 Einleitung

4.1.1 ESI-MS

Für die massenspektrometrische Untersuchung niedermolekularer Peptide ist die Electrospray-Ionisation besonders gut geeignet [66]. Bei dieser Ionisierungsmethode wird eine Lösung des Analyten (ca. 50 μ M) bei Atmosphärendruck aus einer Kapillare in ein starkes elektrisches Feld versprüht. Dieses Feld (ca. 10^6 V/m) wird durch Anlegen einer Hochspannung (ca. 4 kV) zwischen der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode erzeugt und führt zu einer Ladungstrennung, so daß sich Ionen einer Ladungsart in der austretenden Lösung anreichern [67, 68]. Im Fall der positiven Ionisierung werden die Kationen zum negativen Pol gezogen und dort zum Teil reduziert. Negativ geladene Ionen wandern zum positiv geladenen Kapillarenende und werden dort entladen bzw. oxidiert.

Die Anreicherung von positiver Ladung auf der Flüssigkeitsoberfläche ist Ursache der Bildung eines Flüssigkeitskonus, dem sogenannten Taylor-Conus (**Abb. 4.1**), aus dessen Spitze ein kontinuierlicher Tröpfchenstrom emittiert wird. Ab einer bestimmten Distanz vom Kapillarenende erfolgt eine zunehmende Destabilisierung, die zur Bildung kleinerer Tropfen führt. Zunehmend wird der Analyt desolvatisiert, was zu einer Verringerung des Tropfenradius und damit zu einer Erhöhung der Ladung im Verhältnis zur Oberfläche führt. Wenn die Stabilitätsgrenze des Systems, das sogenannte Rayleigh-Limit, erreicht wird, führen Coulomb-Explosionen zu einem Zerfall in hochgeladene Mikrotropfen, die die ionisierten Analytmoleküle enthalten.

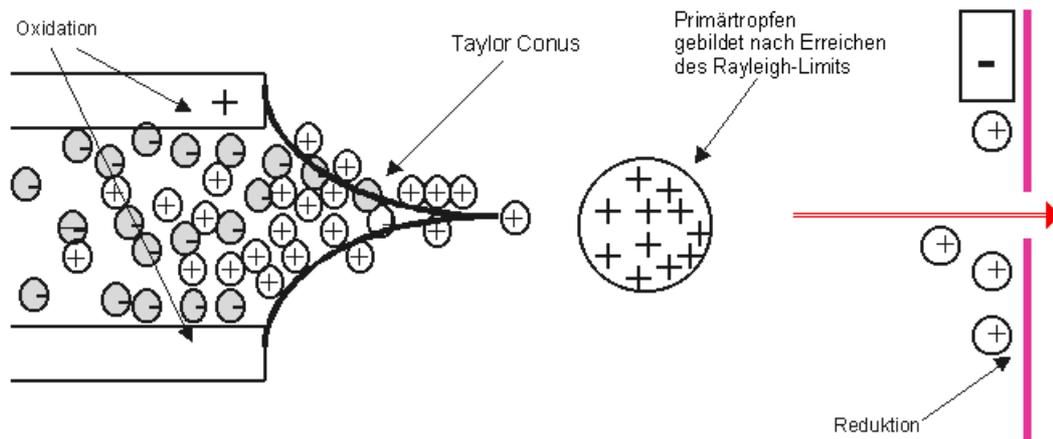


Abb. 4.1 Bildung des Taylor-Conus

Für die Bildung der desolvatisierten Gasphasenionen werden zwei Modelle diskutiert [68, 69].

- *Charge residue model*: Nach diesem Modell, zerfallen die Mikrotröpfchen durch Coulomb-Explosionen weiter, bis ein Tröpfchen nur ein Analytmolekül enthält, das durch Desolvatisierung in der Gasphase übergeführt wird.
- *Ion evaporation model*: Dieses Modell beschreibt den Prozeß der Bildung von Gasphasenionen als eine Folge der direkten Emission von Ionen aus Tröpfchen, die mehrere Analytmoleküle enthalten.

Die ionisierten Analytmoleküle werden durch unterschiedliche Ionenoptiken fokussiert und in den Massenanalysator eingeführt (**Abb. 4.2**).

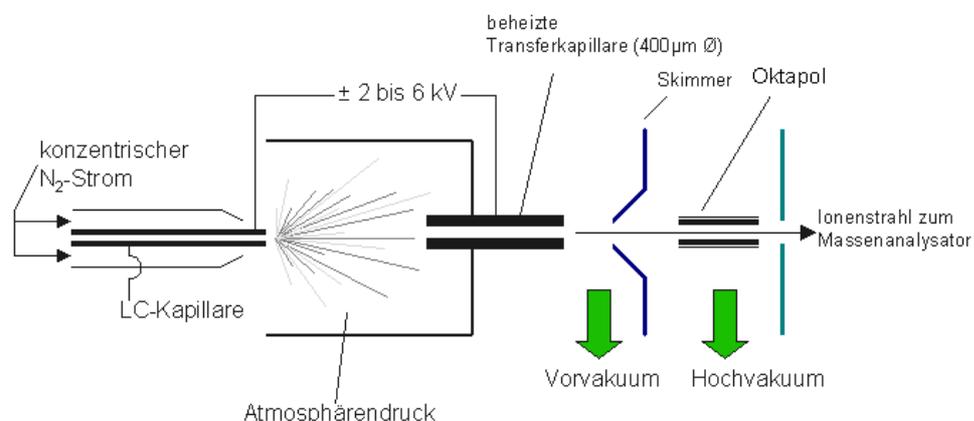


Abb. 4.2 Skizze einer ESI-Quelle

Da durch die verdampfenden Lösungsmittelmoleküle den thermisch gering belasteten Quasimolekülonen Energie entzogen wird, treten bei der Elektrospray-Ionisation häufig ein- oder mehrfach geladene Quasimolekülonen $[M+n(\text{Kation})]^{n+}$, aber kaum Fragmentionen auf. Damit Information über die Struktur erhalten wird, müssen andere Verfahren angewendet werden, wie z. B. die sogenannte Collision Induced Dissociation (CID).

4.1.2 Collision Induced Dissociation (CID)

Die Sequenzanalyse von Peptidketten wird durch stoßinduzierte Fragmentierung (CID) ermöglicht [70]. Dabei werden die Ionen durch Stöße mit einem Badegas (in der Regel ein Edelgas) aktiviert, was zu einer Fragmentierung der Ionen führt.

Bei dem verwendeten Massenspektrometer Finnigan MAT 900ST handelt es sich um ein Hybridgerät, das aus einem Sektorfeldteil und einem Quadrupol-Ion Trap-Teil besteht (**Abb. 4.3**). In diesem Gerät besteht die Möglichkeit zur Kollisionsaktivierung in der Quelle (*in source-CID*), in den Ionenfallen-Oktapolen (*Ion Trap-Oktapol-CID*) oder in der Ionenfalle

(*Ion Trap-CID*) [58 ,71]. Diese drei Möglichkeiten unterscheiden sich durch unterschiedliche Energien und Reaktionszeiten, was zu unterschiedlichen Fragmentierungsmustern führt.

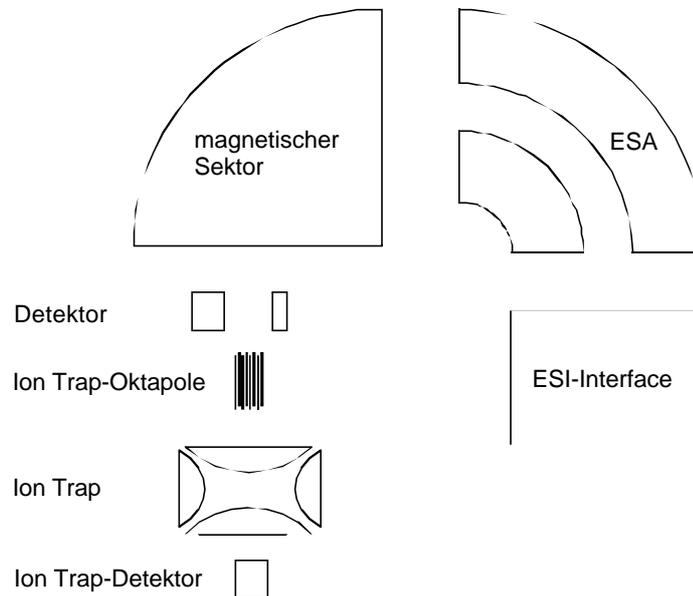


Abb. 4.3 Schematische Aufbau des Massenspektrometers MAT900ST

- *In source-CID*: Das Badegas wird in die Quelle eingeführt und alle Ionen werden durch Kollisionaktivierung fragmentiert. Diese Variante eignet sich nicht zur Gemischanalytik, da keine Einzelkomponenten untersucht werden können. Die so erzeugten Ionen enthalten eine hohe Energie, was zu einer kurzen Lebenszeit und durch mehrere Stöße zu weiteren Fragmentierungen führt.
- *Ion Trap-Oktapol-CID*: Das Sektorfeld wird zur Isolierung einzelner Ionen verwendet. Die Kollisionaktivierung wird vor der Ionenfalle durchgeführt, wobei die Ionenfalle nur als Detektor verwendet wird. Die Energie der Ionen bzw. ihre Fragmentierungsmuster ist mit der der *In source-CID*-Fragmentierung vergleichbar.
- *Ion Trap-CID*: Ionenfallen erzeugen ein dreidimensionales elektrisches Feld, in dem Ionen geringer kinetischer Energie über einen bestimmten Zeitraum gespeichert werden können. Die Ionen werden auf Kreisbahnen im Zentrum der Ionenfalle gehalten [72, 73, 74]. Durch Variationen des Feldes werden alle Ionen mit Ausnahme derer, die einen bestimmten m/z -Wert besitzen, destabilisiert. Auf diese Weise liegen schließlich nur Ionen eines bestimmten m/z -Wertes in der Ionenfalle vor. Die so isolierten Ionen werden durch Stöße mit dem Badegas aktiviert bzw. fragmentiert. In diesem Fall können auch MS^n -Experimente durchgeführt werden, indem jeweils ein Fragmention isoliert und erneut fragmentiert wird.

Bei der Fragmentierung von Peptiden mittels CID treten in der Regel sowohl N-terminale als auch C-terminale Fragmente auf. Die möglichen Bruchstellen eines Peptids sind in **Abb. 4.4**

wiedergegeben. Die N-terminalen Fragmentationen werden in Gruppen von A-, B- und C''-Ionen eingeteilt, während die C-terminalen Fragmentationen als X-, Y''- und Z-Ionen bezeichnet werden. Der tiefgestellte Index gibt die Zahl der Aminosäuren an, aus denen das Fragmentation besteht. Weiterhin werden Wasserverluste aus den Fragmentationen durch einen hochgestellten Kreis (°) und Ammoniakabspaltungen durch einen hochgestellten Stern (*) dargestellt [75]. A- und X-Ionen entstehen bei dem Bruch der CO-CHR-Bindung, B- und Y''-Ionen werden durch Spaltung der Peptidbindung gebildet, während C''- und Z-Ionen nach dem Bruch der NH-CHR-Bindung auftreten. Die Zahl der bei dem Bindungsbruch abgegebenen oder aufgenommenen Wasserstoffatome wird durch hochgestellte Striche angegeben.

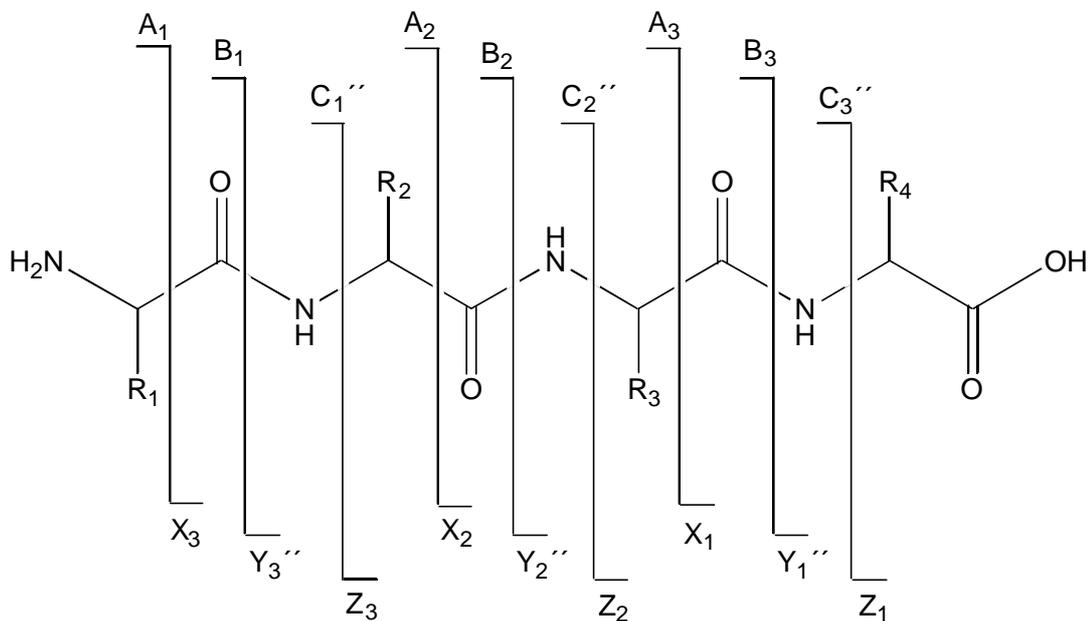


Abb. 4.4 Nomenklatur der Peptidfragmentierungen

Da diese Nomenklatur für die Beschreibung der Fragmente eines Peptidcyclus nicht geeignet ist, wird bei den Fragmenten, die außer der Verknüpfungstelle weitere Cyclusamino-säuren enthalten, der Einbuchstaben-Code der jeweiligen Aminosäure in dem Index aufgenommen. Ein Beispiel befindet sich in **Abb. 4.5**.

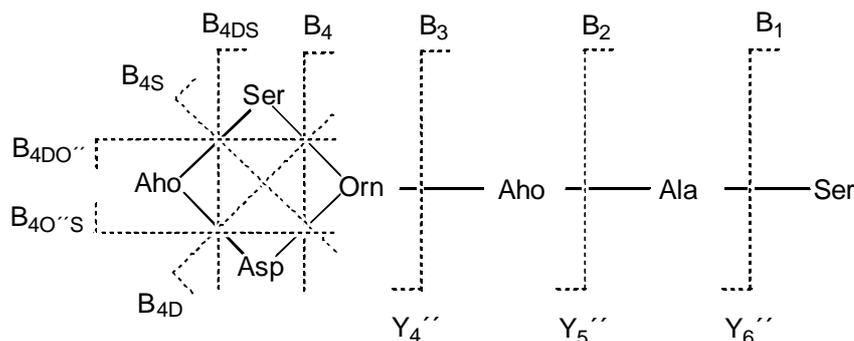


Abb. 4.5 B- und Y''-Ionen eines cyclischen Peptides

Bei den Ion-Trap-CID-Spektren von Peptiden treten in der Regel häufiger B- und Y''-Ionen auf als A-, C''-, X- und Z-Ionen. Die Erklärung liegt an der Bildung einer Oxazolstruktur. Eine Erklärung hierfür bietet die **Abbildung 4.6**.

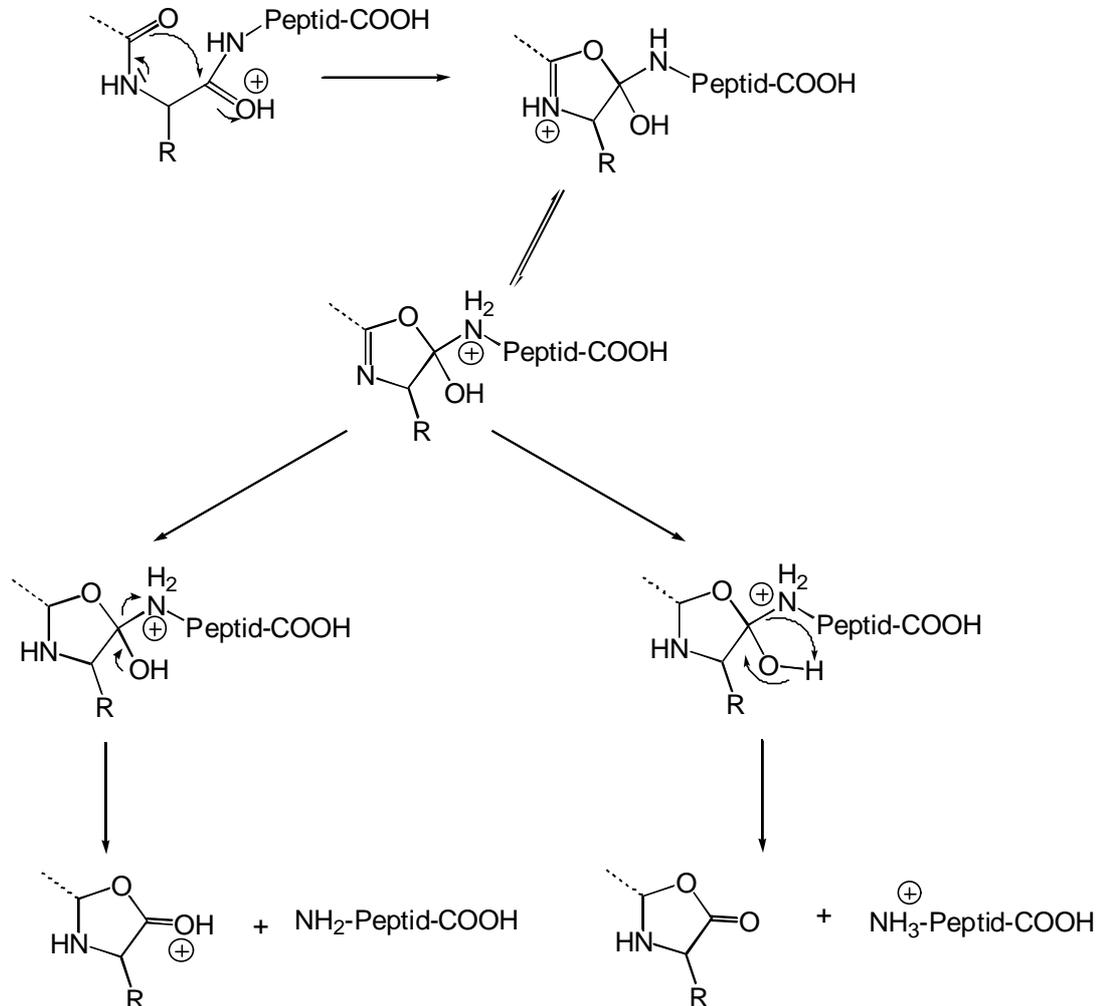


Abb. 4.6 Bildung der B- und Y''-Ionen

Bei cyclischen Peptiden führt der erste Bindungsbruch innerhalb des Aminosäurerückgrats zu einem Gemisch linearer Peptide, die isobar sind und deswegen keine für die Sequenzierung relevante Information enthalten. Erst nach einem zweiten Bindungsbruch werden sequenz-spezifische Fragmentationen gebildet [76]. Im speziellen Fall der Pyoverdine wird eine positive Ladung besonders gut am Chromophor stabilisiert, was zu einer Lokalisierung der Ladung und damit zu einer höheren Anzahl an N-terminalen Fragmenten, aber einer geringeren Anzahl an Aminosäureionen, die dem Cyclus angehören, führt. Damit diese Effekte gemindert werden und genügend Sequenzinformation bekommen wird, werden, wenn möglich, alle CID-Experimente mit dem doppelt protonierten Molekülion durchgeführt. Das zweite Proton kann dann an Amidbindungen im Cyclus lokalisiert sein und Bindungsbrüche in diesem Bereich induzieren.

4.2 Untersuchung des XAD-Extrakts aus *P. fluorescens* G173

4.2.1 Molekulargewichtsbestimmung

Das Pyoverdin G173 mit einer Bernsteinsäureamidseitenkette wurde schon mittels ESI-CID untersucht [58]. Die Kontrolluntersuchung eines XAD-Extrakts ermöglichte die Identifizierung anderer Siderophore, die zusammen mit dem schon bekannten SUCA-Pyoverdin auftreten.

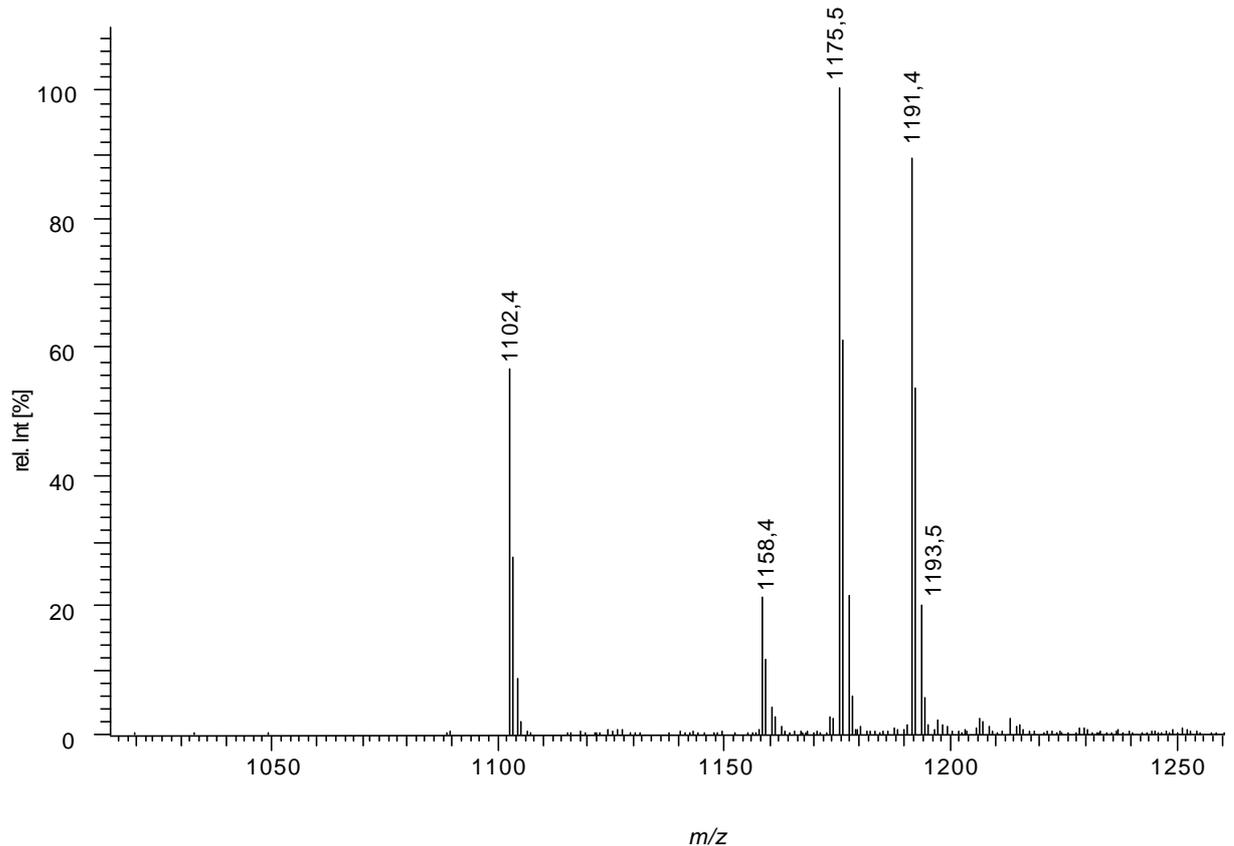


Abb. 4.7 PI-ESI-MS-Spektrum des XAD-Extrakts aus *P. fluorescens* G173

Das Spektrum eines XAD-Extrakts aus *P. fluorescens* G173 zeigt fünf Molekülionen, die jeweils einem unterschiedlichen Siderophor entsprechen (**Abb. 4.7**). Bei dem intensivsten Ion mit m/z 1175,5 handelt es sich um das schon bekannte SUCA-Pyoverdin [58]. Das Signal bei m/z 1191,4 lässt sich als MALA-Pyoverdin identifizieren. Die Massendifferenzen bei den Signalen von m/z 1102,4; 1158,4 und 1193,5 erlauben die Annahme, daß es sich um das Azotobactin, das Succinopyoverdin und das Ferribactin handelt. Dies konnte später durch die Oktapol-CID-Experimente bewiesen werden.

4.2.2 Ion Trap-Oktapol-CID-Untersuchungen

4.2.2.1 Einleitung

Aufgrund der Stabilisierung der positiven Ladung durch den Chromophor dominieren die N-terminalen Fragmentationen in den Spektren der Pyoverdine und der pyoverdinähnlichen Siderophore. Diese besonders günstige Stabilisierung verursacht, daß für die cyclischen Siderophore die einfach geladenen CID-Spektren nur eine geringe Zahl an Fragmentationen zeigen. Aus diesem Grund wurden, wenn möglich, die Stoßexperimente mit dem doppelt protonierten Molekülion durchgeführt.

Die Ionen bei m/z 68, m/z 86 und m/z 131 treten in allen der Ion Trap-Oktapol-CID-Spektren der Siderophore aus *P. fluorescens* G173 auf und könnten als charakteristische Fragmente für Acetylhydroxyornithin identifiziert werden. Eine mögliche Fragmentierungsabfolge für diese Aminosäure ist in **Abb. 4.8** dargestellt.

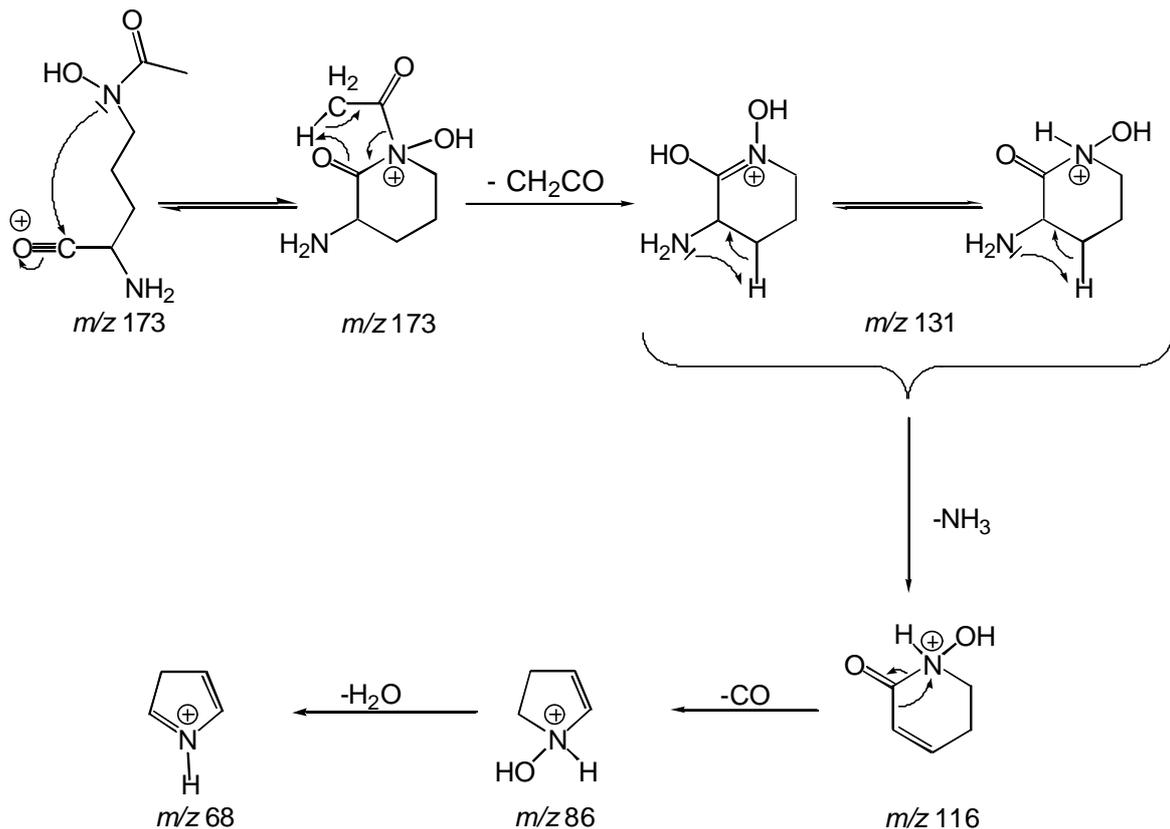


Abb. 4.8 Mögliche Fragmentierungsabfolge der Aminosäure Acetylhydroxyornithin

4.2.2.2 Die Pyoverdine G173

Das MALA-Pyoverdin G173 zeigt das gleiche Fragmentierungsverhalten wie das in der Literatur bereits beschriebene SUCA-Pyoverdin [58]. **Abb. 4.9** zeigt beide Spektren im Vergleich.

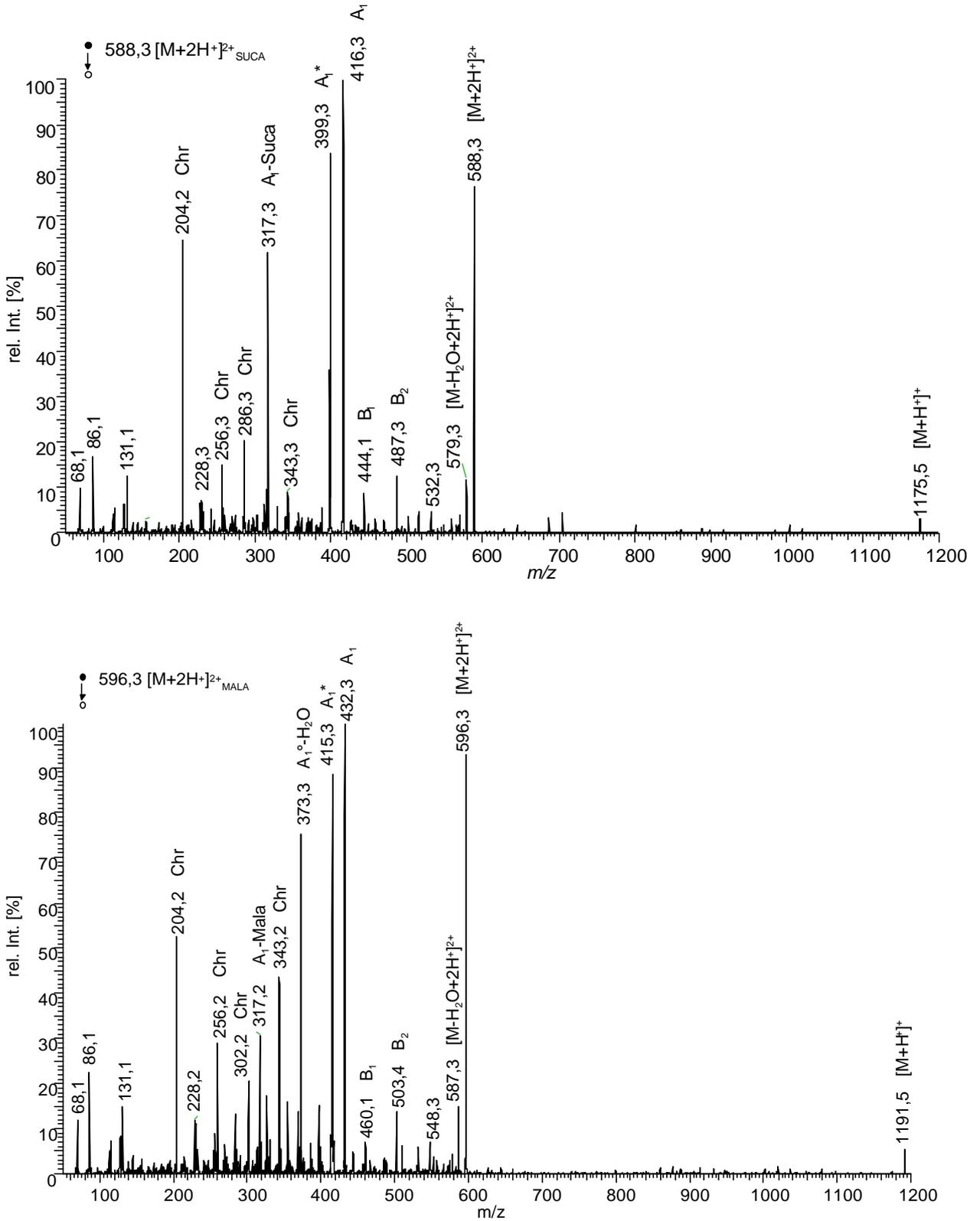


Abb. 4.9 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektren der Pyoverdine SUCA-G173 (m/z 588,3) und MALA-G173 (m/z 596,3)

Die charakteristischen Fragmentationen, die mit „Chr“ bezeichnet sind, entstehen aus der Fragmentierung des typischen Pyoverdinchromophors. Eine mögliche Erklärung für die Bildung dieser Ionen ist in **Abb. 4.10** wiedergegeben.

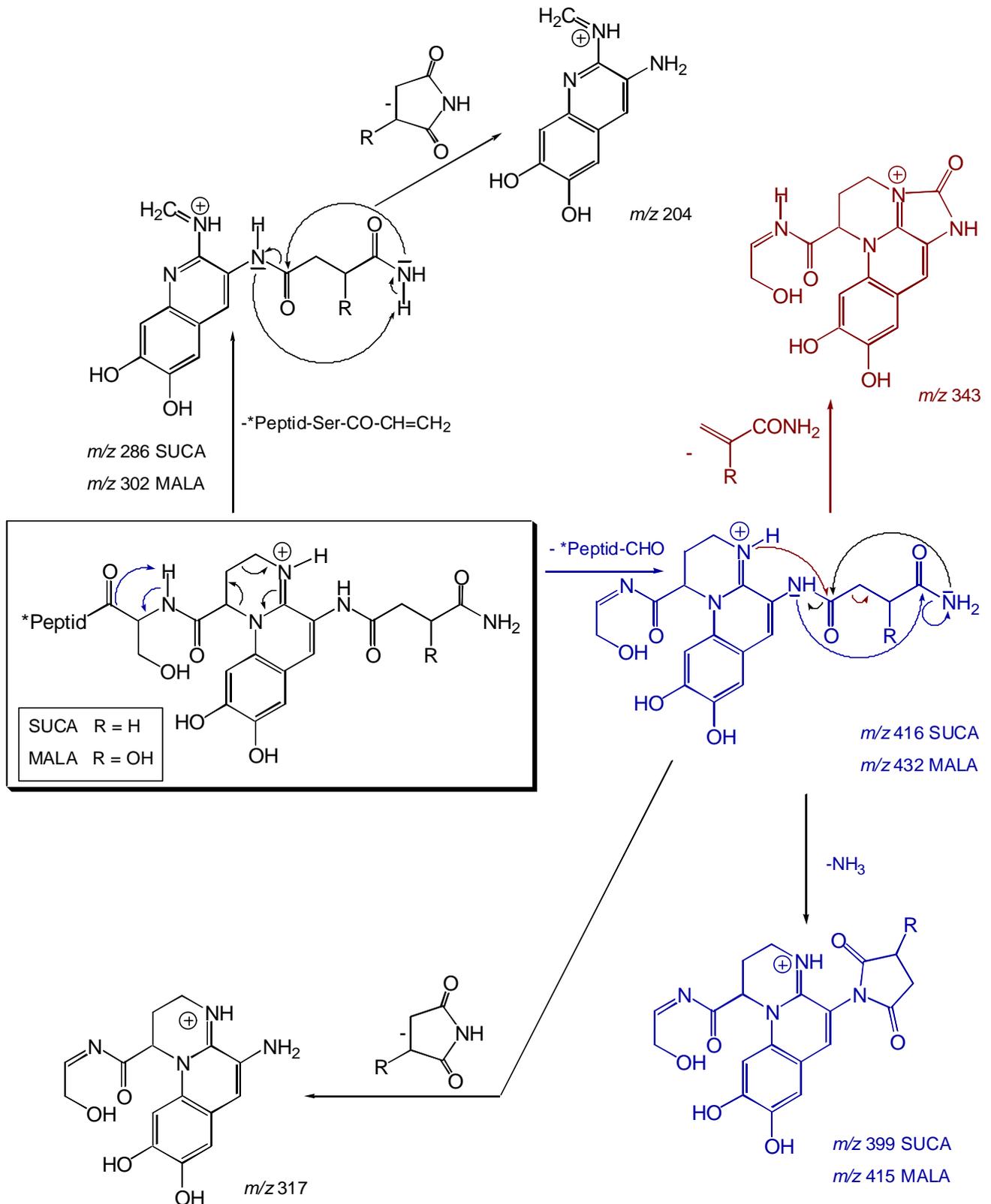


Abb. 4.10 Fragmentierung des Pyoverdinchromophors

4.2.2.3 Azotobactin G173

Das Ion-Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt protonierten Ions m/z 551,7 ist in **Abb. 4.11** wiedergegeben. Das Spektrum zeigt die Bildung des intensiven A-Ions und seine Fragmentationen, die mit „Chr“ bezeichnet sind. Diese Fragmente bilden sich aus der Abspaltung kleiner Neutralteilchen wie Wasser und Formaldehyd (**Abb. 4.12**).

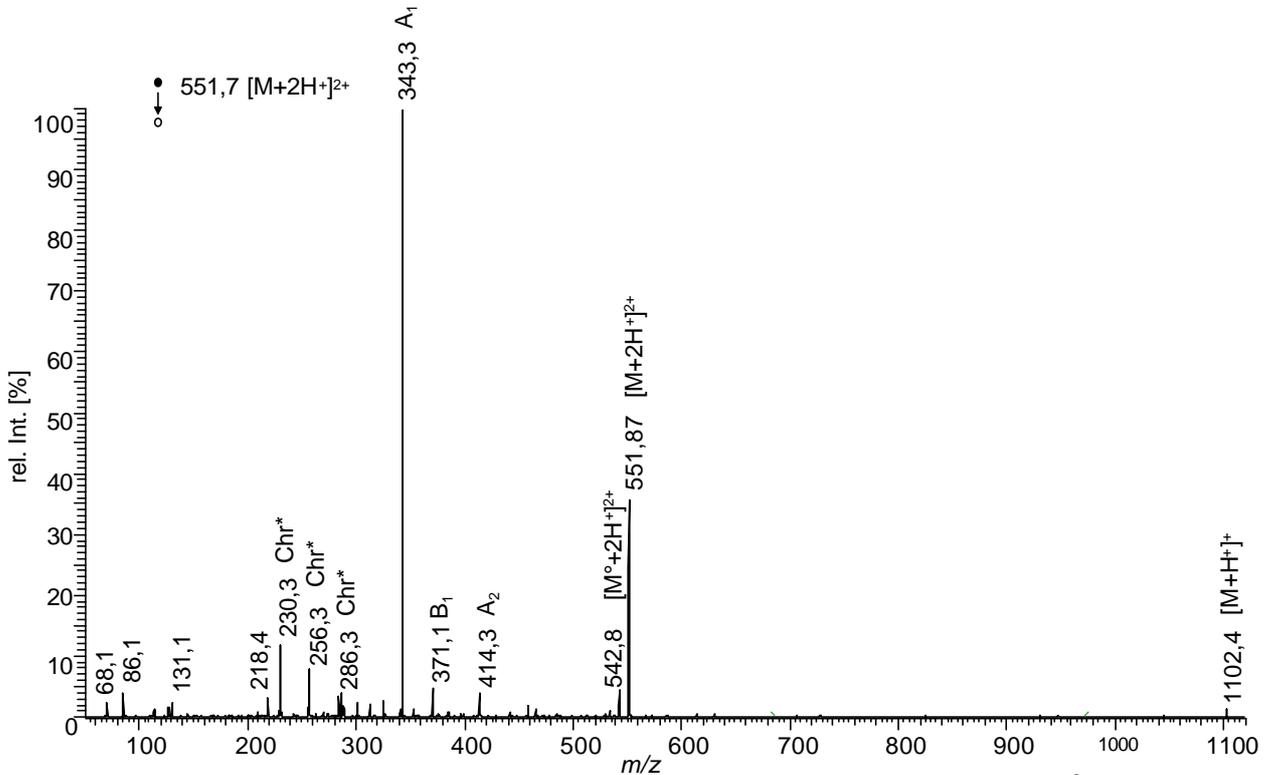


Abb. 4.11 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküls $[M+2H^+]^{2+} = 551,7$

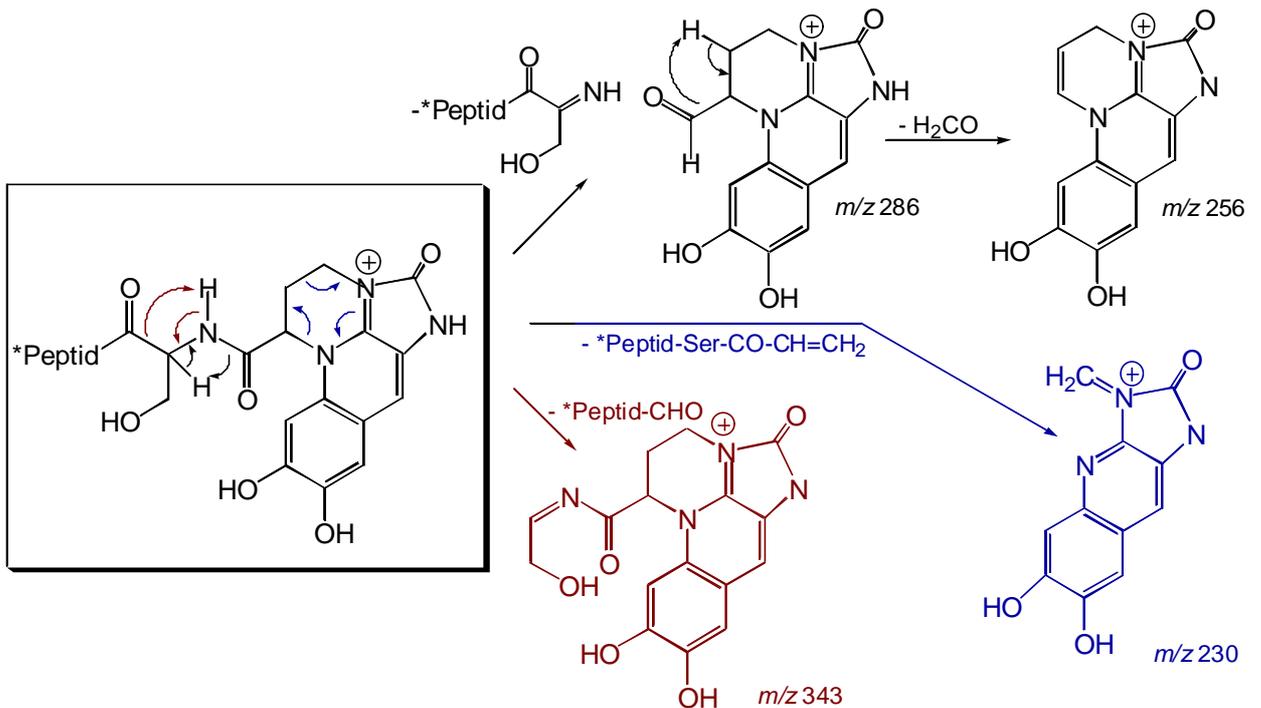


Abb. 4.12 Fragmentierung des Azotobactinchromophors

4.2.2.4 Succinopyoverdin G173

Das Succinopyoverdin wurde als Nebensiderophor mit der Masse 1157 u gefunden. Das Ion-Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt protonierten Ions ist in **Abb. 4.13** wiedergegeben.

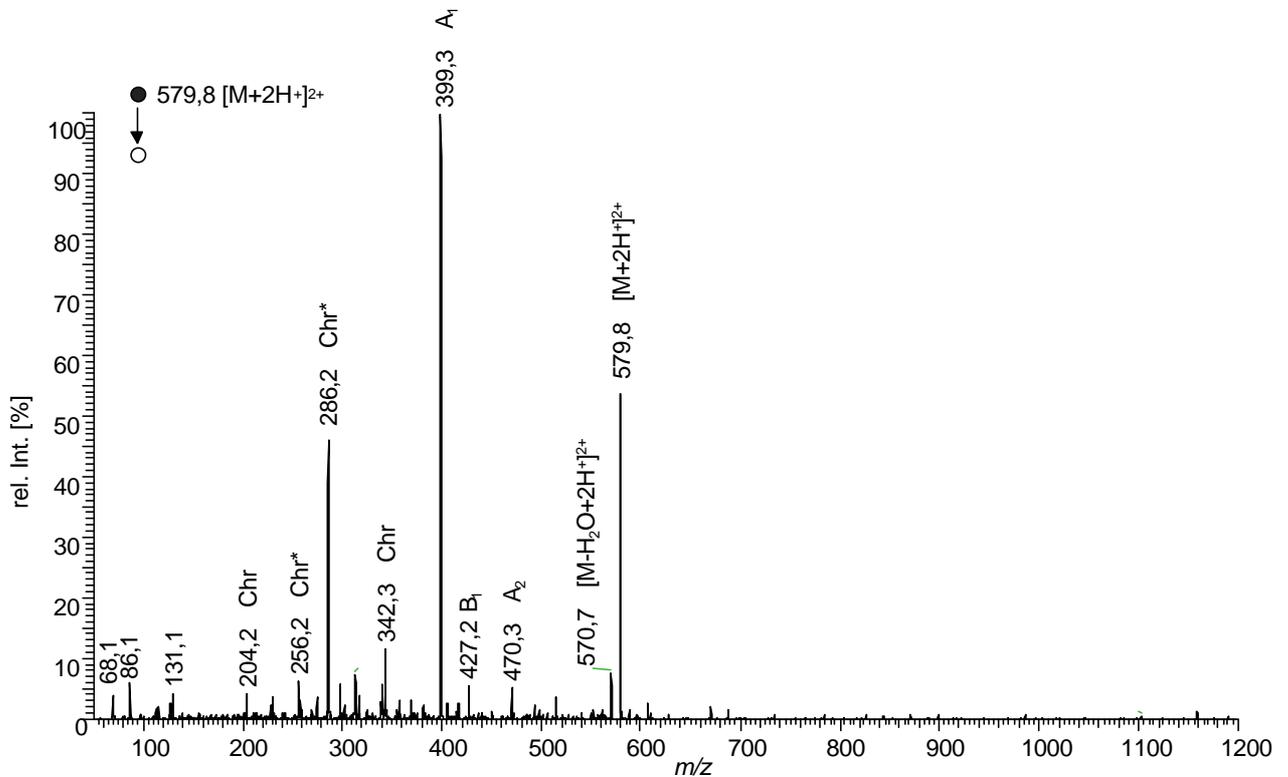


Abb. 4.13 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküliions $[M+2H^+]^{2+} = 579,8$

Die mit "Chr*" bezeichnete Fragmente stammen möglicherweise aus einer azotobactinähnlichen Struktur, und die mit "Chr" bezeichnet stimmen mit charakteristischen Fragmenten des Pyoverdinchromophors überein. Eine mögliche Fragmentierungsabfolge für den Succinopyoverdinchromophor ist in **Abb. 4.14** dargestellt.

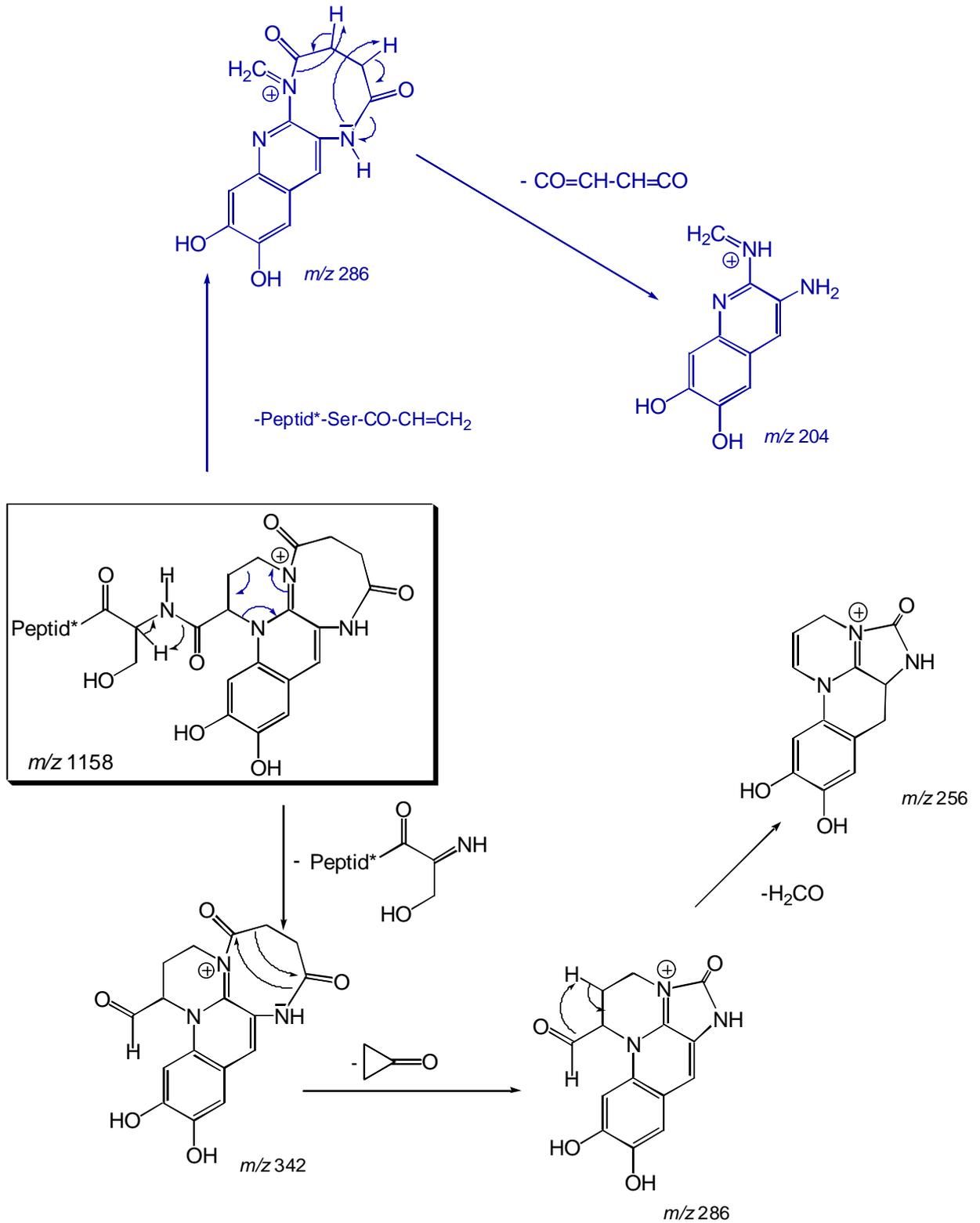


Abb. 4.14 Fragmentierung des Succinopyoverdinchromophors

4.2.2.5 Ferribactin G173

In dem Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des Ferribactins G173 (**Abb. 4.15**) ist ein sofortiger Verlust der Glutaminsäureseitenkette zu erkennen.

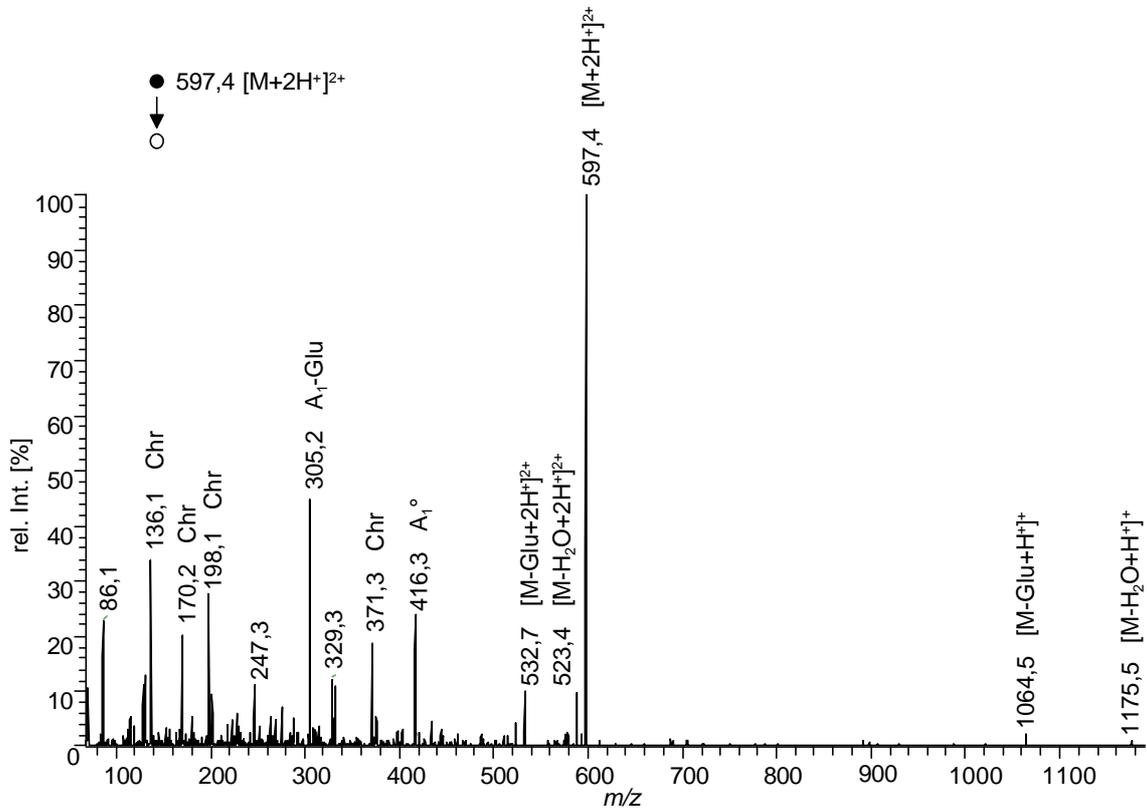


Abb. 4.15 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküliions $[M+2H]^+{}^{2+} = 597,4$

Das Fragmentierungsmuster des Ferribactinchromophors unterscheidet sich deutlich von den bisher beobachteten Fragmentierungswegen anderer Chromophore. Die Zuordnung der Fragmentationen erfolgte anhand eines In-Source-CID-Oktapol-Experiments. Eine saubere Ferribactinprobe wurde zunächst direkt in der Quelle mit einer Energie von 80 V gestoßen und die erhaltenen Fragmente wurden danach im Oktapol der Ionenfalle weiter fragmentiert. Auf diese Weise lassen sich die Zerfallswege einzelner Ionen verfolgen. Die so erhaltene Spektren befinden sich im Anhang.

Eine mögliche Fragmentierungsabfolge des Ferribactinchromophors ist in der nächsten Abbildung dargestellt (**Abb. 4.16**). Die nur im In-Source-CID-Oktapol-Experiment-beobachteten Fragmentationen sind blau hervorgehoben.

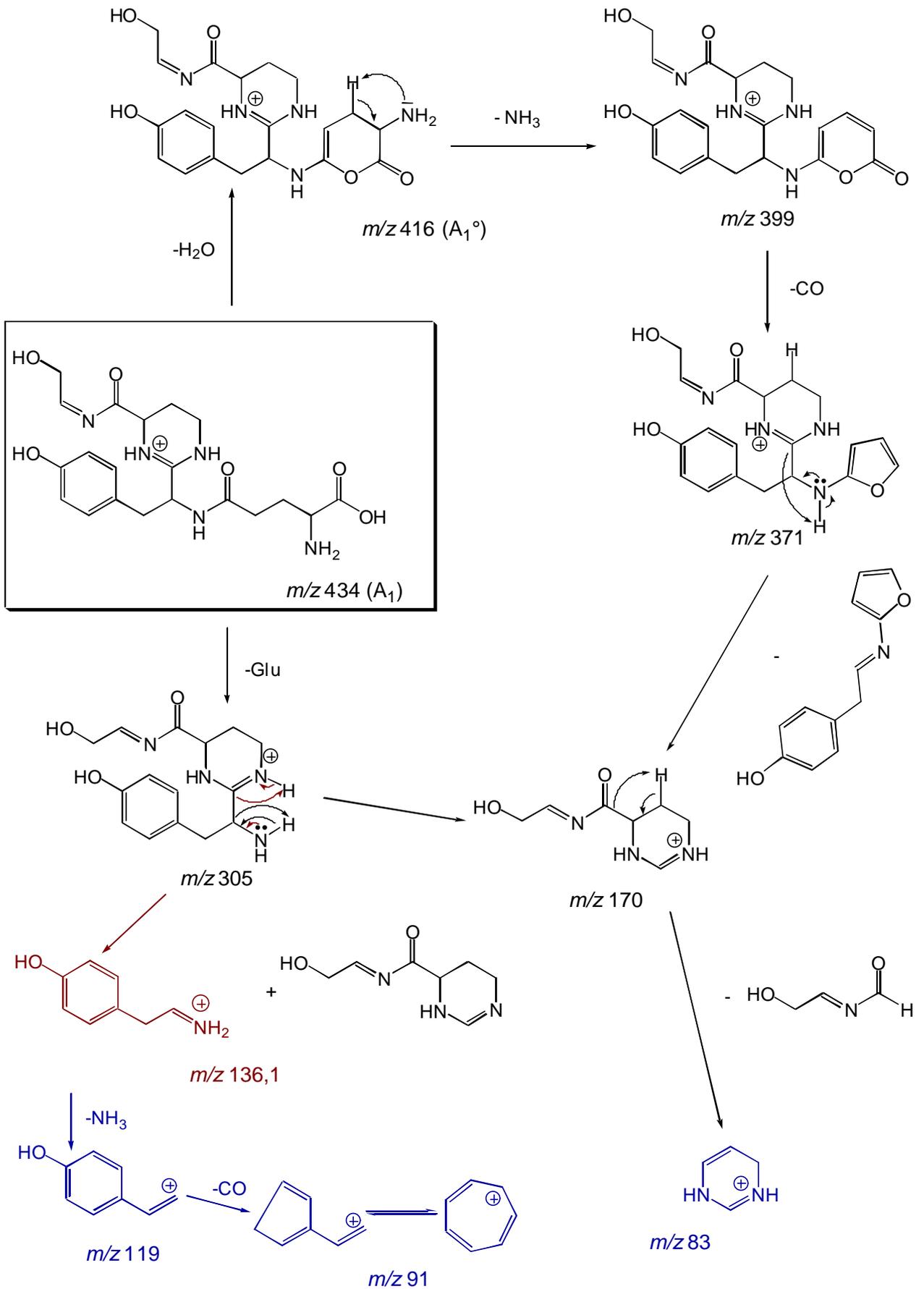


Abb. 4.16 Mögliche Fragmentierungsabfolge des Ferribactinchromophors.

4.2.3 Ion Trap-CID-Untersuchungen

Die Peptidkette der Siderophore aus *Pseudomonas fluorescens* G173 unterscheidet sich wesentlich von denen bisher bekannter cyclischer Siderophore. Acetylhydroxyornithin im Cyclus ist nicht direkt an die Aminosäure, die den Cyclus schließt, gebunden. Dies entspricht keinem zur Zeit bekannten cyclischen Siderophor. Bei diesem Pyoverdine handelt es sich um das einzige mit einer cyclotetrapeptidischen Struktur, in welcher der Cyclus nicht mit Lysin, sondern mit Ornithin geschlossen ist (**Abb. 4.17**).

Das in der Literatur beschriebene Spektrum für das SUCA-Pyoverdine ist in Abb. 4.17 wiedergegeben [58]. Die in diesem Spektrum beobachteten Fragmentationen sind in **Tab. 4.1** zusammengefaßt.

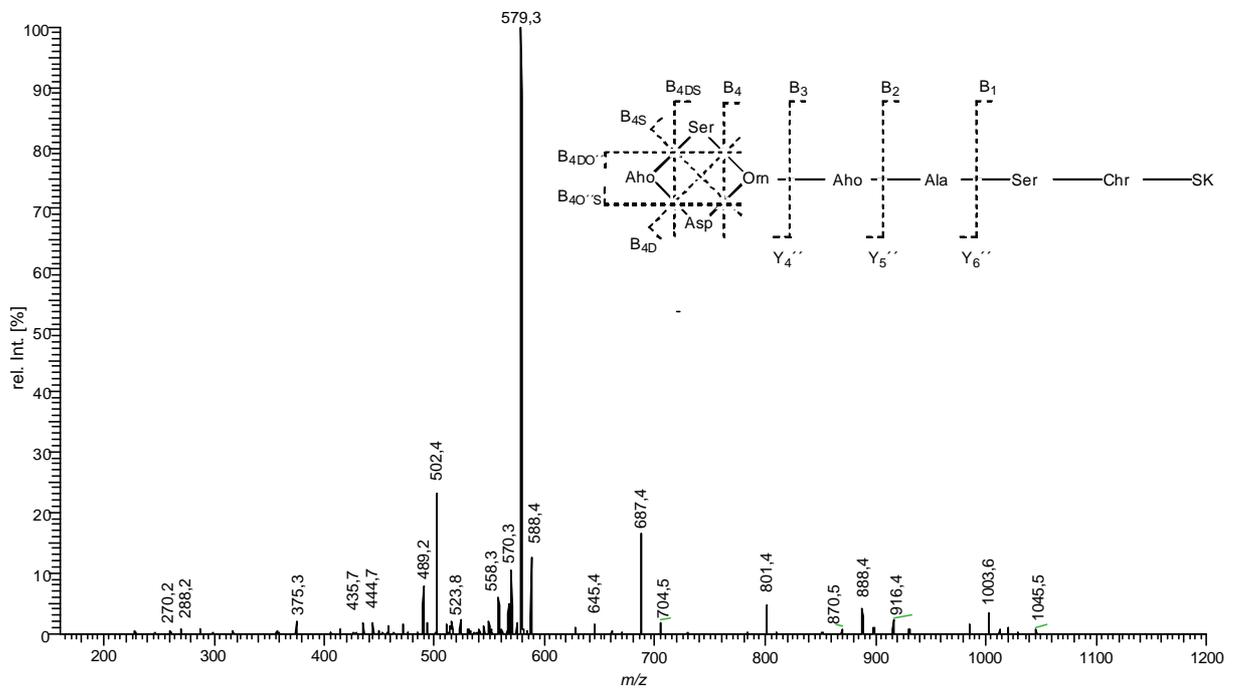


Abb. 4.17 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküliions $[M+2H^+]^{2+} = 588,4$

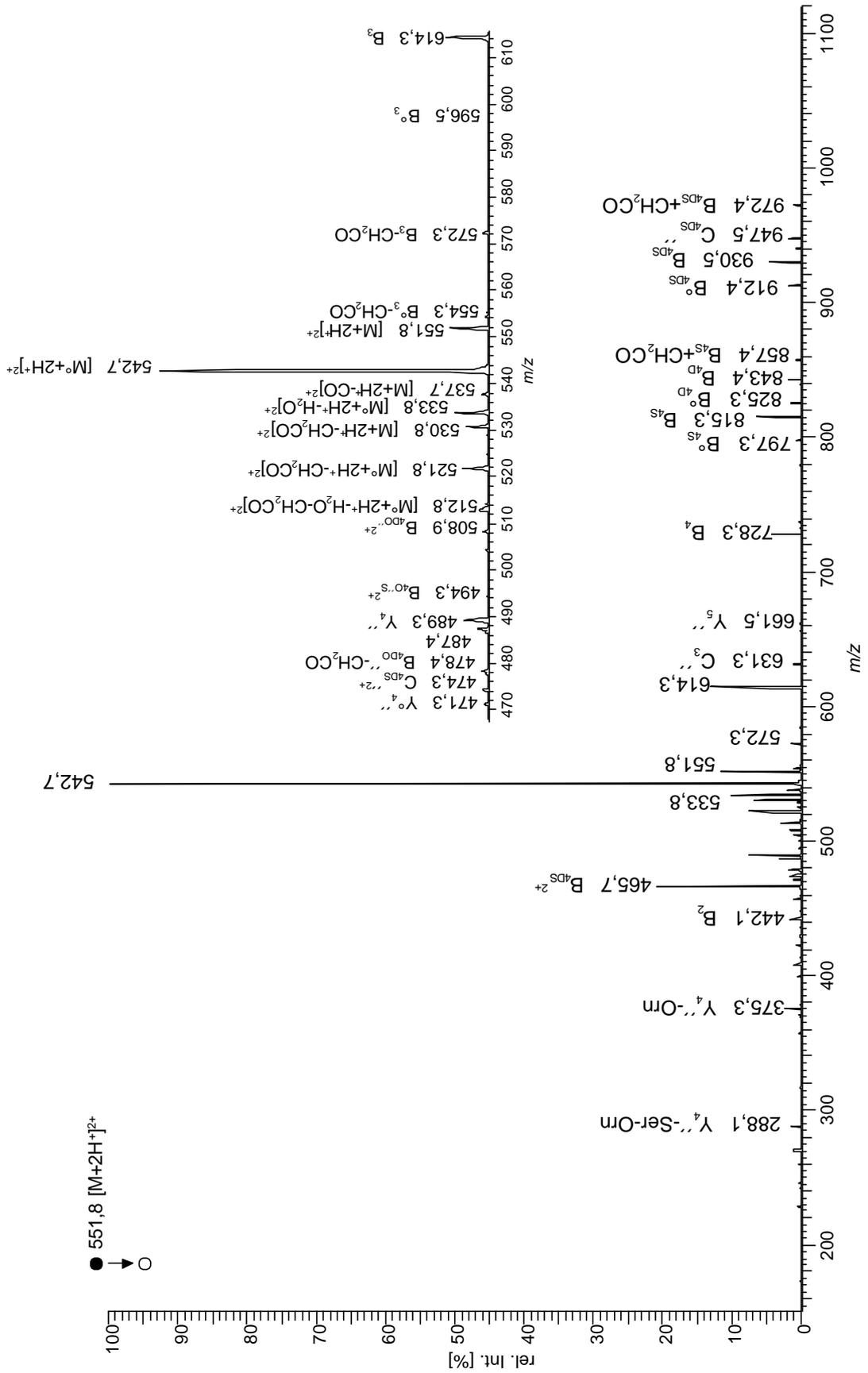


Abb. 4.19 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküliions $[M+2H]^{2+} = 551,8$

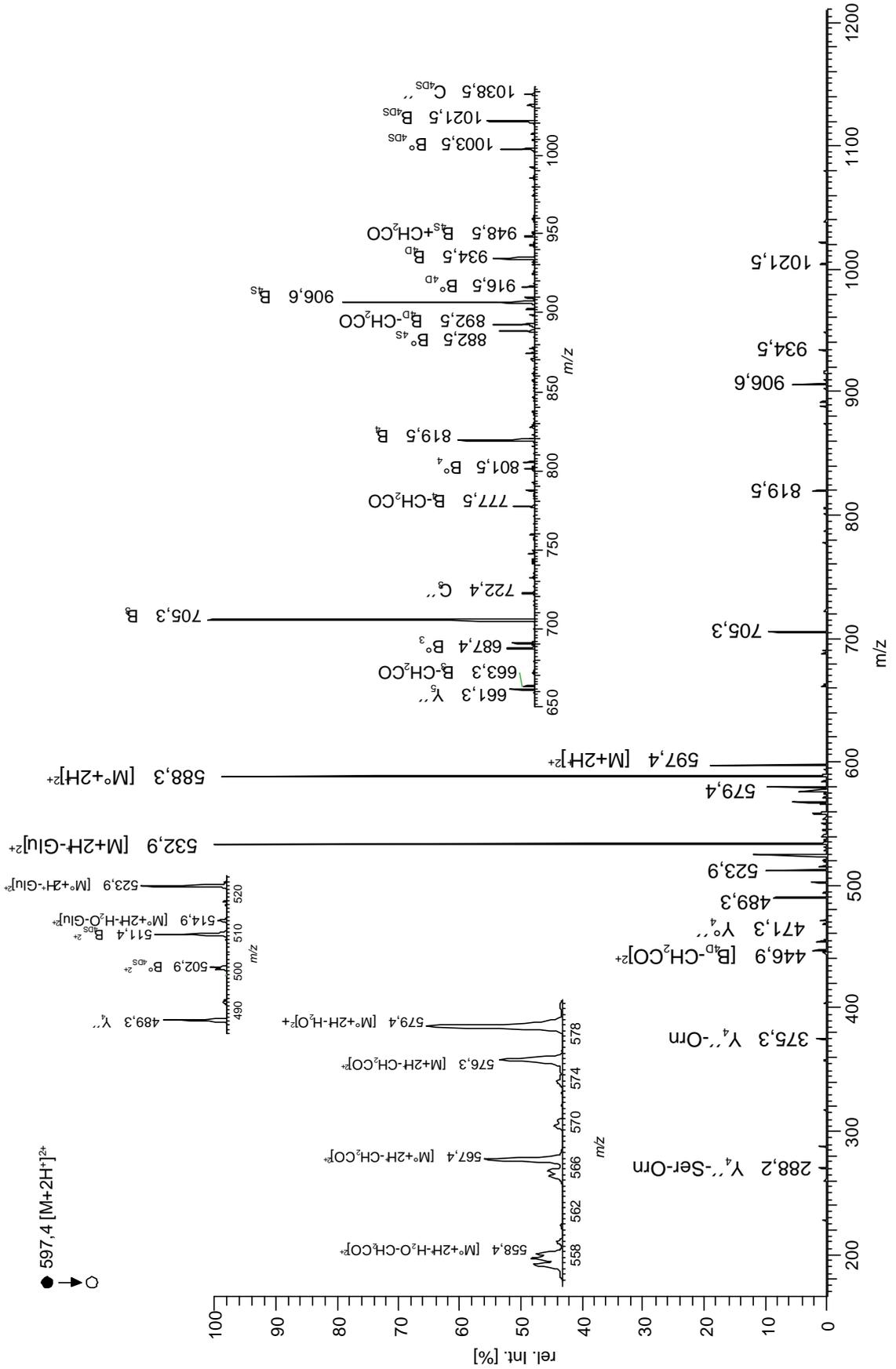


Abb. 4.21 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküliions [M+2H]²⁺ = 597,4

Abb. 4.18 - 4.21 zeigen die Ion Trap-CID-Spektren des MALA-Pyoverdins, des Azotobactins, des Succinopyoverdins und des Ferribactins aus *Pseudomonas fluorescens* G173. In diesen Massenspektren treten in der Regel alle Fragmentationen der B-Ionen-Serie auf. C-terminal werden die Ionen der Y''-Serie Y_4'' und Y_5'' beobachtet. Außerdem treten eine Reihe von Ionen nach Wasser- und Ammoniakabspaltung auf.

Die beobachteten Sequenzen sind in **Tab. 4.1** denen des SUCA-Pyoverdins gegenübergestellt. Die in den Spektren beobachteten doppelt geladenen Ionen sind durch Fettdruck hervorgehoben, die ausschließlich im Oktapol-CID-Spektrum beobachteten Ionen sind im kursiv dargestellt und die Umlagerungsprodukte grau unterlegt.

Die Umlagerung bzw. Abspaltung von 42 u läßt sich über die in **Abb. 4.22** und **Abb. 4.23** dargestellten Wege erklären. Nach dieser Hypothese sind die Fragmentationen $B_{4S}+42$ und $B_{4DS}+42$ durch die Wanderung der Acetylgruppe eines Acetylhydroxyornithins zur erklären, und die Fragmentationen B_3-42 und $B_{4DO''}-42$ durch den Verlust derselben Acetylgruppe beschreibbar.

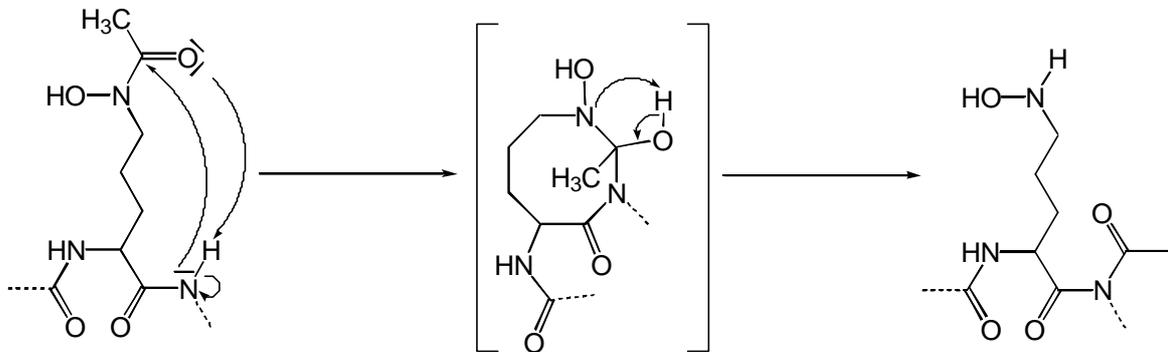


Abb. 4.22 Mögliche Mechanismus der Umacetylierung des Acetylhydroxyornithins.

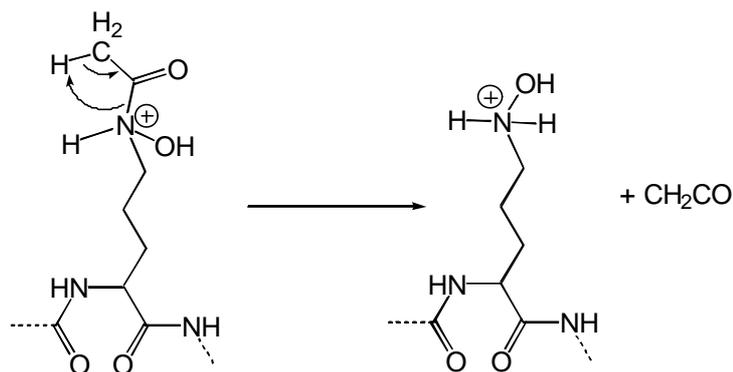


Abb. 4.23 Vorschlag für den Verlust von Keten aus Acetylhydroxyornithin

Teil I: Massenspektrometrische Untersuchungen

Fragment	SUCA	MALA	Azoto.	Succinopyo.	Ferri
Y ₄ ^{''} -Ser-Orn	288,1	288,1	288,1	288,1	288,2
Y ₄ ^{''} -Orn	375,2	375,3	375,2	375,2	375,3
Y ₄ ^{''°}	471,2	471,3	471,3	471,3	471,3
Y ₄ ^{''}	489,2	489,3	489,3	489,2	489,3
Y ₅ ^{''}	661,2	661,3	661,5	661,2	661,3
B ₁	444,2	460,2	371,2	427,2	462,2
B ₂	515,2	531,2	442,1	498,2	533,2
B ₃ [°] -CH ₂ CO	627,2	643,3	554,3	600,2	645,5
B ₃ -CH ₂ CO	645,2	661,3	572,3	628,2	663,3
B ₃	687,2	703,3	614,3	670,3	705,3
B ₄	801,2	817,4	728,4	784,4	819,5
B _{4S} [°]	870,2	886,3/443,7	797,3	853,4	888,5
B _{4S}	888,2	904,4/452,7	815,3	871,3/436,2	906,6
B _{4D} [°]	898,2	914,4	825,3	881,3	916,5
B _{4D}	916,3	932,4	843,4	899,3	934,5
B _{4DS} [°]	985,3	1001,3/501,3	912,4	968,4/484,8	1003,5/502,9
B _{4DS}	1003,4	1019,5/510,3	930,5/465,7	986,5/493,8	1021,5/511,4
B _{4DS} +CH ₂ CO	1045,4	1061,5	972,4	1028,5	
B _{4S} +CH ₂ CO	930,3	946,3	857,4	913,4	948,5
B _{4DO} ^{''} -CH ₂ CO	1046,4/523,6	531,6	487,4	515,3	
B _{4O} ^{''S}	530,6	539,6	494,3	522,4	539,9
B _{4DO} ^{''}	544,6	552,7	508,9	536,3	553,7
C ₃ ^{''}	704,3	720,4	631,3	687,4	722,4
C _{4DS} ^{''}	510,6	1036,5	947,5/474,3	502,3	1038,5
[M [°] +2H-H ₂ O-CH ₂ CO] ²⁺	549,3	557,3	512,8	541,3	558,4
[M [°] +2H-CH ₂ CO] ²⁺	558,3	566,3	521,8	550,3	567,4
[M+2H-CH ₂ CO] ²⁺	567,3	575,3	530,8	558,8	576,3
[M [°] +2H-H ₂ O] ²⁺	570,3	578,3	533,8	561,8	579,4
[M+2H-CO] ²⁺	574,3	582,3	537,7		
[M [°] +2H] ²⁺	579,2	587,3	542,7	570,8	588,3
[M+2H] ²⁺	588,3	596,3	551,8	579,8	597,4

Tab. 4.1 Zuordnung der beobachteten Fragmentionen für die Siderophore aus *P. fluorescens* G173

4.3 Untersuchung des XAD-Extrakts aus *P. fluorescens* Koeln-G173

Bei einer Kontrolluntersuchung der Siderophore aus den in Köln gezüchteten *P. fluorescens* G173 wurde festgestellt, daß die isolierten Siderophore sich in ihren Molekulargewicht von den bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Siderophoren deutlich unterscheiden (**Abb. 4.24**).

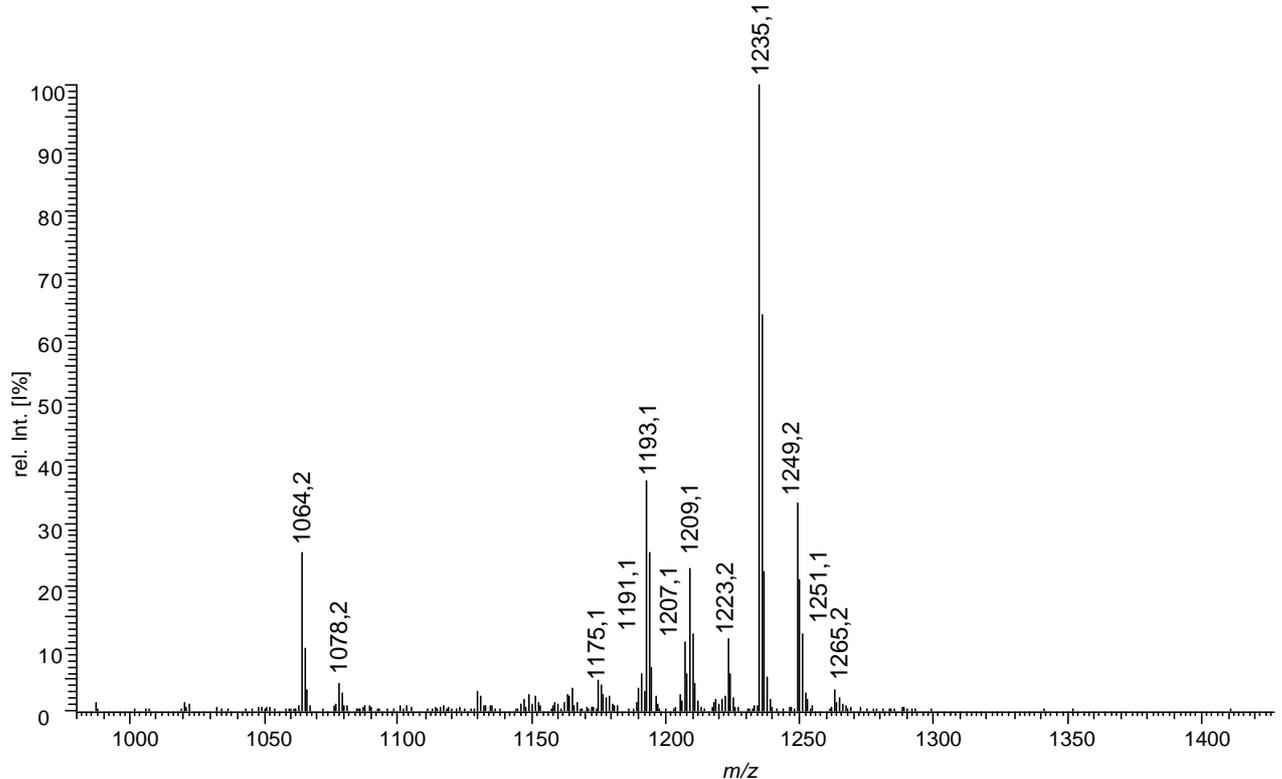


Abb. 4.24 PI-ESI-MS-Spektrum des XAD-Extrakts aus *P. fluorescens* Koeln-G173

Nach Wiederholung der Zucht unter verschiedenen Bedingungen, wie Temperatur, Zeit, Schüttelgeschwindigkeit und Zusammensetzung des Mediums wurde stets dieses neue Siderophorengemisch isoliert, was mittels ESI-MS überprüft werden konnte. Daraus wurde geschlossen, daß möglicherweise eine spontane Mutation stattgefunden hatte und die Bakterien nicht mehr fähig waren, große Pyoverdinmengen zu synthetisieren.

Der neue Stamm wurde *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 genannt und mittels Massenspektrometrie genauer untersucht, um die Struktur der neuen Siderophore aufzuklären.

Anhand der weiteren MS²-Experimente konnten die Ionen bei m/z 1175,1 m/z 1191,1 und m/z 1193,1 als die ursprünglichen von *P. fluorescens* G173 produzierten Pyoverdine und Ferribactin identifiziert werden. Zur Identifizierung der anderen Siderophore wurden mehrere massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt.

4.3.1 Ion bei m/z 1209,1: $[M+2H^+]^{2+} = 605,3$

Das Ion-Trap-CID-Spektrum dieses Fragmentions (**Abb. 4.25**) zeigt, daß die Peptidkette identisch mit der aus *P. fl* G173 ist. Die Zuordnung der beobachteten Fragmentionen ist in **Tab. 4.2** zusammengefaßt. Die N-terminalen Fragmentionen sind um 16 u zu höheren Massen verschoben, was bedeutet, daß entweder an dem Chromophor oder an der Seitenkette eine Veränderung stattgefunden haben muß. Die C-terminal Fragmentionen sind entsprechend nicht verschoben.

Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 597,4	$[M+2H^+]^{2+} =$ 605,3	Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 597,4	$[M+2H^+]^{2+} =$ 605,3
Y ₄ ^{''°} -Ser-Orn		270,1	B _{4D}	934,5	950,5
Y ₄ ^{''} -Ser-Orn	288,2	288,1	B _{4DS} [°]	1003,5/ 502,9	1019,5
Y ₄ ^{''} -Orn	375,3	375,3	B _{4DS}	1021,5/ 511,4	1037,5/ 523,9
Y ₄ ^{''}	489,3	489,3	B _{4S} + CH ₂ CO	948,5	964,4
Y ₅ ^{''}	661,3	661,3	B _{4DO} ^{''} -CH ₂ CO		540,8
B ₁	462,2	478,1	B _{4O} ^{''S}	539,9	548,9
B ₂	533,2	549,2	C _{4DS} ^{''}	1038,5	527,5
B ₃ [°] -CH ₂ CO	645,5	661,2	B _{4DO} ^{''}	1104,4	561,7
B ₃ [°]		703,3	$[M+2H\text{-Seitenkette}]^{2+}$	532,8	532,8
B ₃	705,3	721,3	$[M^{\circ}+2H\text{-H}_2\text{O-CH}_2\text{CO}]^{2+}$	558,4	566,3
B ₄	819,5	835,4	$[M^{\circ}+2H\text{-CH}_2\text{CO}]^{2+}$	567,4	575,3
B _{4S} [°]	888,5	904,5	$[M+2H\text{-CH}_2\text{CO}]^{2+}$	576,3	584,3
B _{4S}	906,6	922,3	$[M^{\circ}+2H\text{-H}_2\text{O}]^{2+}$	579,4	587,3
B _{4DO} ^{''}	553,7	561,7	$[M^{\circ}+2H]^{2+}$	588,3	596,4
C ₃ ^{''}	722,4	738,5	$[M+2H]^{2+}$	597,4	605,3

Tab. 4.2 Vergleich der in Abb. 4.21 und 4.26 beobachteten Fragmentionen

(doppelt geladenen Ionen sind fett hervorgehoben)

Die Anwesenheit des Ions bei m/z 532,8 und die nicht verschobenen C-terminalen Ionen (grau hervorgehoben) deuten daraufhin, daß die Verbindung mit der Masse 1208 u die gleiche Peptidkette und den gleichen Ferribactinchromophor hat wie das Ferribactin aus *P. fluorescens* G173. Dies wird durch die Isolierung und Kollisionsaktivierung des $[M+2H\text{-Seitenkette}]^{2+}$ -Ions (m/z 532,8) bestätigt, da die Ion-Trap-Spektren in beiden Fällen die gleichen Sequenzionen zeigen (**Abb. 4.26** und **4.37**).

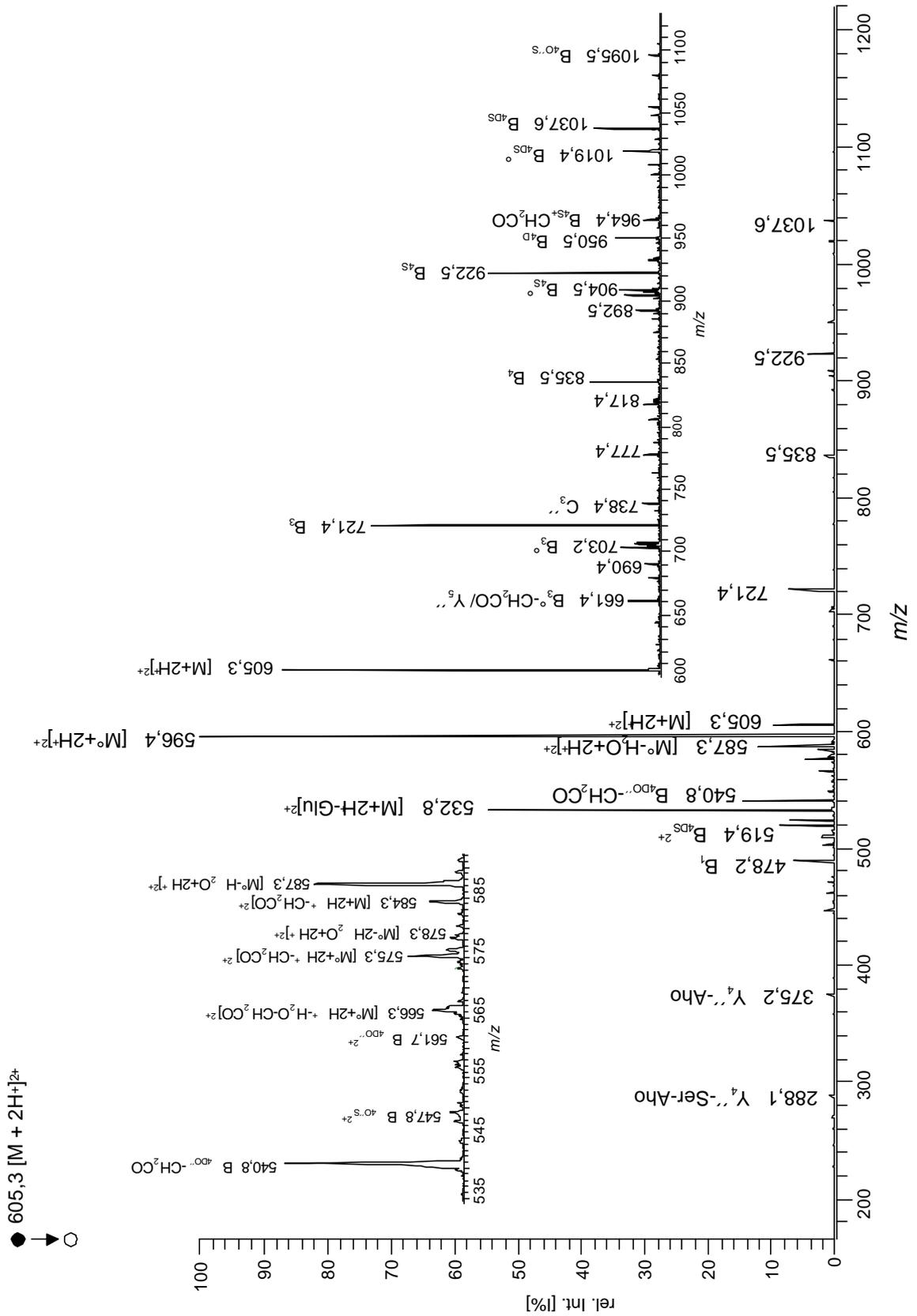


Abb. 4.25 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküliions $[M+2H]^{2+} = 605,3$

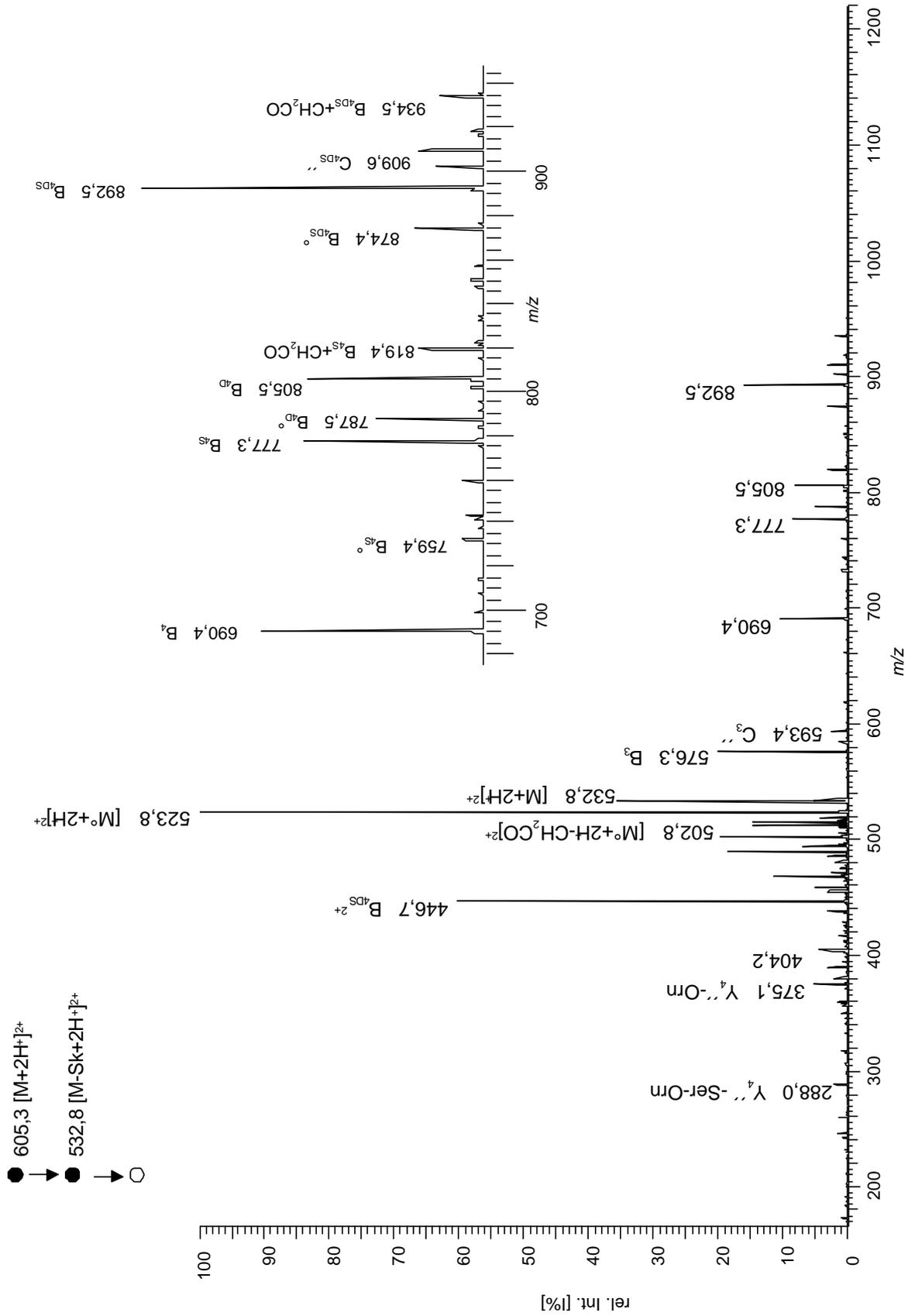


Abb. 4.26 Ion Trap-CID-MS³-Spektrum des doppelt geladenen [M-Sk+2H]²⁺ = 605,3/532,8

In dem Oktapol-CID-Spektrum des Moleküliions $[M+2H^+]^{2+} = 605,4$ lassen sich die für Ferribactine typischen Fragmentationen beobachten. Die Fragmente nach dem Verlust der Seitenkette (Chr*) stimmen mit denen des Ferribactins G173 überein und die seitenkettenenthaltenden Fragmente (Chr) sind um 16 u zu höheren Massen hinverschoben.

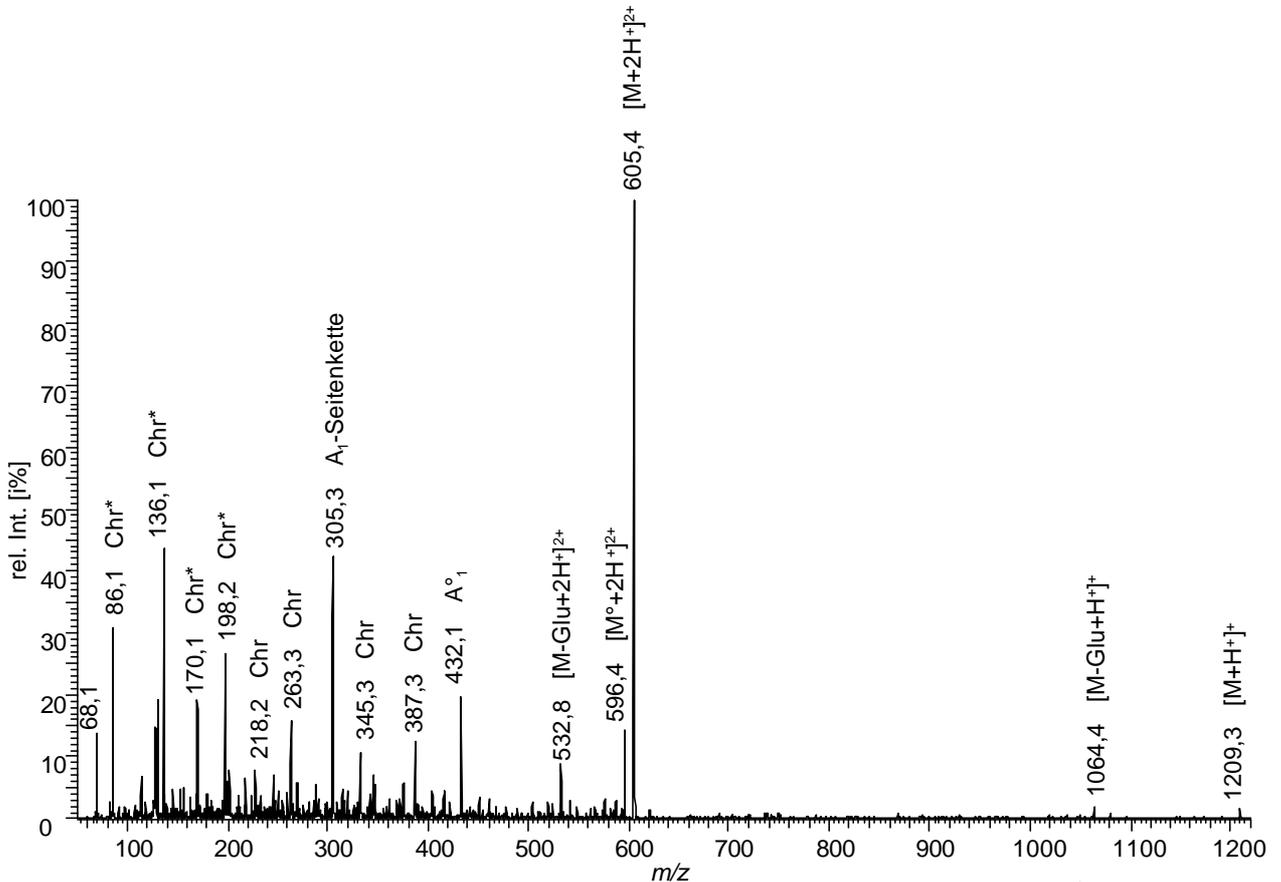


Abb. 4.27 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Moleküliions $[M+2H^+]^{2+} = 605,4$

Eine Masseverschiebung von 16 u deutet auf die Existenz eines zusätzlichen Sauerstoffs hin. Da diese Verschiebung von der Seitenkette (Glutaminsäure) herrühren muß, ist es wahrscheinlicher, daß der Sauerstoff an eine NH_2 -Gruppe als an einem aliphatischen Kohlenstoff gebunden ist. Da die Peptidkette verschiedener Siderophore der Pseudomonaden oft unnatürliche Aminosäuren wie Formyl- und Acetylhydroxyornithin enthalten, bei denen eine OH-Gruppe an einer Aminogruppe gebunden ist, wird eine Seitenkette mit einer Hydroxylamingruppe anstelle der α - NH_2 vorgeschlagen (**Abb. 4.28**)

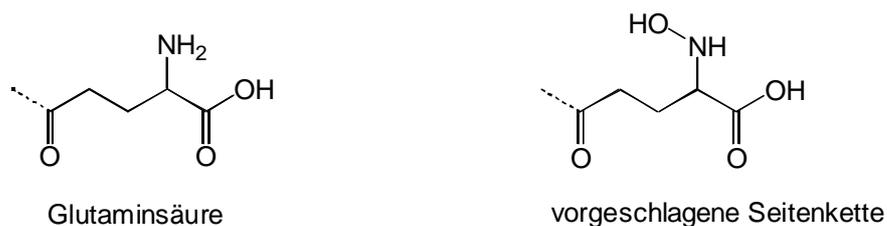


Abb. 4.28 Vorgeschlagene Seitenkette für das Ferribactin der Masse 1208 u

Die Peaks, die in dem Oktapol-CID-Spektrum (**Abb. 4.27**) als „Chr*“ bezeichnet sind, stammen aus der Fragmentierung des Ferribactinchromophors nach Verlust der Seitenkette (vgl. Abb. 4.16). Die Peaks, die als „Chr“ bezeichnet sind, enthalten noch die Seitenkette oder ein Derivat davon und sind um 16 u schwererer als das Ferribactin mit der gewöhnlichen Glutaminsäureseitenkette. Eine mögliche Fragmentierungsabfolge für diesen Chromophor ist in **Abb. 4.29** dargestellt.

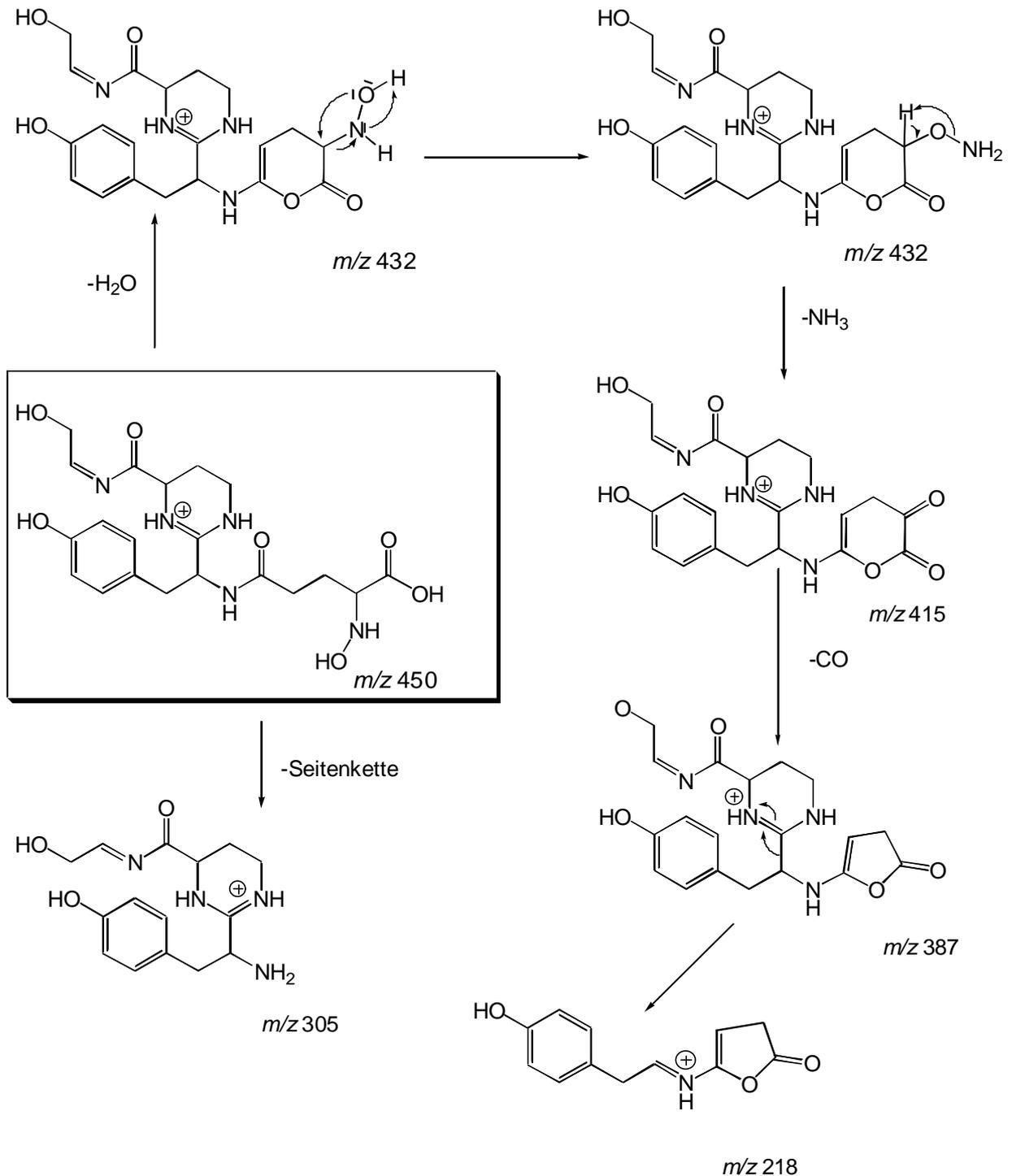


Abb. 4.29 Mögliche Fragmentierungsabfolge für den Ferribactinchromophor mit einer α -Hydroxyamino-glutaminsäureseitenkette

4.3.2 Ion bei m/z 1235,1: $[M+2H^+]^{2+} = 618,3$

Das Ion-Trap-CID-Spektrum dieses Fragmentions (**Abb. 4.30**) zeigt, daß sich wieder eine Veränderung an der Seitenkette stattgefunden haben muß, da die Peptidkette mit der aus *P. fluorescens* Koeln-G173 übereinstimmt (Abb. 4.12) und im Oktapol-CID-Spektrum die für den Ferribactinchromophor charakteristischen Fragmente nach Verlust der Seitenkette auftreten (**Abb. 4.31**). Die Fragmentionen, welche den zusätzlichen Substituenten enthalten, sind in diesem Fall um 42 u zu höheren Massen verschoben, was auf eine Acetyl-Gruppe (*CH_2CO) hinweisen könnte.

Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 597,4	$[M+2H^+]^{2+} =$ 618,3	Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 597,4	$[M+2H^+]^{2+} =$ 618,3
$Y_4^{\circ\circ}$ -Ser-Orn	270,2	270,1	B_{4D}°	916,5	958,4
Y_4° -Ser-Orn	288,2	288,1	$B_{4DO}^{\circ\circ}$	553,7	561,7
Y_4° -Orn	375,3	375,2	$C_3^{\circ\circ}$	722,4	764,4
$Y_4^{\circ\circ}$	471,3		B_{4D}	934,5	976,4
Y_4°	489,3	489,3	B_{4DS}	1021,5/ 511,4	1063,6/ 532,3
Y_5°	661,3	661,3	$B_{4S} + CH_2CO$	948,5	990,4
B_1	462,2	504,2	$B_{4O}^{\circ\circ S}$	539,9	560,9
B_2	533,2	575,2	$C_{4DS}^{\circ\circ}$	1038,5	548,5
$B_3^{\circ}-CH_2CO$	645,5	687,4	$[M+2H-Sk]^{2+}$	532,8	532,8
B_3-CH_2CO	663,3	705,4	$[M+2H-Sk+CH_2CO]^{2+}$		553,7
B_3	705,3	747,5	$[M^{\circ}+2H-CH_2CO]^{2+}$	567,4	588,3
$C_3^{\circ\circ}$	722,4	764,4	$[M+2H-CH_2CO]^{2+}$	576,3	597,3
B_4	819,5	861,4	$[M^{\circ}+2H-H_2O]^{2+}$	579,4	600,3
B_{4S}°	888,5	930,4	$[M^{\circ}+2H]^{2+}$	588,3	609,3
B_{4S}	906,6	948,4	$[M+2H]^{2+}$	597,4	618,3

Tab. 4.3 Vergleich der in Abb. 4.21 und 4.30 beobachteten Fragmentionen

(doppelt geladenen Ionen sind fett hervorgehoben)

Die Hypothese, daß eine Acetylgruppe in der Glutaminsäureseitenkette vorhanden ist, kann durch das Ion m/z 553,7 (letzte Spalte in **Tab. 4.3**) bestätigt werden. Es enthält eine zusätzliche Acetylgruppe, die auf eine Umlagerung von der Acetylgruppe der Seitenkette in die Peptidkette zurückzuführen ist. Bei dem Ion bei m/z 532,8 handelt es sich wieder um das Quasimolekülion $[M+2H^+]^{2+}$ nach Verlust der Seitenkette.

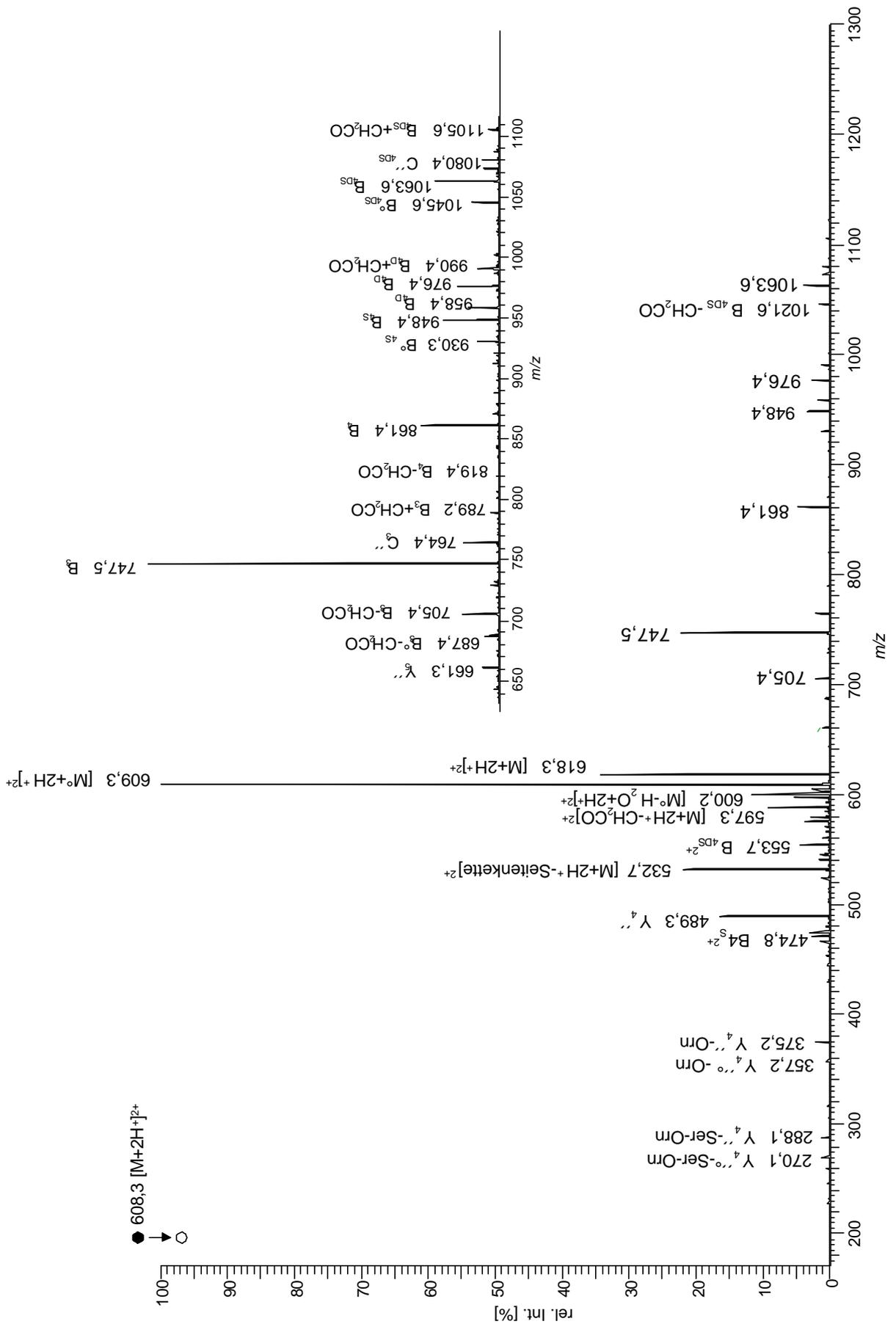


Abb. 4.30 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Moleküliions [M+2H]²⁺ = 618,3

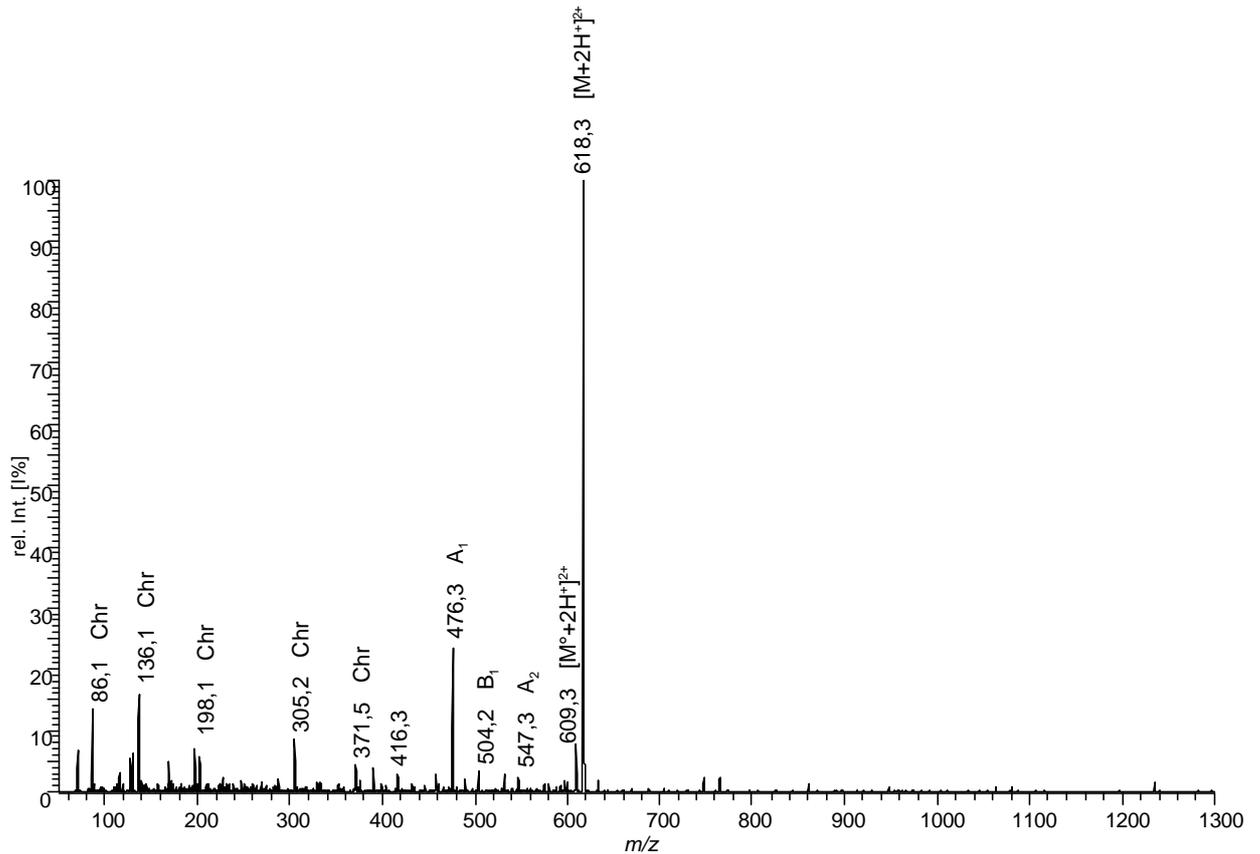


Abb. 4.31 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Moleküls $[M+2H]^{2+} = 618,3$

Mit der gleichen Begründung wie für den Fall der Hydroxygruppe wird folgende neue Seitenkette vorgeschlagen (**Abb. 4.32**)

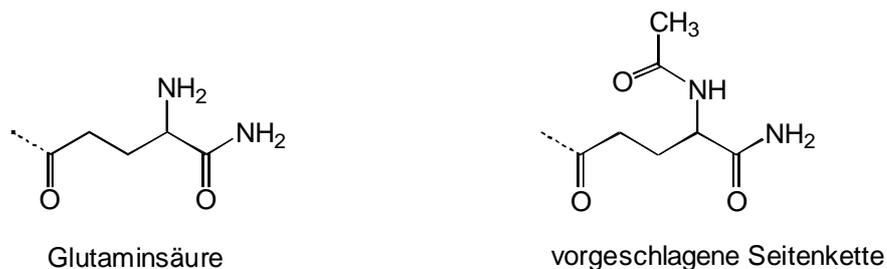


Abb. 4.32 Vorgeschlagene Seitenkette für das Ferribactin der Masse 1234 u

In diesem Fall erfolgt die Fragmentierung des Chromophors anders als in den bisher beschriebenen Fällen. Der Grund dafür kann möglicherweise an der Blockierung der Aminogruppe durch die Acetylgruppe liegen. Diese Blockierung verursacht, daß der Ammoniakverlust nicht mehr stattfinden kann, und dies verhindert das Auftreten der Ionen bei m/z 371 ($345+42$), m/z 429 ($387+42$), m/z 289 ($247+42$) und m/z 244 ($202+42$) (vergleiche Abb. 4.16 und 4.29).

4.3.3 Ion bei m/z 1251,7: $[M+H]^+ = 1251,7$

Aufgrund der geringeren Intensität des Quasimoleküliions konnten die Stoßexperimente nicht an dem doppelt geladenen Ion $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 626 durchgeführt werden. Es gelang jedoch die Isolierung des einfach geladenen Ions bei m/z 1251 und die weiteren Spektren wurden ausgehend von diesem Mutterion aufgenommen.

In dem Ion-Trap-CID-Spektrum tritt das Ion bei m/z 1064,6 ($[M-Glu+H]^+$) auf, was auf eine Peptidkette, die identisch mit der bisherigen gefundenen Peptidkette ist, hindeutet. Alle die Fragmente, welche die Seitenkette enthalten und für die Sequenz von Bedeutung sind, sind um 58 u zu höheren Massen verschoben. Nicht verschoben sind die C-terminalen Fragmente sowie solche, die nach Verlust der Seitenkette entstehen. Diese Fragmente sind grau hervorgehoben. Das Ion-Trap-CID-Spektrum ist in **Abb. 4.33** wiedergegeben und die sequenzrelevanten Fragmentationen sind in **Tab. 4.4** zusammengefaßt.

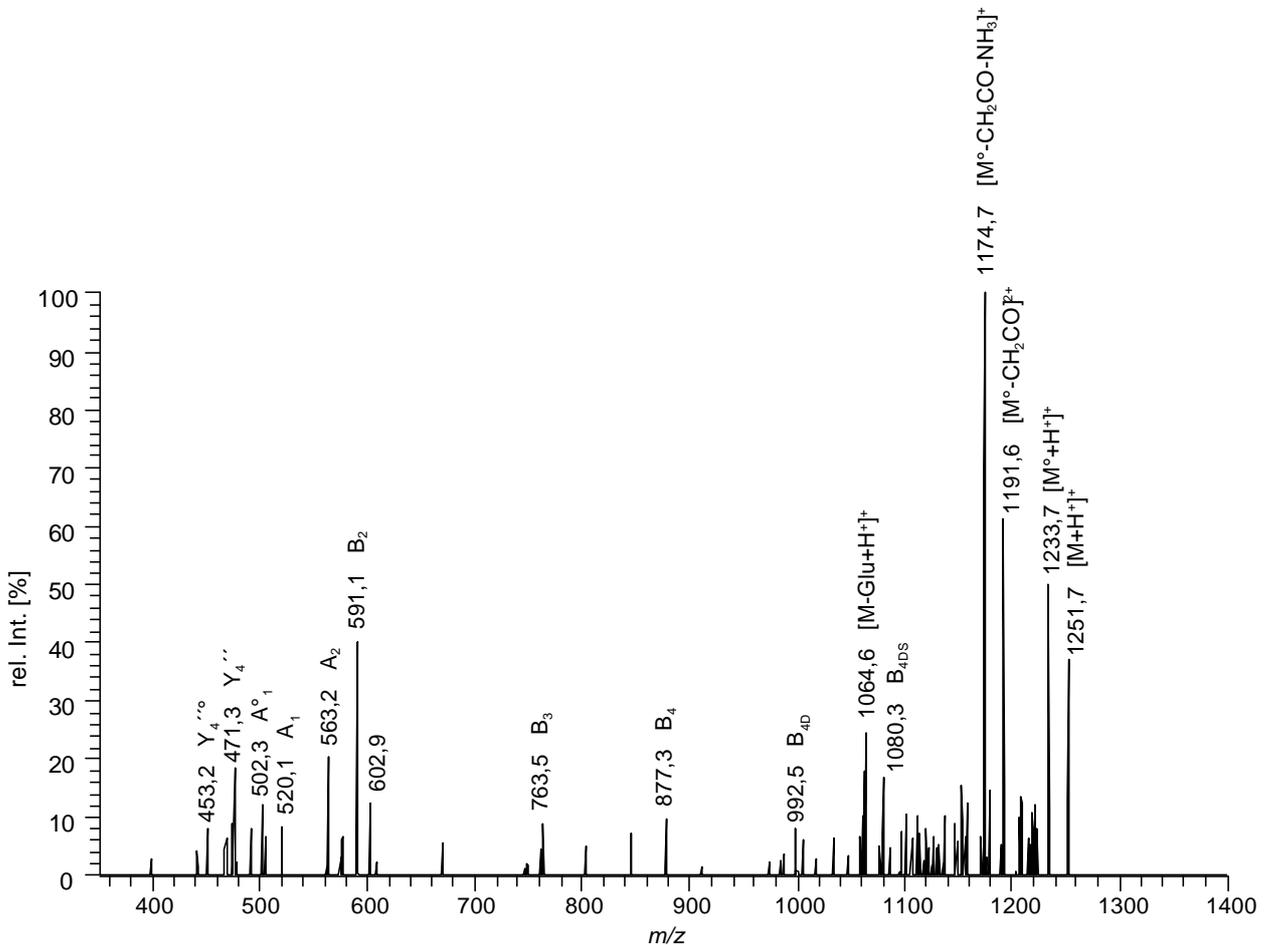


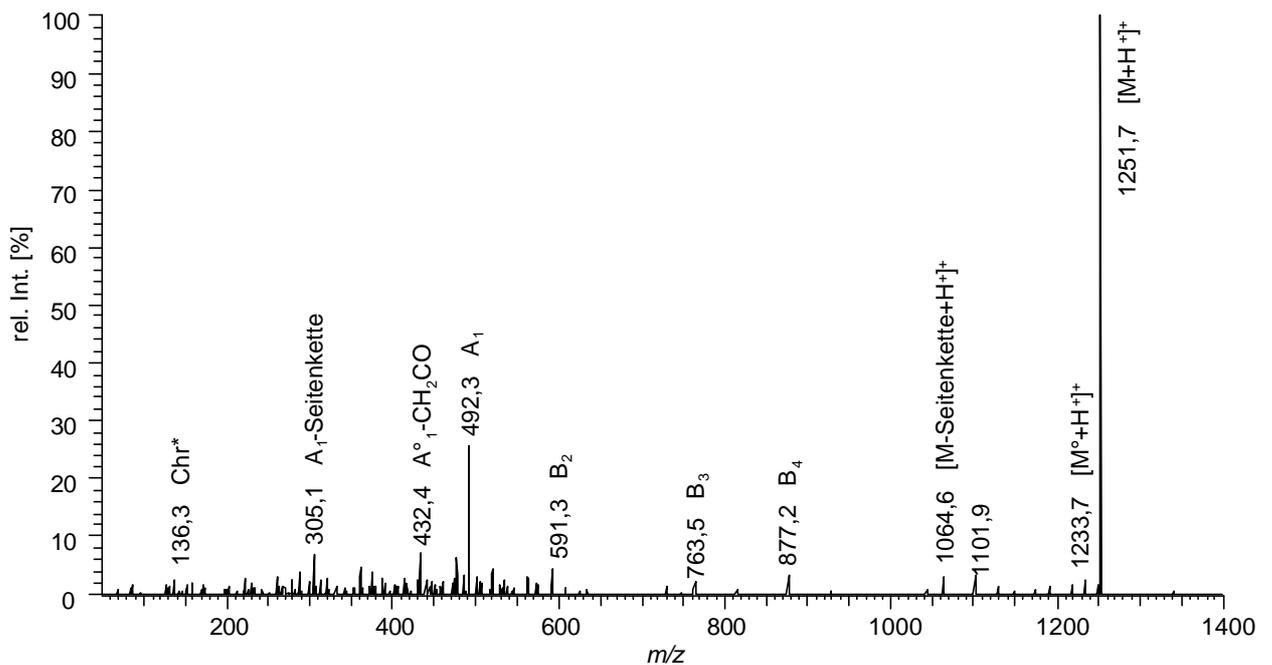
Abb. 4.33 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des einfach geladenen Molekülions $[M+H]^+ = 1251,7$

Fragment	$[M+2H]^{2+} =$ 597,4	$[M+H]^+ =$ 1251,7	Fragment	$[M+2H]^{2+} =$ 597,4	$[M+H]^+ =$ 1251,7
$Y_4''^{\circ}$	471,3	471,3	B_{4DS}°	1003,5/ 502,9	1061,3
Y_4''	489,3	489,3	B_{4DS}	1021,5/ 511,4	1080,3
B_1	462,2	520,1	C_{4DS}''	1038,5	1096,4
B_2	533,2	591,1	B_{4DO}''	1104,4	1162,4
B_3	705,3	763,3	$[M+nH\text{-Seitenkette}]^{n+}$	532,8	1064,6
B_4	819,5	877,3	$[M^{\circ}+nH\text{-H}_2\text{O-CH}_2\text{CO}]^{n+}$	558,4	1174,7
B_{4S}°	888,5	946,3	$[M^{\circ}+nH\text{-CH}_2\text{CO}]^{n+}$	567,4	1191,6
B_{4S}	906,6	964,3	$[M^{\circ}+nH]^{n+}$	588,3	1233,7
B_{4D}	934,5	992,5	$[M+nH]^{n+}$	597,4	1251,7

Tab. 4.4 Vergleich der in Abb. 4.21 und 4.34 beobachteten Fragmentionen

(nicht verschobene Fragmente sind grau hervorgehoben)

In dem Oktapol-CID-Spektrum des einfach geladenen Ions bei m/z 1251 tritt das für Ferribactine bereits beobachtete Fragmentierungsmuster auf (**Abb. 4.34**). Die Fragmente nach Verlust der Seitenkette stimmen mit denen anderer Ferribactine überein und die Fragmente, welche die Seitenkette enthalten, sind um 58 u zu höheren Massen verschoben. Diese Fragmente könnten auf die Existenz eines zusätzlichen Sauerstoffs (16 u) und einer Acetylgruppe (42 u) hindeuten. Die vorgeschlagene Seitenkette ist in **Abb. 4.35** dargestellt.


Abb. 4.34 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des einfach geladenen Moleküliions $[M+H]^+ = 1251,7$

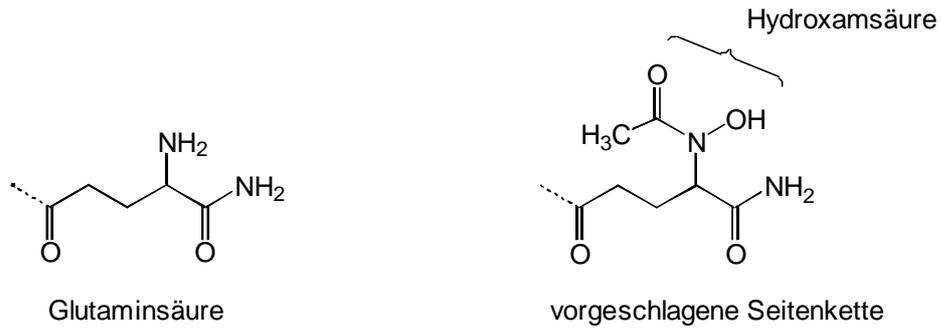


Abb. 4.35 Vorgeschlagenen Seitenkette für das Ferribactin der Masse 1250 u

Alle bisher beschriebenen Ferribactine (bei m/z 1193,1; m/z 1209,1; m/z 1235,1 und m/z 1251,1) unterscheiden sie sich lediglich in ihrer Seitenkette. Da die Peptidkette und der Chromophor bei allen Ferribactinen die gleichen sind, muß das Fragmentation der besprochenen Ferribactine nach Verlust der Seitenkette bei dem gleichen m/z -Wert auftreten.

Das doppelt protonierte Ion bei m/z 532,8 konnte als Ferribactin nach Verlust der Seitenkette identifiziert werden. Dazu diente das Ion-Trap-CID- Experiment, bei welchem fast alle B- und Y''-Fragmentationen auftreten (**Abb. 4.36**). Die Peptidkette, die sich aus diesen Fragmentationen errechnen läßt, stimmt mit der des Ferribactins G173 überein. Die beobachteten Fragmentationen sind in **Tab. 4.5** zusammengefaßt.

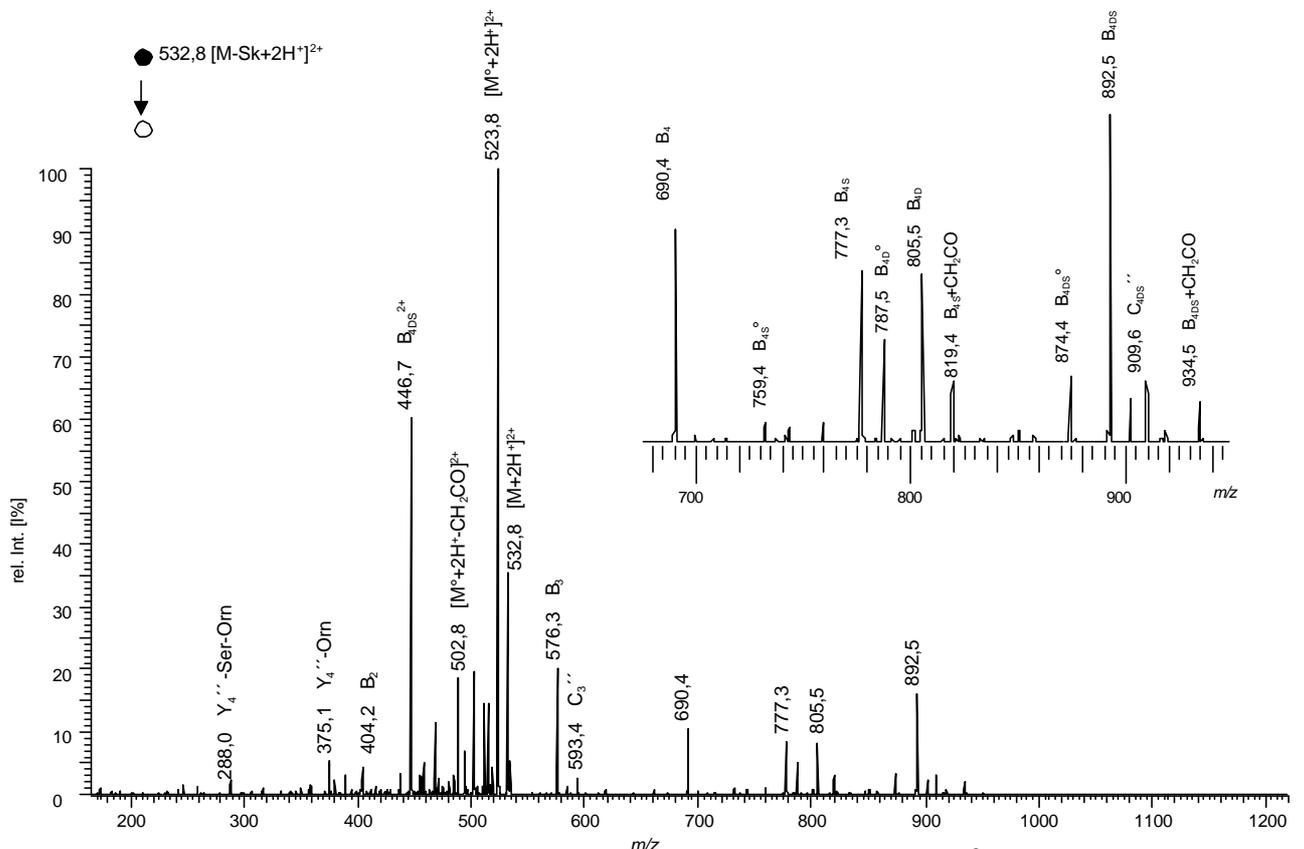


Abb. 4.36 Ion Trap-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasimoleküls $[M+2H]^{2+} = 532,8$

Fragment	<i>m/z</i>	Fragment	<i>m/z</i>
Y ₄ ^{''} -Ser-Orn	288,2	B ₄	690,4
Y ₄ ^{''} -Orn	375,3	B _{4S}	777,3
Y ₄ ^{''}	489,3	B _{4D}	805,5
B ₂	404,2	B _{4DS}	892,5
B ₃	576,3	B _{4O''S}	475,4

Tab. 4.5 Zuordnung der in Abb. 4.25 sequenzrelevanten Fragmentionen
(doppelt geladenen Ionen sind fett hervorgehoben)

4.3.4 Ion bei *m/z* 1207,1 u: [M+2H⁺]²⁺ = 604,3

In dem Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Ions bei *m/z* 604,3 (Abb. 4.37) treten alle die Peaks auf, die für den Ferribactinchromophor bereits beobachtet und zugeordnet wurden (s. Abb. 4.9). Dies weist auf einen typischen Ferribactinchromophor mit einer Glutaminsäureseitenkette hin.

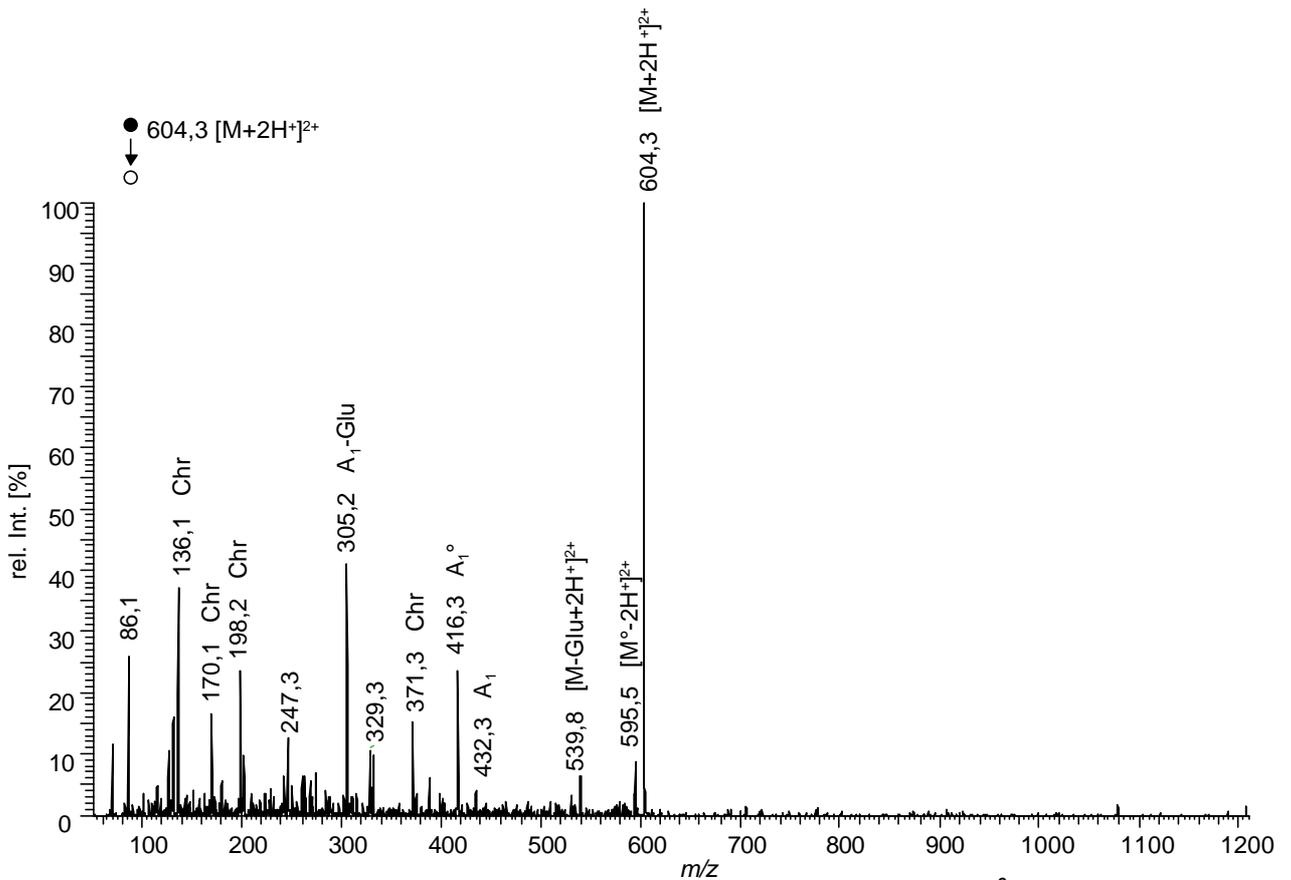


Abb. 4.37 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Moleküliions [M+2H⁺]²⁺ = 604,3

Das Fragmentierungsmuster dieses Ions läßt darauf schließen, daß der Unterschied zwischen diesem Pyoverdinin und dem Ferribactin G173 in der Peptidkette liegen muß.

Das Ion-Trap-CID-Experiment des Ions m/z 604,3 (**Abb. 4.39**) zeigt, daß die Peptidkette bis zur Asparaginsäure mit der bisher gefundenen Peptidkette identisch ist. Alle Asparaginsäure enthaltenden Fragmentationen sind um 14 u zu höheren Massen verschoben. Diese Daten sind in **Tab. 4.6** zusammengefaßt, wobei die verschobenen Massen in grau hervorgehoben sind.

Eine Massenverschiebung von 14 u deutet auf eine CH_2 -Gruppe hin, so daß die Asparaginsäure entweder als ihr Methylester vorliegt oder durch Glutaminsäure ersetzt sein könnte (**Abb. 4.38**).

In der Literatur gibt es Beispiele, für Veresterungen [77], aber bisher wurden nur zwei Pyoverdine gefunden, bei welchen eine Aminosäure (Alanin in beiden Fälle) durch eine andere (Glycin) ersetzt worden ist [78, 79].

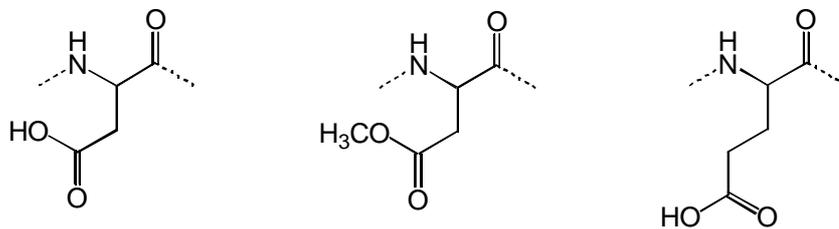


Abb. 4.38 Asparaginsäure, veresterte Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Fragment	$[M+2H]^2+=$ 597,4	$[M+2H]^2+=$ 604,3	Fragment	$[M+2H]^2+=$ 597,4	$[M+2H]^2+=$ 604,3
Y_4'' -Ser-Orn	288,2	302,1	$B_{4DO''}$	553,7	
Y_4'' -Orn	375,3	289,3	B_{4D}	934,5	948,5
$Y_4''^{\circ}$	471,3	485,3	B_{4DS}°	1003,5/ 502,9	1017,6/509,9
Y_4''	489,3	503,3	B_{4DS}	1021,5/ 511,4	1035,5/518,3
Y_5''	661,3	675,3	$B_{4S} + \text{CH}_2\text{CO}$	948,5	948,5/453,7
B_1	462,2	432,2	$B_{4O''S}$	539,9	1093,5
B_2	533,2		C_{4DS}''	1038,5	1052,6
$B_3^{\circ}-\text{CH}_2\text{CO}$	645,5	645,5	$[M^{\circ}+2H-\text{Glu}]^{2+}$	523,7	530,8
$B_3-\text{CH}_2\text{CO}$	663,3	663,1	$[M+2H-\text{Glu}]^{2+}$	532,8	539,8
B_3°	687,3	687,4	$[M^{\circ}+2H-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CO}]^{2+}$	558,4	565,3
B_3	705,3	705,4	$[M^{\circ}+2H-\text{CH}_2\text{CO}]^{2+}$	567,4	574,3
C_3''	747,5	747,5	$[M+2H-\text{CH}_2\text{CO}]^{2+}$	576,3	583,3
B_4	819,5	819,4	$[M^{\circ}+2H-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	579,4	586,3
B_{4S}°	888,5	888,5	$[M^{\circ}+2H]^{2+}$	588,3	595,3
B_{4S}	906,6	906,6	$[M+2H]^{2+}$	597,4	604,3

Tab. 4.6 Vergleich der in **Abb. 4.21** und **4.39** beobachteten Fragmentationen

(doppelt geladenen Ionen sind fett hervorgehoben, verschobenen Fragmentationen sind grau unterlegt)

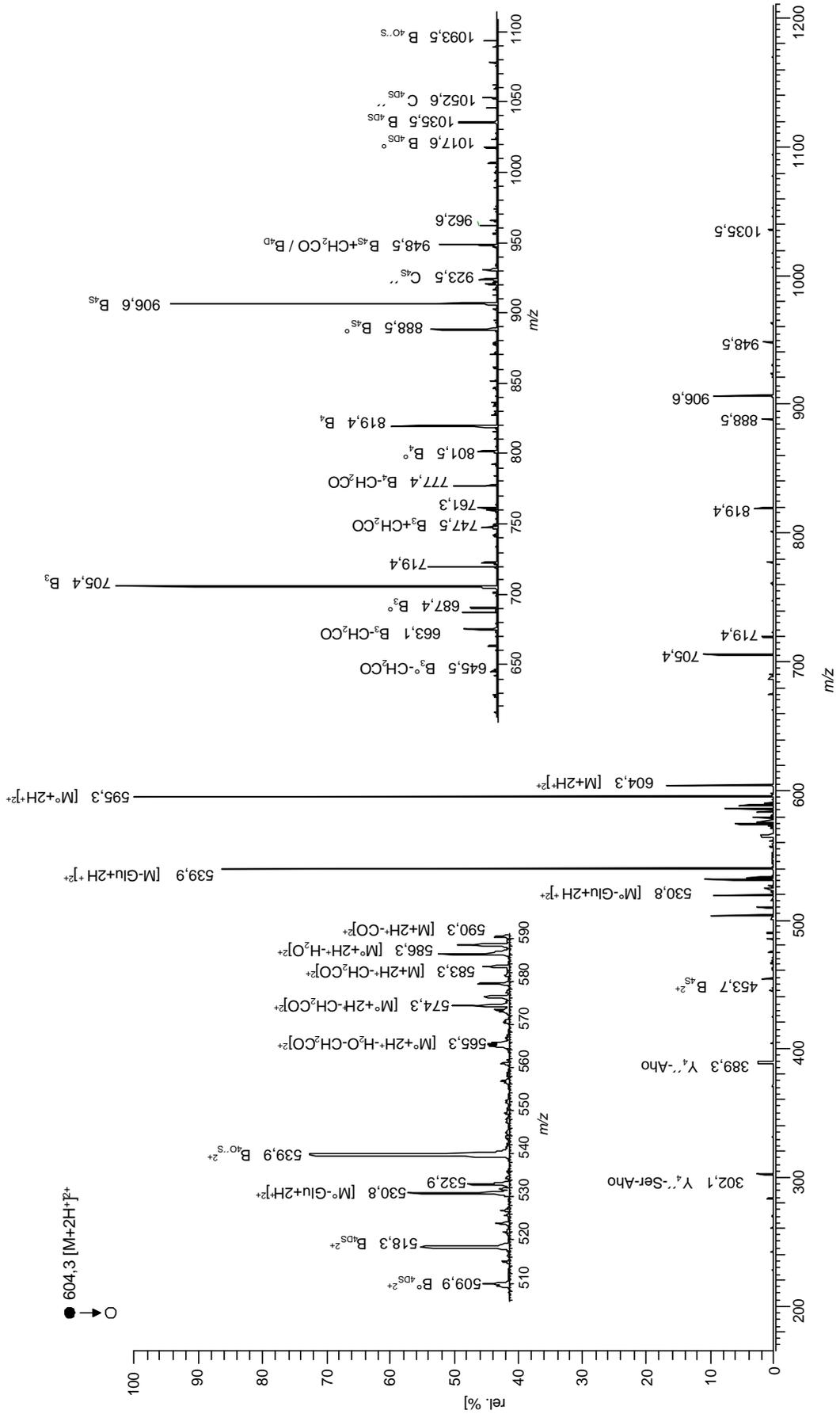


Abb. 4.39 Ion-Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Ions [M+2H]²⁺ = 604,3

4.3.5 Ion bei m/z 1223,2: $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$

Das Ion-Trap-CID-Spektrum dieses doppelt geladenen Ions zeigt, daß eine mit der des Ferribactins identische Peptidkette mit einer Masse von 1206 u (m/z 1207,1) vorhanden ist, d. h. die Peptidkette ist um 14 u zu höheren Massen gegenüber dem ursprünglichen Ferribactin verschoben. Dieses Spektrum ist in **Abb. 4.40** wiedergegeben. Alle N-terminalen Fragmentationen (**Tab. 4.8**) sind um 16 u zu höheren Massen verschoben. Dies deutet auch hier auf die Existenz eines zusätzlichen Sauerstoffs an der Seitenkette hin. Dies wurde durch das Oktapol-CID-Spektrum bestätigt (**Abb. 4.41**).

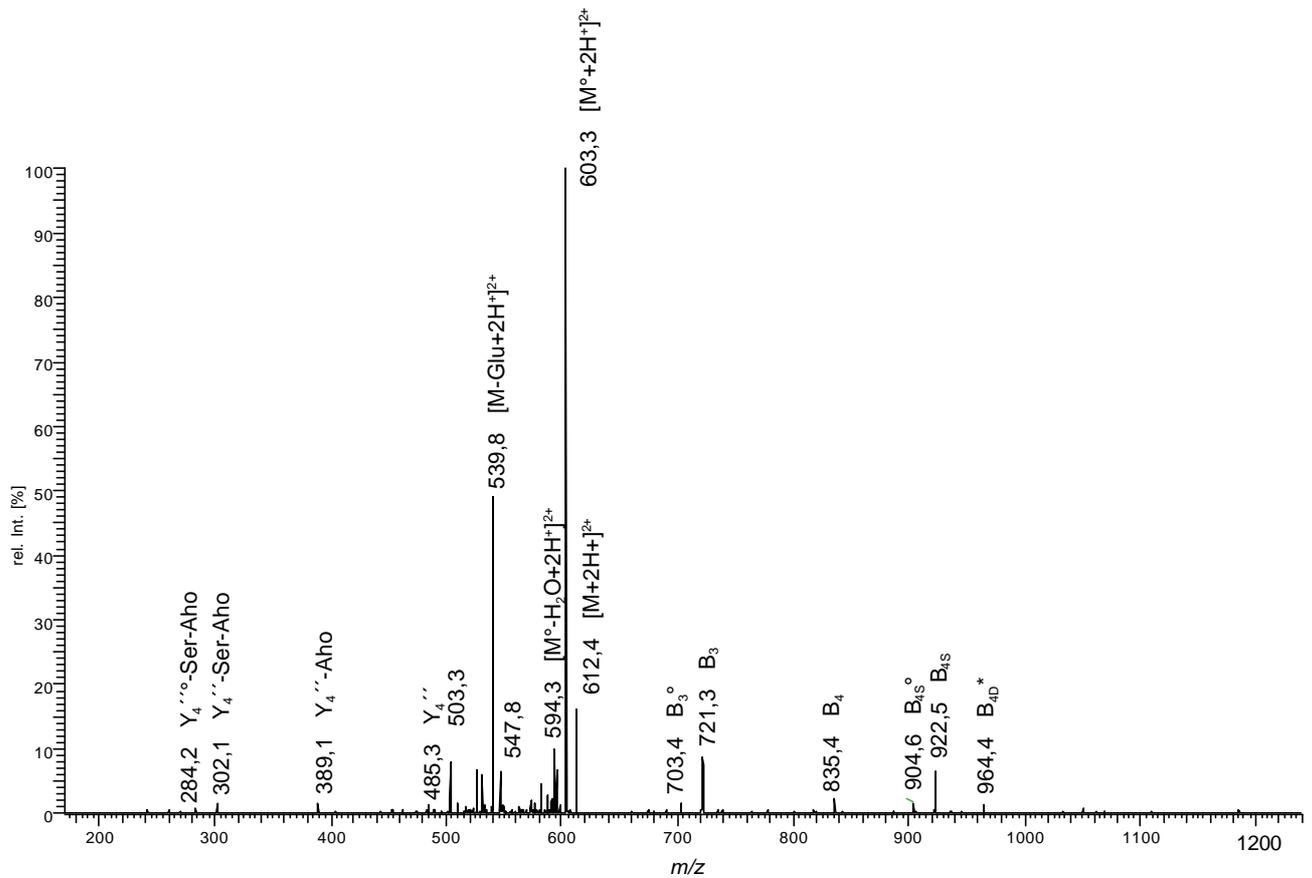


Abb. 4.40 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Ions $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$

Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 605,3	$[M+2H^+]^{2+} =$ 612,4	Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 605,3	$[M+2H^+]^{2+} =$ 612,4
Y ₄ ''-Ser-Orn	288,1	302,1	B ₄	835,4	835,4
Y ₄ ''-Orn	375,3	389,1	B _{4S}	922,3	922,5
B ₂	549,2	549,2	B _{4D}	950,5	964,4
B ₃	721,3	721,3	B _{4DS}	523,9	530,9

Tab. 4.8 Vergleich der in **Abb. 4.36** und **4.41** sequenzrelevanten Fragmentionen
(verschobene Fragmente sind grau unterlegt)

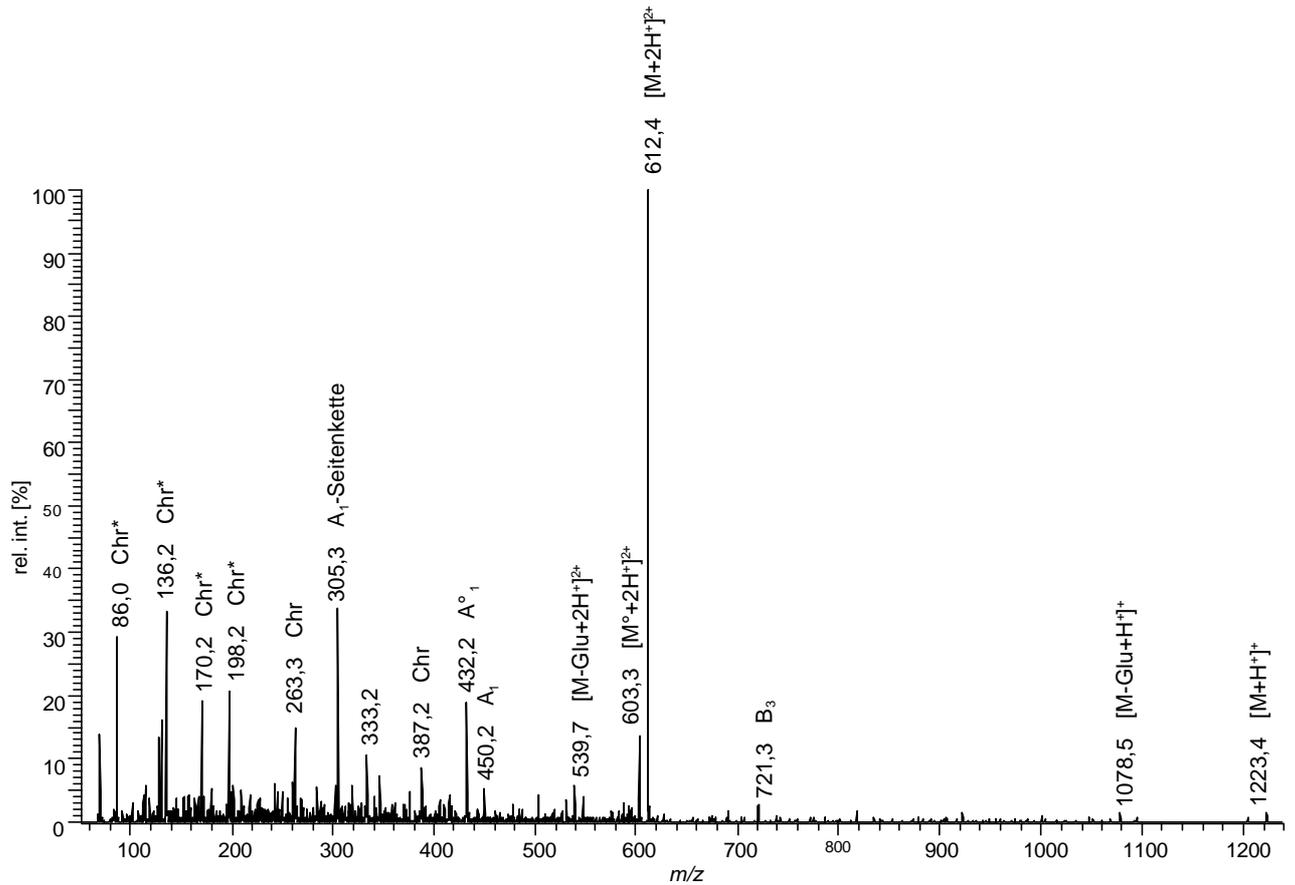


Abb. 4.41 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Ions $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$

Das Oktapol-CID-Spektrum des Molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$ zeigt das gleiche Fragmentierungsverhalten wie das von $[M+2H^+]^{2+} = 605,4$ (Abb. 4.24). Daher und aus den gleichen Gründen wie für $[M+2H^+]^{2+} = 605,4$ wird eine Ferribactinstruktur mit einer N-hydroxy-glutaminsäureseitenkette und einer mit der des Ferribactins identische Peptidkette mit einer Masse von 1206 u vorgeschlagen.

4.3.6 Ion bei m/z 1249,2: $[M+2H]^{2+} = 625,3$

Das Ion-Trap-CID-Spektrum dieses Fragmentions (**Abb. 4.42**) zeigt, daß wieder eine Veränderung in der Seitenkette zu suchen ist, da die Peptidkette mit der des Ferribactins mit der Masse 1206 u (m/z 1207,1) übereinstimmt (Abb. 4.39) und in dem Oktapol-CID-Spektrum die für den Ferribactinchromophor charakteristischen Fragmente nach Verlust der Seitenkette auftreten (**Abb. 4.43**). Die Fragmentationen sind in diesem Fall um 42 u zu höheren Massen verschoben, was auf eine Acetyl-Gruppe (CH_2-CO) hinweist.

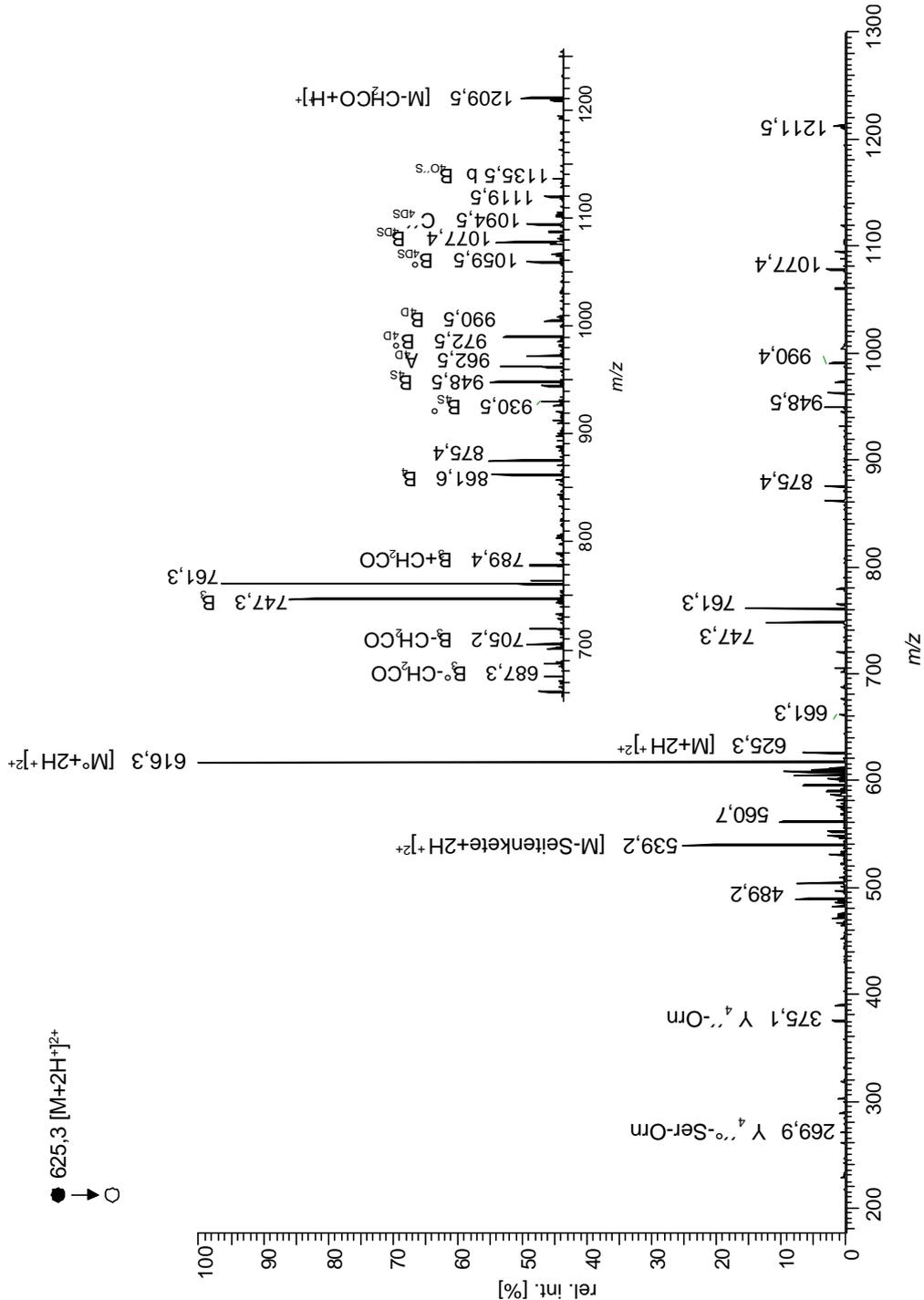


Abb. 4.42 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Ions $[M+2H]^{2+} = 625,3$

Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 618,3	$[M+2H^+]^{2+} =$ 625,3	Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 618,3	$[M+2H^+]^{2+} =$ 625,3
Y ₄ ^{''} -Ser-Orn	288,2	287,9	B ₄	861,4	861,6
Y ₄ ^{''} -Orn	375,3	375,1	B _{4S}	948,4	948,5
B ₂	575,2	575,1	B _{4D}	976,4	990,5
B ₃	747,5	747,3	B _{4DS}	1063,6/ 532,3	1077,4/ 539,2

Tab. 4.9 Zuordnung der in Abb. 4.31 und 4.43 sequenzrelevanten Fragmentionen

(verschobene Fragmente sind grau unterlegt)

Aufgrund der Oktapol- und Ion-Trap-Spektren wird eine Ferribactinstruktur vorgeschlagen, bei der die Peptidkette identisch mit der aus dem Ferribactin der Masse 1206 u (m/z 1207,1) ist. Bei der Seitenkette handelt es sich um Glutaminsäure mit einer Acetylgruppe an der Aminogruppe. Die Fragmentierung des Chromophors zeigt wieder eine Blockierung der Aminogruppe durch die Acetylgruppe (vgl. Abb. 4.29).

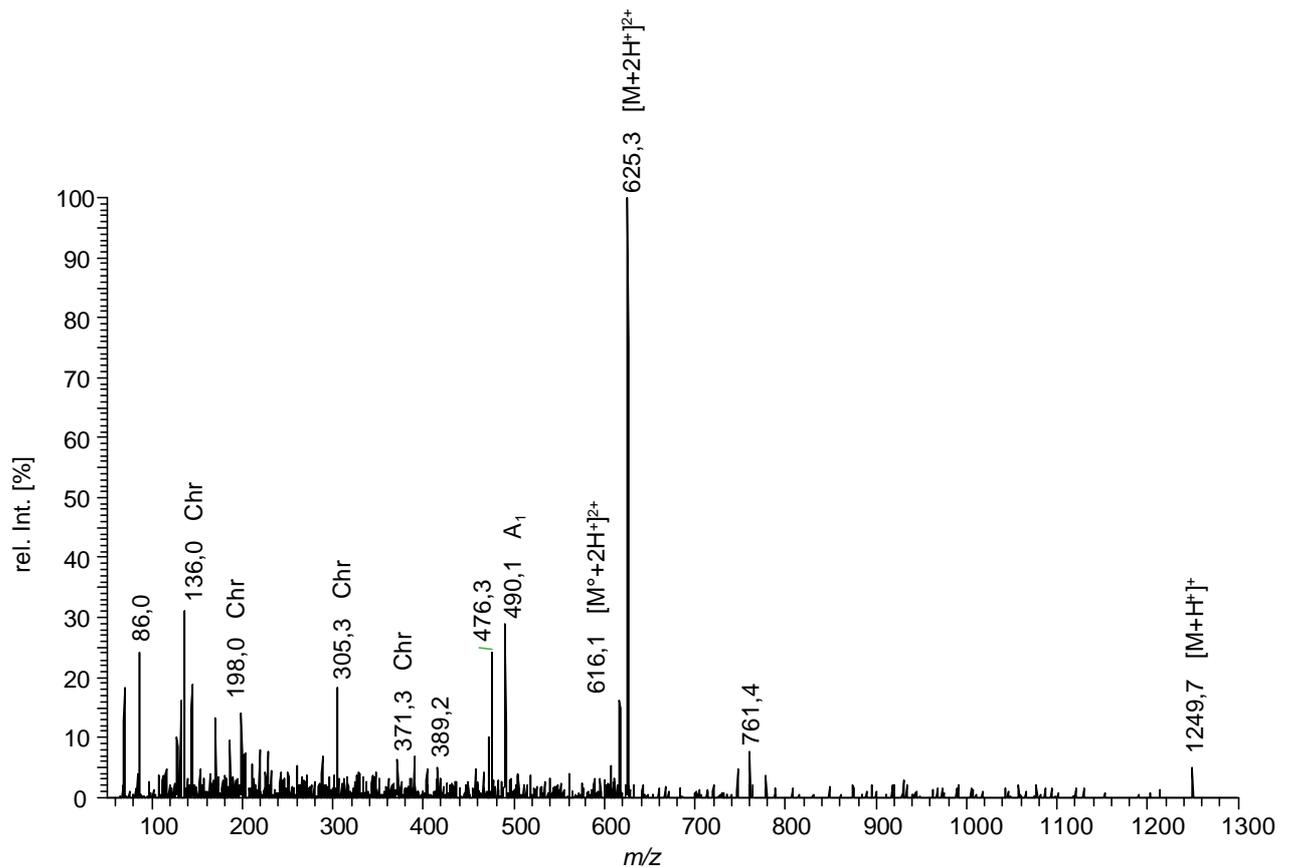


Abb. 4.43 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Ions $[M+2H^+]^{2+} = 625,3$

4.3.7 Ion bei m/z 1265,7 u: $[M+H]^+ = 1265,7$

Aufgrund der geringeren Intensität konnten die Stoßexperimente nicht an dem doppelt geladenen Ions $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 633 durchgeführt werden. Es gelang jedoch die Isolierung des einfach geladenen Ions bei m/z 1265. Die weiteren Spektren wurden ausgehend von diesem Mutterion aufgenommen.

In dem Ion-Trap-CID-Spektrum (**Abb. 4.45**) tritt ein Ion bei m/z 1078,5 auf, welches auf eine Peptidkette, die identisch mit der des Ferribactins mit der Masse 1206 u (m/z 1207) ist, hindeutet. Alle Fragmente, welche die Seitenkette enthalten und für die Sequenz von Bedeutung sind, sind um 58 u zu höheren Massen verschoben. Nicht verschoben sind die C-terminalen und die Fragmente, die nach Verlust der Seitenkette entstehen. Diese Fragmente (**Tab. 4.10**) sind grau hervorgehoben.

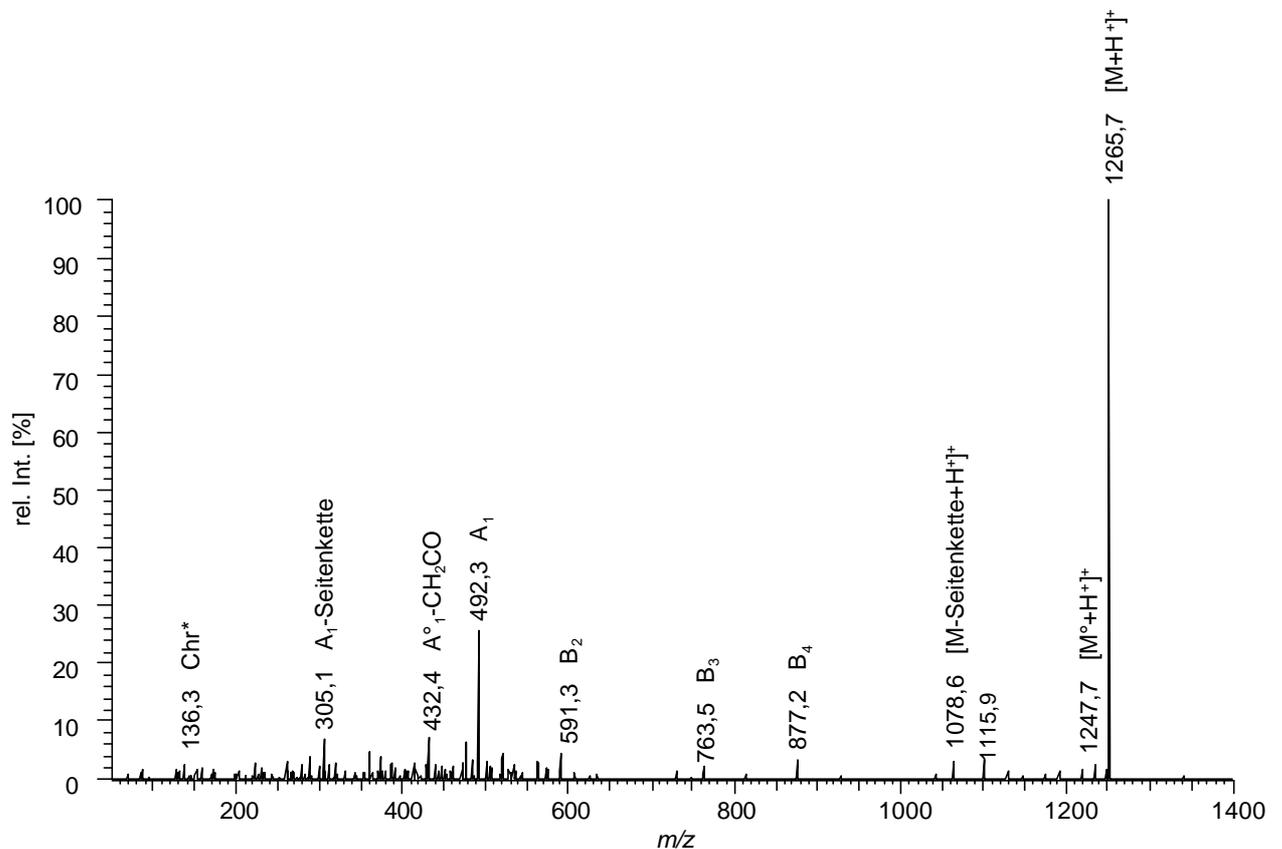


Abb. 4.44 Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des einfach geladenen Ions $[M+H]^+ = 1265,7$

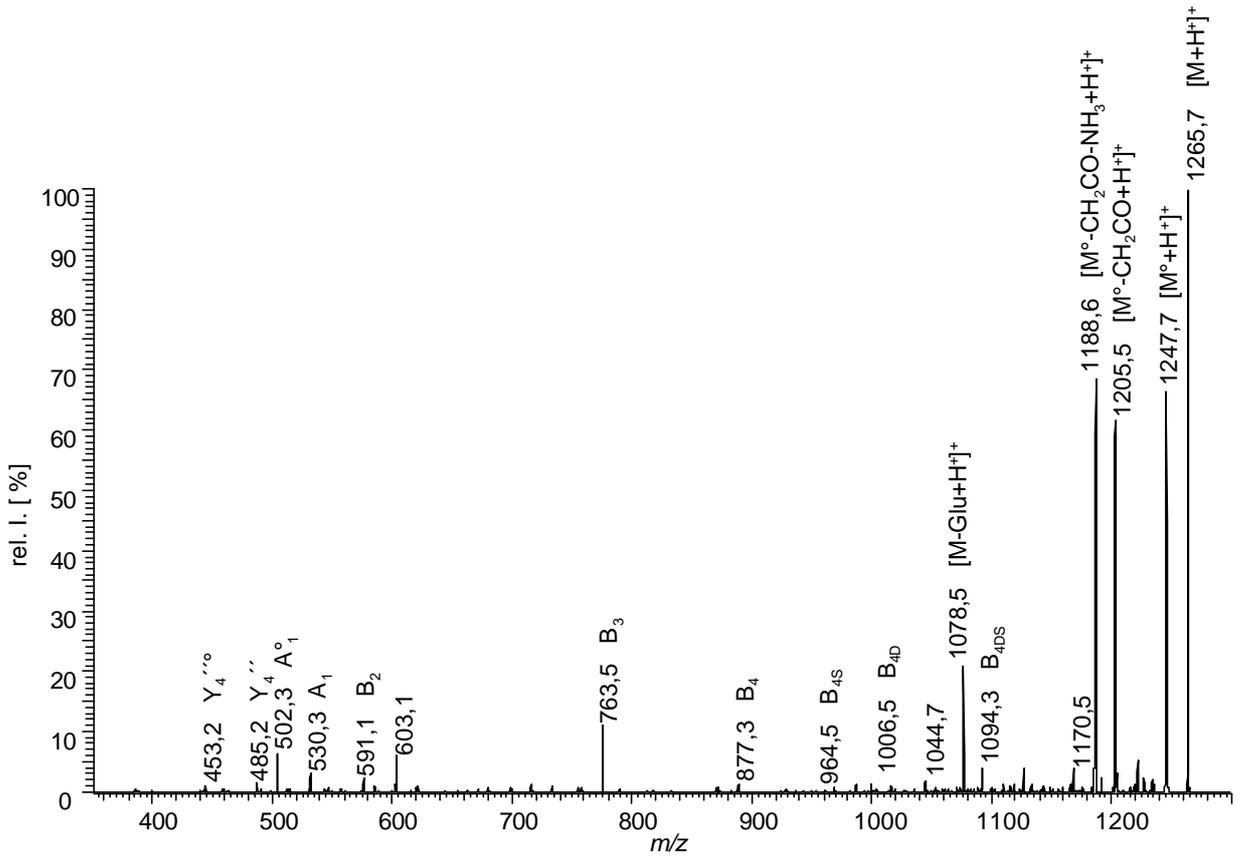


Abb. 4.45 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des einfach geladenen Ions $[M+H]^+ = 1265,7$

Fragment	$[M+2H]^{2+} =$ 604,3	$[M+H]^+ =$ 1265,7	Fragment	$[M+2H]^{2+} =$ 604,3	$[M+H]^+ =$ 1265,7
Y ₄ '''	503,3	503,2	B _{4D}	948,5	1006,5
B ₁	432,2	520,1	B _{4DS}	1035,5/ 518,3	1093,3
B ₂		591,3	$[M+nH\text{-Seitenkette}]^{2+}$	539,8/1078,5	1078,5
B ₃	705,4	763,5	$[M^\circ+nH\text{-H}_2\text{O-CH}_2\text{CO}]^{n+}$	565,3	1187,6
B ₄	819,4	877,3	$[M^\circ+nH\text{-CH}_2\text{CO}]^{n+}$	583,3	1205,5
B _{4S} ^o	888,5		$[M^\circ+nH]^{n+}$	565,3	1247,7
B _{4S}	906,6	964,5	$[M+nH]^{n+}$	604,4	1265,7

Tab. 4.10 Vergleich der in Abb. 4.26 und 4.44 beobachteten Fragmentationen

(doppelt geladenen Ionen sind fett hervorgehoben, verschobene Fragmente sind grau unterlegt)

Aufgrund der Oktapol- und Ion-Trap-Spektren (**Abb. 4.44** und 4.45) wird eine Ferribactinstruktur vorgeschlagen, in der die Peptidkette identisch mit der aus dem Ferribactin der Masse 1206 u (m/z 1207) ist. Bei der Seitenkette handelt es sich um Glutaminsäure, bei der die Aminogruppe in eine Hydroxamsäure umgewandelt ist.

Diese Ferribactine (Ionen bei m/z 1193,1; m/z 1209,1; m/z 1235,1 und m/z 1251,1) enthalten die gleiche Peptidkette, die in der Asparaginsäure um 14 u zu höheren Massen verschoben ist, und den gleichen Ferribactinchromophor. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Seitenkette, was zu einem identischen Fragmentation nach Verlust der Seitenkette führt. Dieses Fragmentation wurde bei m/z 1078,2 identifiziert (vergleiche Abb. 4.36). Das Ion-Trap-CID-Spektrum dieses Ions zeigt das gleiche Fragmentierungsmuster wie das MS²-Ion-Trap-Spektrum des Ions m/z 532,8 (Abb. 4.36 und 4.46). Die für die Sequenzierung relevanten Daten sind in **Tab. 4.11** einander gegenübergestellt.

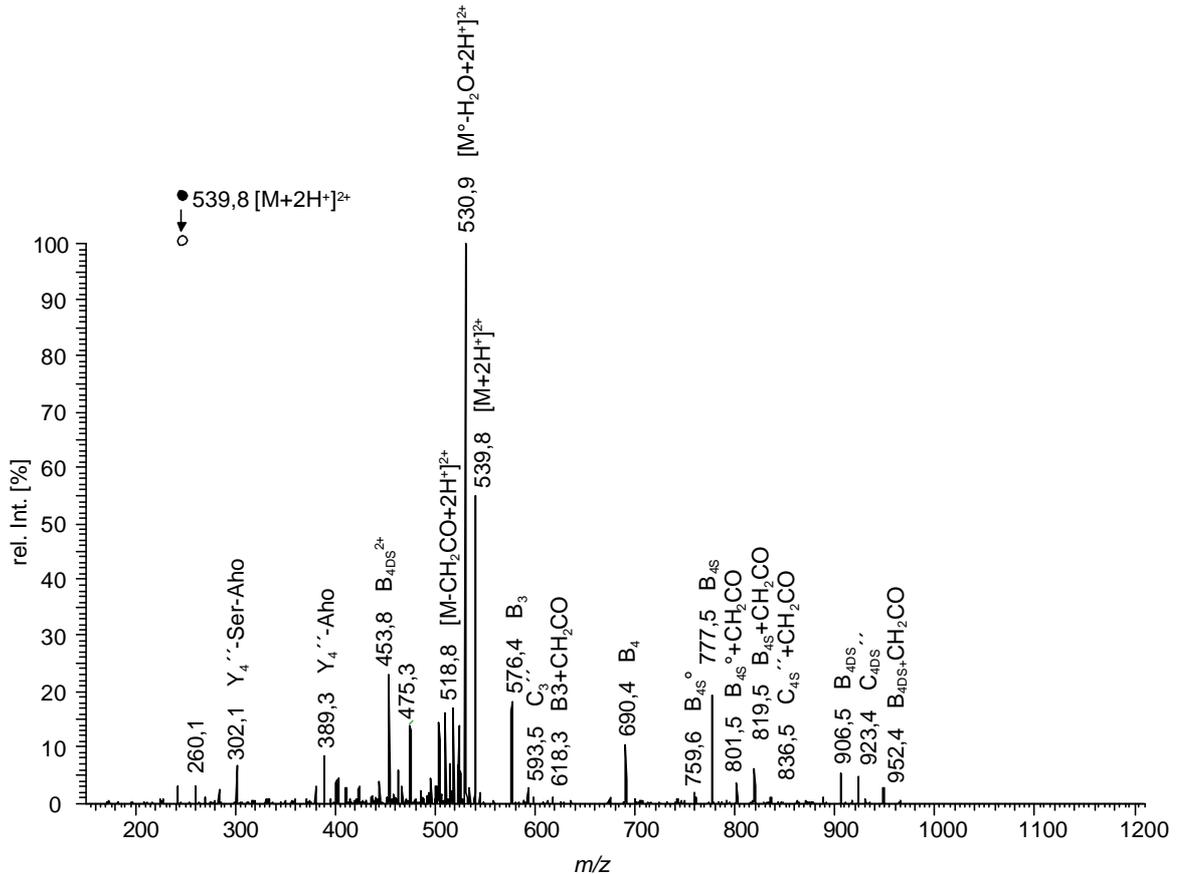


Abb. 4.46 Ion Trap-CID-MS²-Spektrum des doppelt geladenen Ions $[M+2H^+]^{2+} = 539,8$

Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 532,8	$[M+2H^+]^{2+} =$ 539,8	Fragment	$[M+2H^+]^{2+} =$ 532,8	$[M+2H^+]^{2+} =$ 539,8
Y ₄ ''-Ser-Orn	288,2	302,1	B ₄	690,4	690,4
Y ₄ ''-Orn	375,3	389,3	B _{4S}	777,3	777,3
B ₂	404,2	404,2	B _{4D}	805,5	819,5
B ₃	576,3		B _{4DS}	892,5	906,5

Tab. 4.7 Zuordnung der in Abb. 4.40. sequenzrelevanten Fragmentationen

(verschobene Fragmentationen sind grau unterlegt)

4.4 Zusammenfassung

In Eisenmangelkulturen von *Pseudomonas fluorescens* G173 konnten mehrere Siderophore nachgewiesen werden. Außer dem bereits bekannten SUCA-Pyoverdin [58] wurden das Pyoverdin mit Äpfelsäureamid als Seitenkette, das Azotobactin, das Succinopyoverdin und das Ferribactin mittels Massenspektrometrie untersucht.

Bei einer Kontrolluntersuchung der Siderophore aus dem in Köln gezüchteten *Pseudomonas fluorescens* G173 wurde festgestellt, daß dieser Stamm vermutlich wegen einer Mutation nicht mehr in der Lage war, große Pyoverdinmengen zu produzieren, und statt Pyoverdinen neue, bisher nicht bekannte Ferribactine produzierte (**Abb. 4.47**). Dieser neue Stamm wurde *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 genannt.

Die neuen Ferribactine können in zwei Gruppen eingeordnet werden. Zu der ersten Gruppe gehören die Ferribactine mit Veränderungen lediglich in der Seitenkette, bei welchen die Glutaminsäure durch **(1)** N-Hydroxy-glutaminsäure (m/z 605,3), **(2)** N-Acetyl-glutaminsäure (m/z 618,3) oder **(3)** N-Acetyl-N-hydroxy-glutaminsäure (m/z 1251,7) ersetzt ist. Das von *P. fluorescens* G173 produzierte Ferribactin erhält nur zwei Hydroxamatgruppen, die das Eisen komplexieren können, was zu einem weniger effizienten Eisentransport verglichen mit dem der Pyoverdine führt. Diese dritte Hydroxamatgruppe kann als ein Versuch, den Eisentransport unter Pyoverdinmangelbedingungen zu optimieren, interpretiert werden.

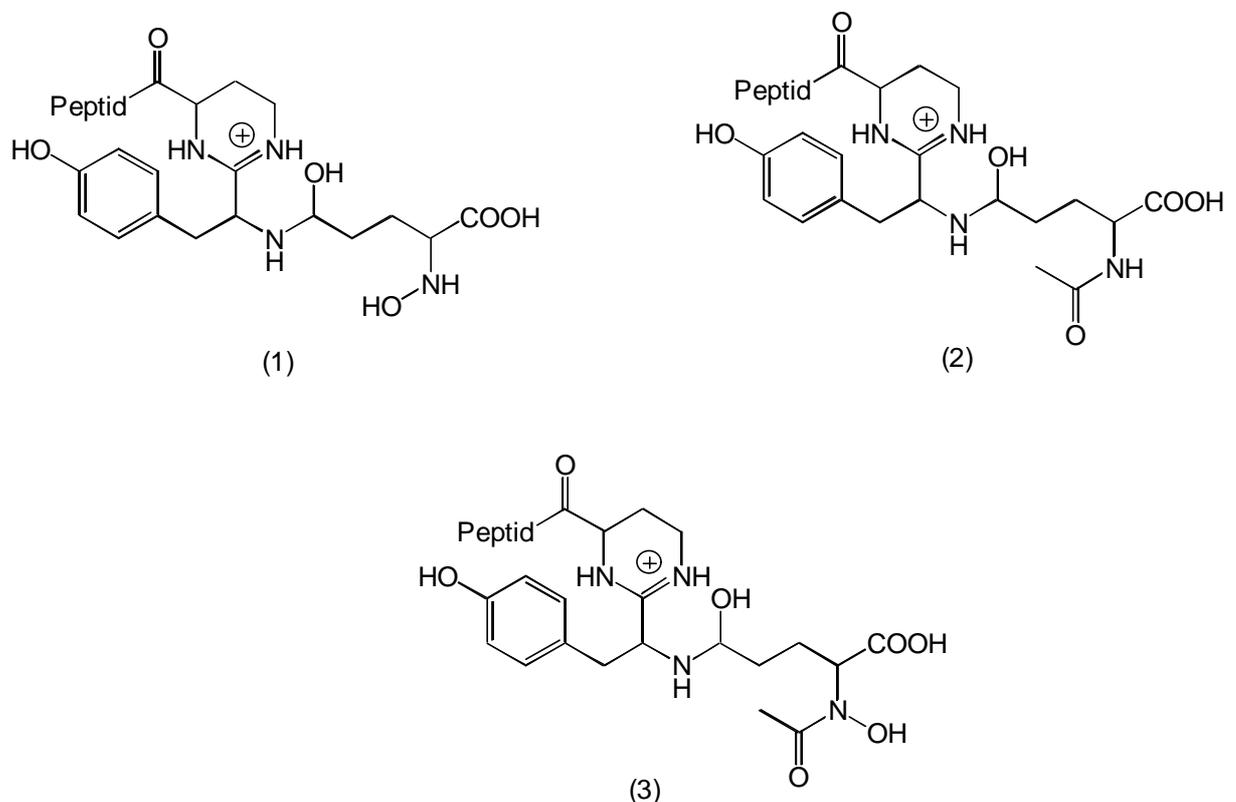


Abb. 4.47 Mögliche Veränderungen an der Seitenkette bei einigen Ferribactinen aus *P. fl.* Koeln-G173

Die zweite Gruppe der neuen Ferribactine hat sowohl Veränderungen in der Seitenkette als auch in der Peptidkette. Die Veränderungen der Seitenkette sind die gleichen wie bei der ersten Gruppe. Bei den Veränderungen an der Peptidkette handelt es sich entweder um einen Methylester der Asparaginsäure oder um den Ersatz der Asparaginsäure durch Glutaminsäure.

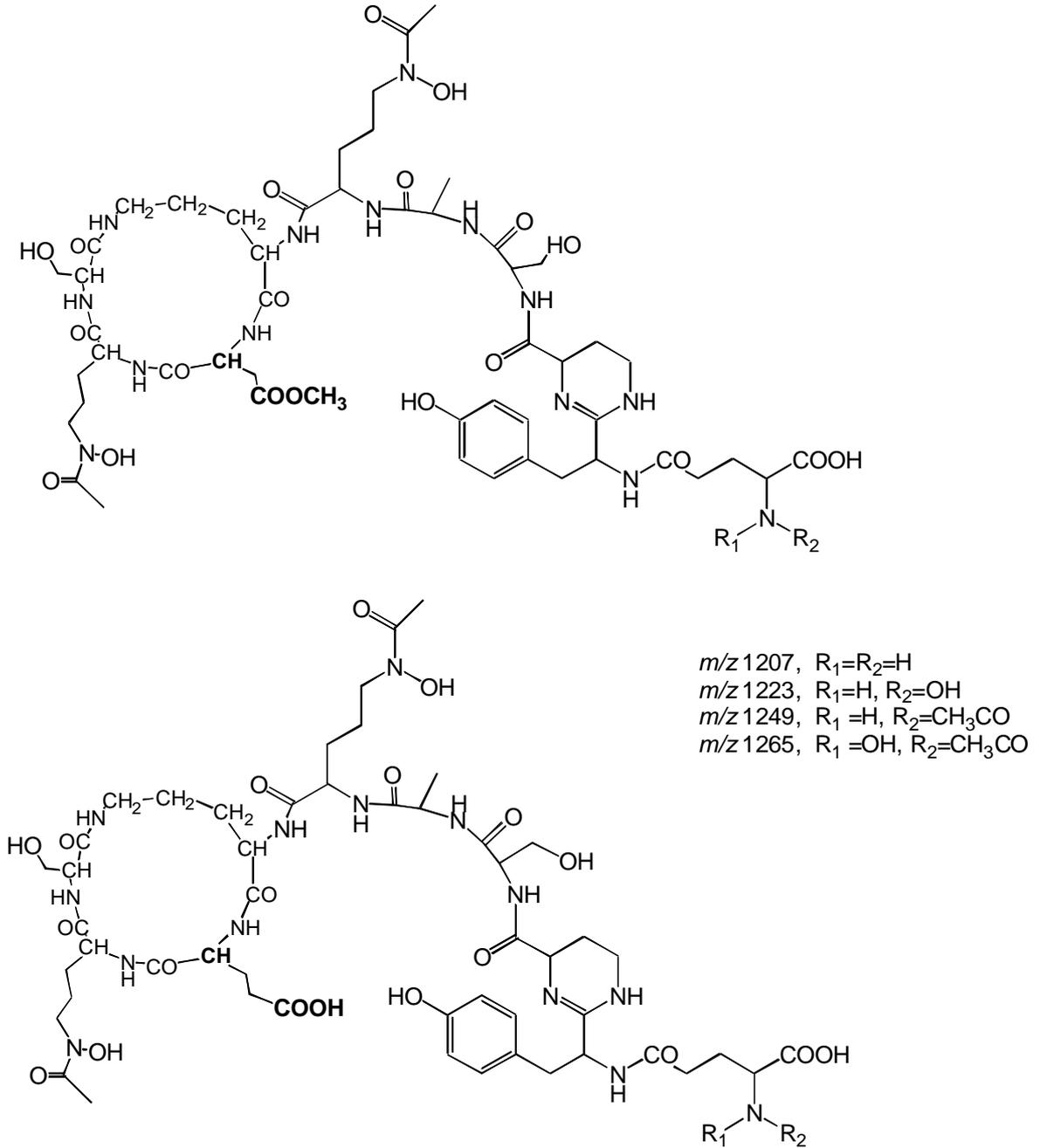


Abb. 4.48 Möglich Veränderungen an der Peptidkette bei einigen Ferribactinen aus P. fl. Koeln-G173

5 NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

5.1 Einleitung

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollten die durch die massenspektrometrischen Untersuchungen ermittelte Zusammensetzung des Pyoverdins und des Ferribactins G173, insbesondere den Einbaumodus der Aminosäuren im cyclischen Peptidteil, bestätigen. Weiterhin sollten die typischen Ferribactin- und Pyoverdinchromophore nachgewiesen werden. Alle NMR-Experimente an diesen Verbindungen wurden mit einer ca. 20 mM Lösung von Pyoverdin bzw. Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) durchgeführt. Um die Austauschgeschwindigkeit der Amidprotonen zu minimieren, wurde die Lösung mit Phosphatpuffer auf pH 4,3 eingestellt. Auf diese Weise konnten neben den CH-Protonen zusätzlich alle an Stickstoff gebundenen Wasserstoffatome detektiert werden, da bei der Verwendung vollständig deuterierten Wassers die Amidprotonen ausgetauscht werden [80]. Das Wassersignal wurde durch Vorsättigung oder Verwendung der Watergate Pulssequenzen unterdrückt. Als innerer Standard wurde DSS hinzugegeben.

Die Zuordnung der durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmten Protonenresonanzen erfolgte mittels der 2D- (H,H)-COSY- (**H,H-Correlated Spectroscopy**) und TOCSY- (**Total Correlated Spectroscopy**) Experimente und durch Vergleich der Verschiebungen mit Literaturwerten. Die HMQC (**Heteronuclear Multiple Quantum Coherence**) und HMBC (**Heteronuclear Multiple Bond Coherence**) Experimente erlaubten, zusammen mit dem ¹³C- und DEPT- (**Distortionless Enhancement by Polarization Transfer**) Spektren, die Zuordnung der Kohlenstoffatome.

Um die Aminosäuresequenz der Peptidkette zu überprüfen, wurden zwei unterschiedliche 2D-NMR-Techniken angewandt.

- ROESY (**Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy**) liefert Strukturinformationen durch Cross-peaks zwischen den NH-Protonen und den räumlichen benachbarten α- oder β-Protonen der vorhergehenden Aminosäure.
- HMBC liefert eine heteronukleare long-range-correlation durch Cross-peaks zwischen den NH-Protonen und den Carbonylkohlenstoffatomen der nachfolgenden Aminosäure.

5.2 Pyoverdin G173

5.2.1 Zuordnung der ^1H -Resonanzen von PVD G173

Das ^1H -NMR-Spektrum des Pyoverdins G173 bei 298 K in einem $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Gemisch (9:1, v:v) ist in **Abb. 5.1** wiedergegeben. Zur Zuordnung der Signale dienten das H,H-COSY (**Abb. 5.3**) und das TOCSY-Spektrum (**Abb. 5.4**) sowie der Vergleich mit Literaturdaten [21, 81, 82]. Aus beiden zweidimensionalen Spektren konnten auch die für die Sequenzierung wichtigen Amidprotonen-Resonanzen zugeordnet werden. Die Zuordnung wird im folgenden anhand der TOCSY und H,H-COSY-Spektren behandelt. Die ^1H -NMR-Daten sind in **Tab. 5.1** zusammengefasst. Die Struktur des Pyoverdins SUCA-G173 ist in **Abb. 5.11** wiedergegeben.

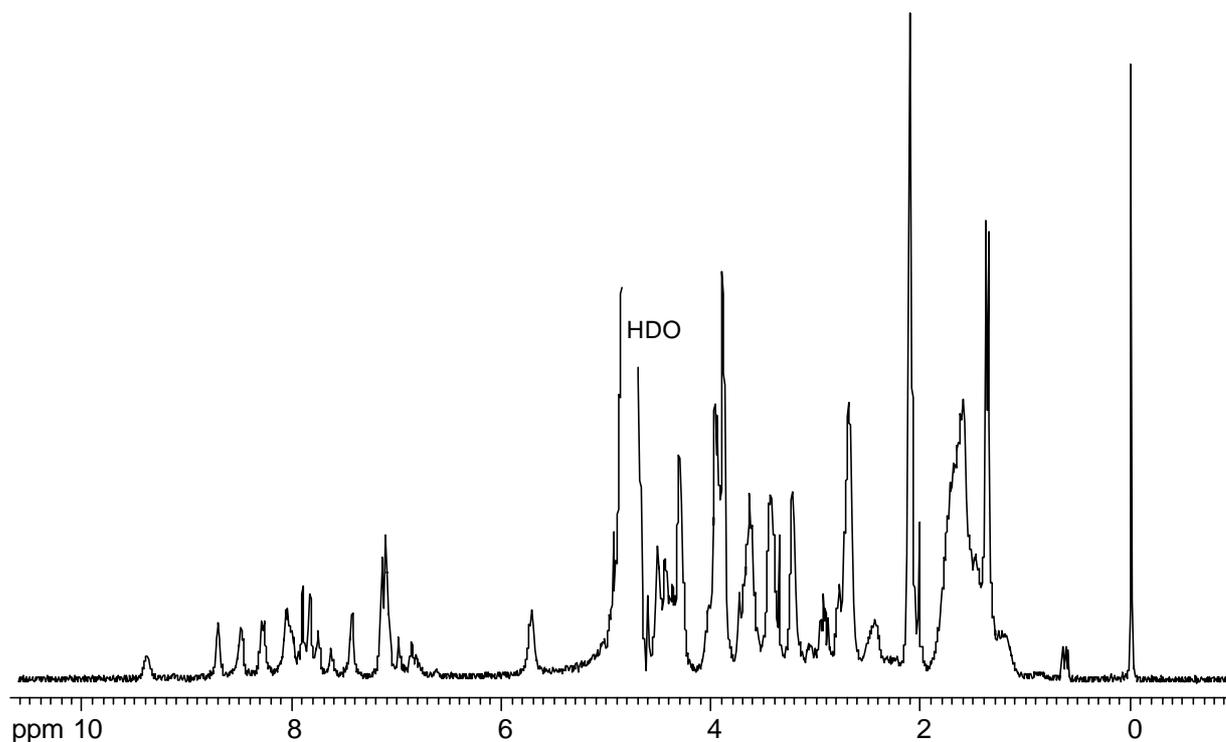


Abb. 5.1 ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Pyoverdin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298K)

Der für Pyoverdine typische *ortho*-Dihydroxychinolinchromophor (**Abb. 5.2**) kann anhand seiner charakteristischen Signale im Tieffeldbereich bereits im eindimensionalen Spektrum (**Abb. 5.1**) identifiziert werden. Die Resonanzen des aliphatischen Protons H_1 liegen bei 5,71 ppm und die der aromatischen Protonen bei 7,94 ppm (H_6), bei 7,16 ppm (H_7) und bei 7,10 ppm (H_{10}).

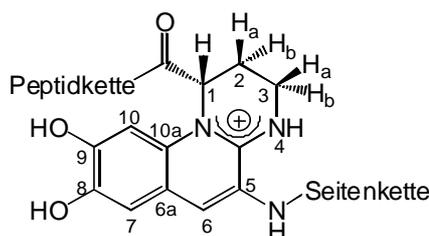


Abb. 5.2 Chromophor der Pyoverdine

SUCA	2'	3'								
	2,79	2,73								
Chr	1	2a	2b	3a	3b	4NH ⁺	5NH	6	7	10
	5,71	2,47	2,67	3,41	3,74	n.b.	8,69	7,94	7,16	7,10
	NH	á	â	ã	ä	ä-NH ₂	CH ₃			
Ser ¹	9,38	4,45	3,96							
Ala	8,71	4,37	1,37							
Aho ¹	8,05	4,03	1,55	1,22	3,43	2,01				
Orn	7,83	3,95	2,12	1,69	3,22	7,43				
Ser ²	8,42	4,32	3,89							
Aho ²	8,46	4,29	1,71	1,41	3,64	2,08				
Asp	8,03	4,52	2,68							

Tab. 5.1 ¹H-NMR-Daten (500 MHz) von PVD G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v), (pH 4,3, 298 K)

Die Resonanzen der Protonen der Bernsteinsäureamidseitenkette (SUCA) bilden ein AA'BB'-Spinsystem und liegen bei 2,79 ppm und 2,73 ppm. Die Verschiebungen stimmen mit Literaturdaten überein [25, 26, 27, 81, 83, 84]

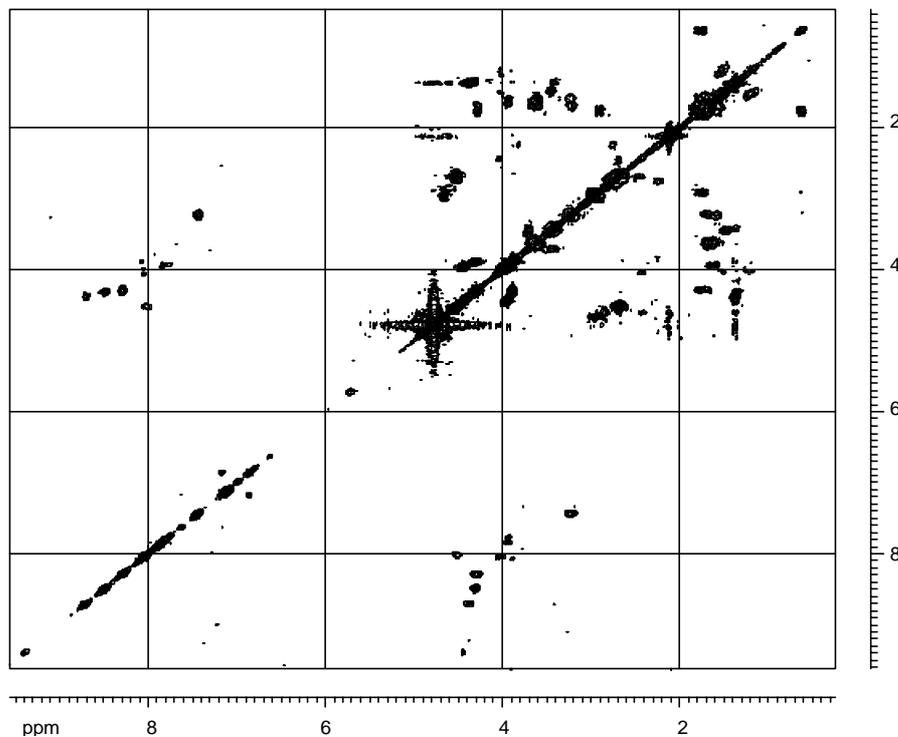


Abb. 5.3 H,H-COSY-Spektrum von PVD G173 in H₂O/D₂O (9:1,v:v) (pH 4,3, 298 K)

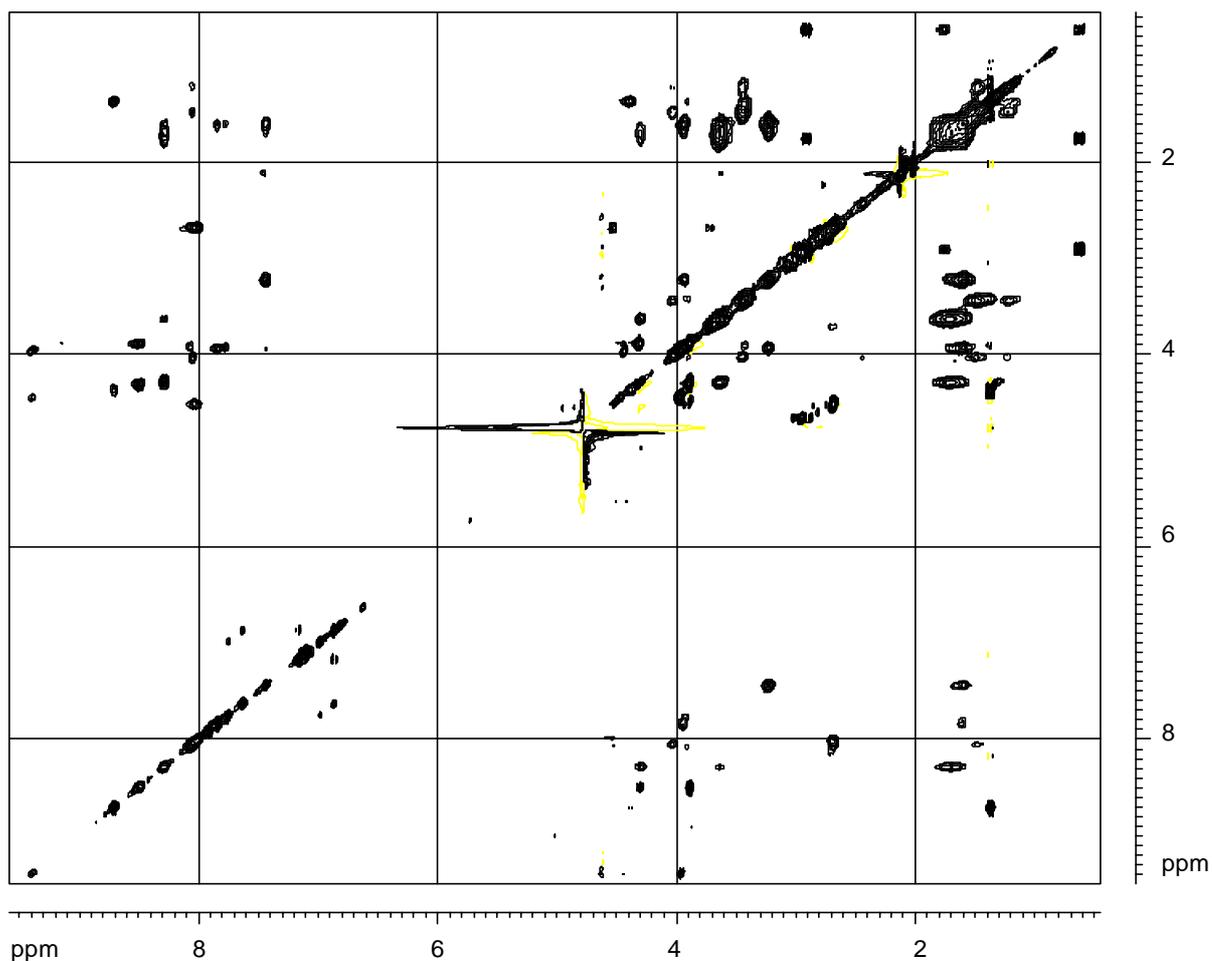


Abb. 5.4 TOCSY-Spektrum von PVD G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Das NH-Proton von **Serin¹** ist stark tieffeldverschoben (9,38 ppm). Diese Verschiebung ist typisch für die erste, an den Chromophor gebundene, Aminosäure [21, 45, 85], und ist auf den entschirmenden Effekt des aromatischen Ringstromes des Chromophors zurückzuführen [8]. Im TOCSY-Spektrum (**Abb. 5.5**) zeigt das Ser¹-NH-Proton sowohl einen Cross-peak zu Ser¹-H_α (4,45 ppm) als auch zu Ser¹-H_β (3,96 ppm).

Ausgehend von der chemischen Verschiebung des Amidprotons von **Serin²** bei 8,42 ppm kann die Zuordnung des Ser²-H_α bei 4,32 ppm und des Ser²-H_β bei 3,89 ppm erfolgen. Aufgrund der Lage der $\hat{\alpha}$ -Protonen der zwei Serinreste kann ausgeschlossen werden, daß die Hydroxylgruppen nicht verestert vorliegen, da in diesem Fall die H_α-Protonen bei tieferem Feld (ca. 4,5 ppm) auftreten müßten [86].

Das Signal des NH-Protons von **Alanin** liegt bei 8,71 ppm. Es läßt sich anhand der Cross-peaks im TOCSY-Spektrum leicht zuordnen. Es zeigt Korrelation zu Ala-H_α (4,37) und besonders intensiv zu Ala-H_β (1,37 ppm). Die Lage der α - und $\hat{\alpha}$ -Protonenresonanzen entsprechen Literaturwerten für Alanin [82].

Das Amidproton von **Ornithin** (α -NH, 7,8 ppm) zeigt Cross-peaks zu dem α -Proton bei 3,95 ppm und zu den β -Protonen bei 1,69 ppm. Das β -NH-Proton liegt bei 7,43 ppm und gibt Cross-peaks zu den β -Protonen (2,12 ppm), zu den α -Protonen bei 3,22 ppm und zu den bereits identifizierten α - und β -Protonen. Die Signallage von Orn-H α und Orn-H β wird durch die α -NH- bzw. β -NH-Gruppe beeinflusst. Im Falle einer freiliegenden Aminogruppe werden die Resonanzen dieser Protonen bei tieferem Feld gefunden (>8 ppm). Die $^1\text{H-NMR}$ -spektrometrische Untersuchung läßt darauf schließen, daß Ornithin sowohl α - als auch β -amidisch gebunden und somit an der Cyclusbildung beteiligt ist, was den Strukturvorschlag der massenspektrometrischen Untersuchung bestätigt.

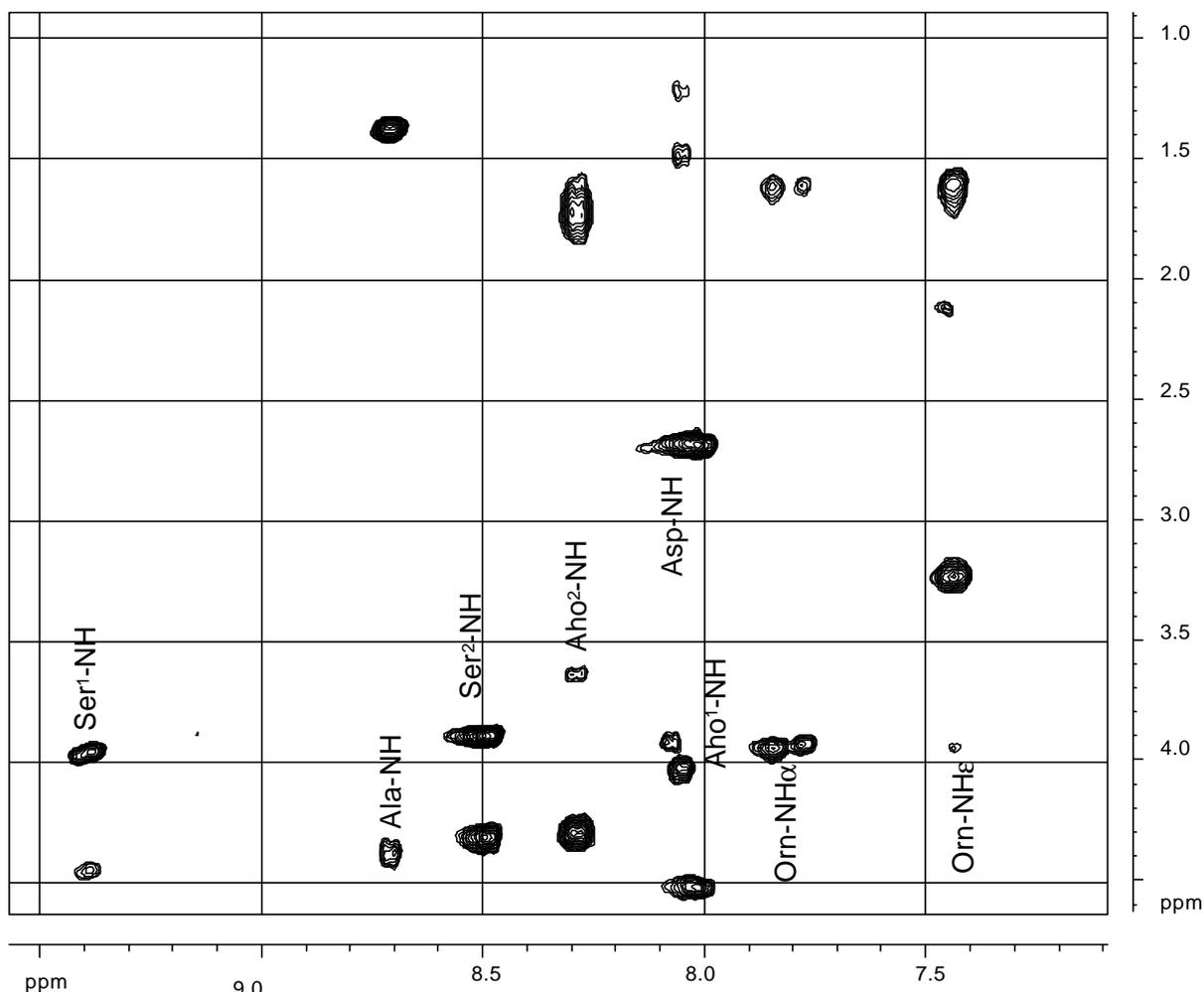


Abb. 5.5 Ausschnitt aus dem 2D-TOCSY von PVD G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Protonenresonanzen des **Acetylhydroxyornithins**¹ können anhand des NH-Protons (8,05 ppm) zugeordnet werden. Das amidische Proton zeigt einen intensiven Cross-peak zu dem Aho¹-H α bei 4,03 ppm und schwache Cross-peaks zu den Aho¹-H β (1,55 ppm) und zu den Aho¹-H γ (1,2 ppm). Das Aho-H α zeigt Cross-peaks zu diesen Protonen und auch zu den H β -Protonen bei 3,43 ppm.

Das amidische α -NH-Proton des zweitens **Acetylhydroxyornithins**² ist bei tieferem Feld zu finden (8,46 ppm) und zeigt einen Cross-peak zu dem H α (4,29 ppm), zu dem H β (1,71 ppm) und zu den H γ (3,64 ppm). Das H β zeigt auch einen Cross-peak zu den H δ bei 1,41 ppm, was die Zuordnung des H δ -Protons erlaubt.

Die Protonen von Asparaginsäure Asp-NH (8,03 ppm), Asp-H α (4,52 ppm) und Asp H β können anhand ihrer Korrelation im TOCSY-Spektrum identifiziert werden. Die Lagen der α - und β -Protonenresonanzen entsprechen Literaturwerten für die Asparaginsäure [87].

5.2.2 Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen von PVD G173

Die ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen an PVD G173 dienten der Bestätigung der vorliegenden Informationen. Die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen ist nötig für die spätere Sequenzierung der Peptidkette durch ein HMBC-Experiment [88, 89].

Die Zuordnung dieser Resonanzen erfolgte durch ein ^1H -breitbandenkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum unter Zuhilfenahme von HMQC- und HMBC-Spektren und Literaturvergleich. Die Multiplizitäten wurden durch ein DEPT-Experiment bestätigt. Alle Spektren wurden in einem $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) Gemisch bei pH 4,3 und 298 K mit DSS als innerem Standard bei 298 K aufgenommen.

Das ^1H -breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum von PVD SUCA-G173 ist in **Abb. 5.6** wiedergegeben. Es zeigt einen Carbonylbereich (~ 160 - 185 ppm), einen Aromatenbereich (~ 100 - 155 ppm) und einen Aliphatenbereich (~ 20 - 70 ppm). Die Signallagen sind in **Tab. 5.2** zusammengefaßt.

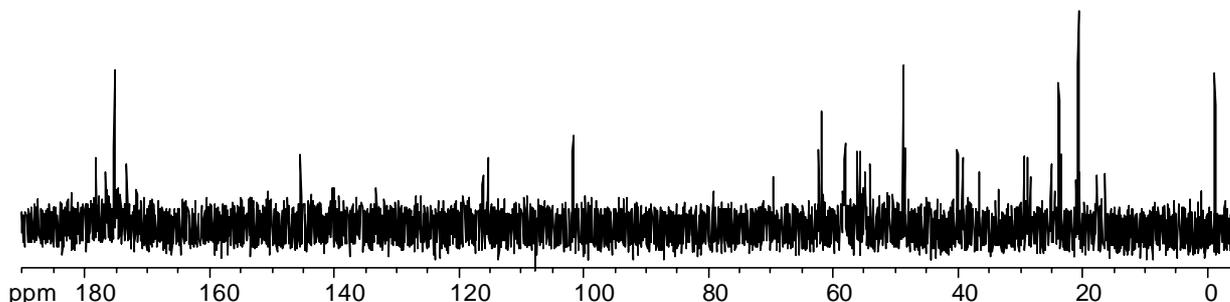


Abb. 5.6 ^{13}C -NMR-Spektrum (125,8 MHz) von PVD G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

SUCA	CO (1')	2'	3'	CO (4')				
	176,4	31,9	31,1	177,3				
Chr	CO	1	2	3	4a	5	6	6a
		57,9	23,1	36,2	150,6	118,4	140,2	116,1
	7	8	9	10	10a			
	115,3	145,1	153,0	101,4	113,0			
Ser ¹ Ala Aho ¹ Orn Ser ² Aho ² Asp	CO	á	â	ã	ä	OCH ₃	COOH	
	172,7	57,6	62,1					
	176,2	50,8	17,2					
	173,8	54,9	28,1	23,1	48,0	170,2		
	174,5	55,8	29,1	23,5	39,7			
	172,8	57,8	61,5					
	174,4	54,6	28,5	23,4	48,5	170,2		
	175,3	53,5	38,6					177,8

Tab. 5.2 ^{13}C -NMR-Daten von PVD SUCA-G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v), pH 4,3 bei 298 K (125,8 MHz)

Die Zuordnung der Signale der beiden Carbonylkohlenstoffatome der **Acylseitenkette** Bernsteinsäureamid bei 176,4 ppm (1') und 177,3 ppm (4') erfolgte durch 2J - und 3J -Kopplungen zu den 2'-und 3'-Methylenprotonen im HMBC-Spektrum (**Abb. 5.7**). Für die sekundären Kohlenstoffatome gelingt sie anhand der direkten C,H-Correlationen im HMQC-Spektrum (**Abb. 5.8**). Das Signal für C2' liegt bei 31,9 ppm und für C1' bei 31,1 ppm.

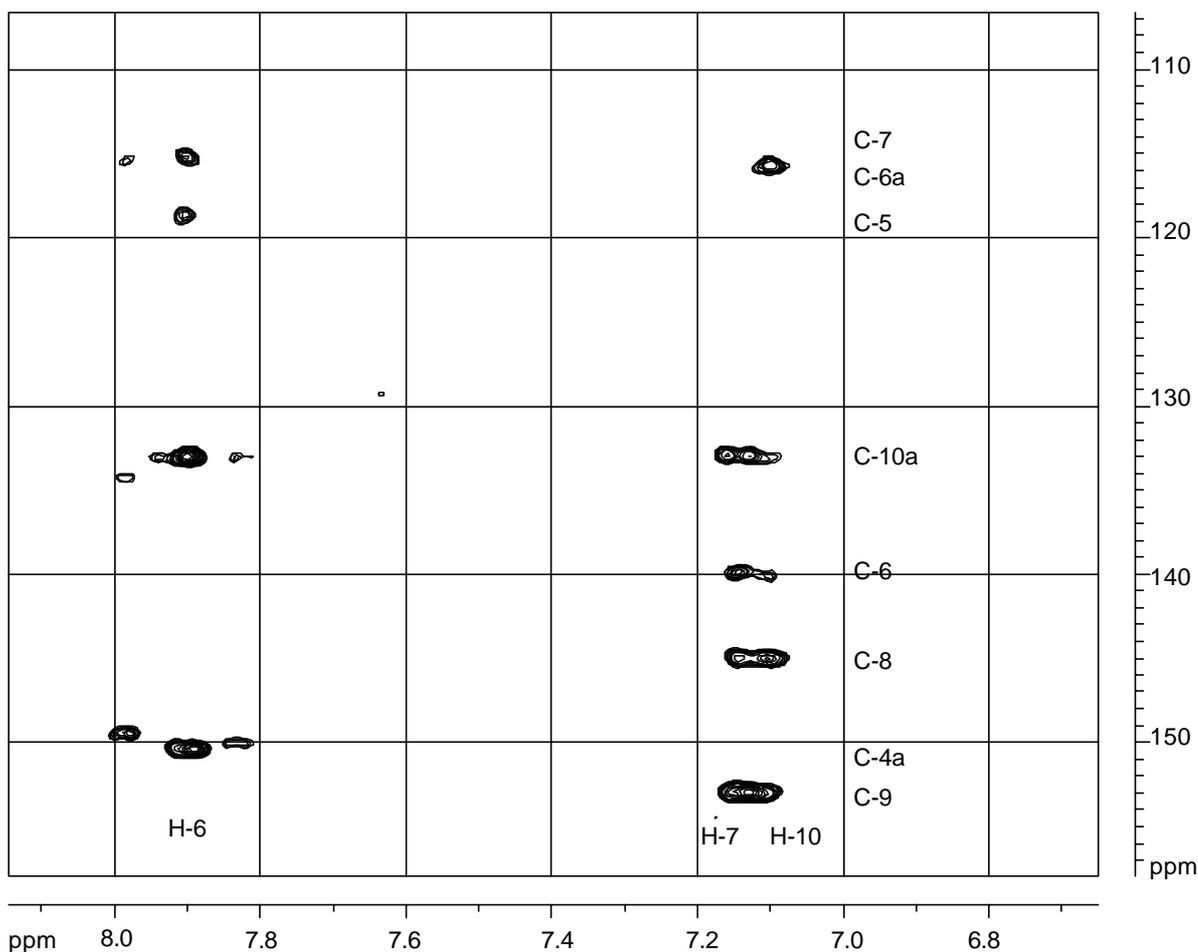


Abb. 5.7 Ausschnitt aus dem 2D-HMBC von PVD G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Signale der aliphatischen **Chromophorkohlenstoffatome** Chr-1 (57,9 ppm), Chr-2 (23,1 ppm), Chr-3 (36,2 ppm) und die drei protonentragenden aromatischen Kohlenstoffatome Chr-6 (140,2 ppm), Chr-7 (115,3 ppm) und Chr-10 (101,4 ppm) konnten über die 1J -Korrelation im HMQC-Spektrum zugeordnet werden (**Abb. 5.8** und **Abb. 5.9**). Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt im Bereich zwischen 100 und 160 ppm die Signale von sechs weiteren aromatischen Kohlenstoffatomen, deren chemische Verschiebungen gut mit den Literaturwerten für die sechs quarternären aromatischen Kohlenstoffatome übereinstimmen [25, 90]. Diese Zuordnung wurde durch 2J - und 3J -Kopplungen im HMBC-Spektrum zwischen den aromatischen Chromophorprotonen und den Kohlenstoffen Chr-9 (153,0 ppm), Chr-4a (150,6 ppm), Chr-5 (118,4 ppm),

Chr-6a (116,1 ppm), Chr-8 (145,1 ppm) und Chr-10a (133,0 ppm) bestätigt. Der Chr-CO Kohlenstoff konnte durch einen Cross-peak zu dem NH-Ser¹ bei 172,8 ppm zugeordnet werden.

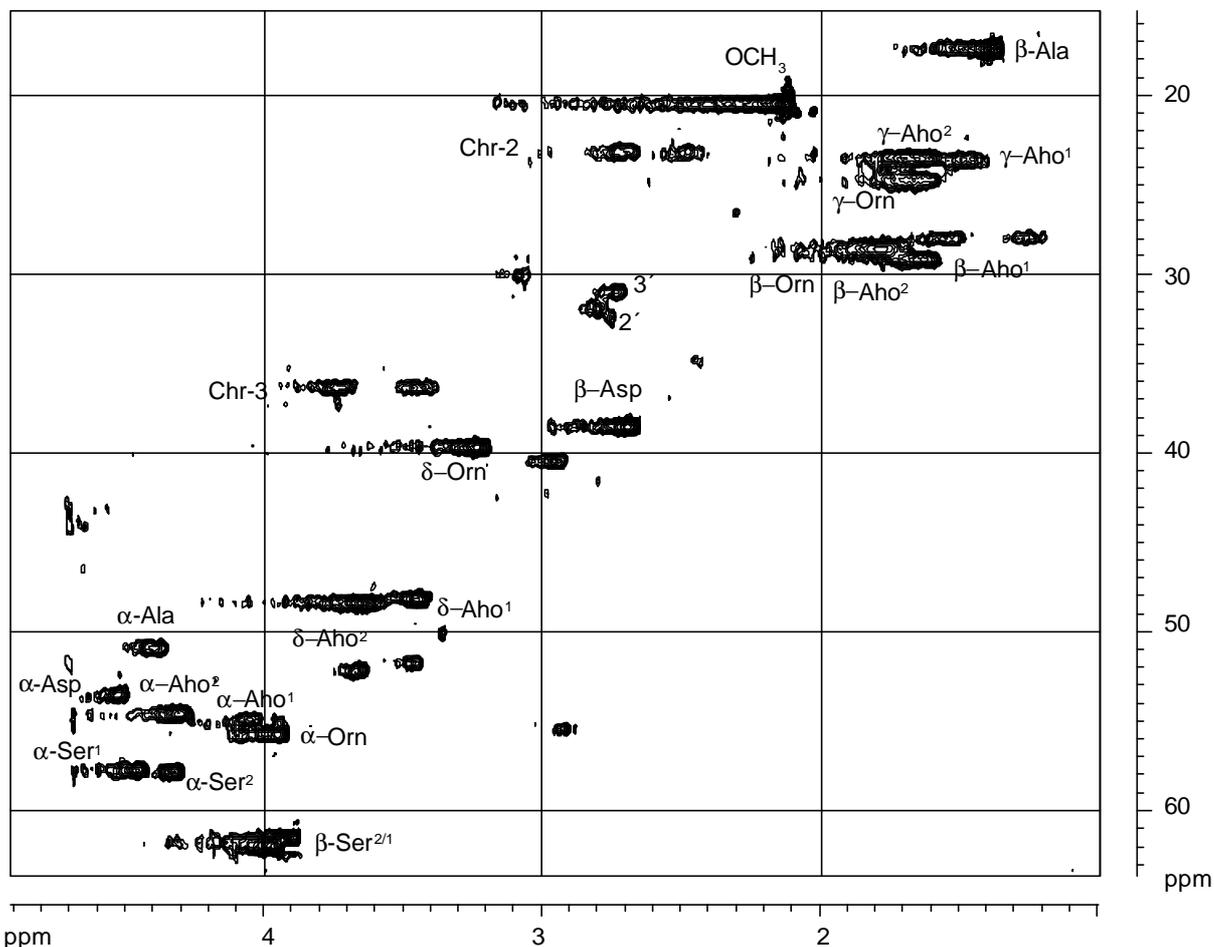


Abb. 5.8 Ausschnitt aus dem 2D-HMBC von PVD G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Signale der zwei Serinreste wurden anhand ihrer direkter ¹H,¹³C-Korrelation aus dem HMQC-Spektrum zugeordnet. Die chemischen Verschiebungen des C α von **Serin¹** (62,1 ppm) und **Serin²** (61,5 ppm) entsprechen den Literaturwerten von Serin mit einer freien Hydroxylfunktion. Die α -Kohlenstoffatome findet sich bei 57,6 ppm (Serin¹) und 57,8 ppm (Serin²). Als Carbonylkohlenstoffe konnten Ser¹-CO (172,7 ppm) und Ser²-CO (172,8 ppm) über die ²J-, ³J-Kopplungen mit den entsprechenden Ser-H α bzw. Ser-H β identifiziert werden (Abb. 5.9).

Die Zuordnung der α -, $\hat{\alpha}$ -, $\tilde{\alpha}$ -, und $\ddot{\alpha}$ -Kohlenstoffsignale beider Acetylhydroxyornithinreste erfolgte über ihre ¹J-Cross-peaks im HMQC-Spektrum. Diese Zuordnung wurde durch das DEPT-Spektrum bestätigt. Die α -Carbonylkohlenstoffe konnten mittels des HMBC-Spektrums bei 173,8 ppm für das **Acetylhydroxyornithin¹** und bei 174,4 ppm für das **Acetylhydroxyornithin²** gefunden werden. Die Signale für die Acetylgruppen liegen über einander und

konnten nur durch das ROESY-Spektrum bei 173,8 ppm (CO) und 20,7 ppm identifiziert werden.

Die Resonanz des α -Kohlenstoffatoms von **Alanin** kann bei 17,2 ppm über das HMQC-Spektrum identifiziert werden. In diesem Spektrum läßt sich auch die Resonanz des α -Kohlenstoffatoms bei 50,8 ppm zuordnen. Für die Identifizierung des Carbonylkohlenstoffs bei 176,2 ppm wurde das HMBC-Spektrum benötigt.

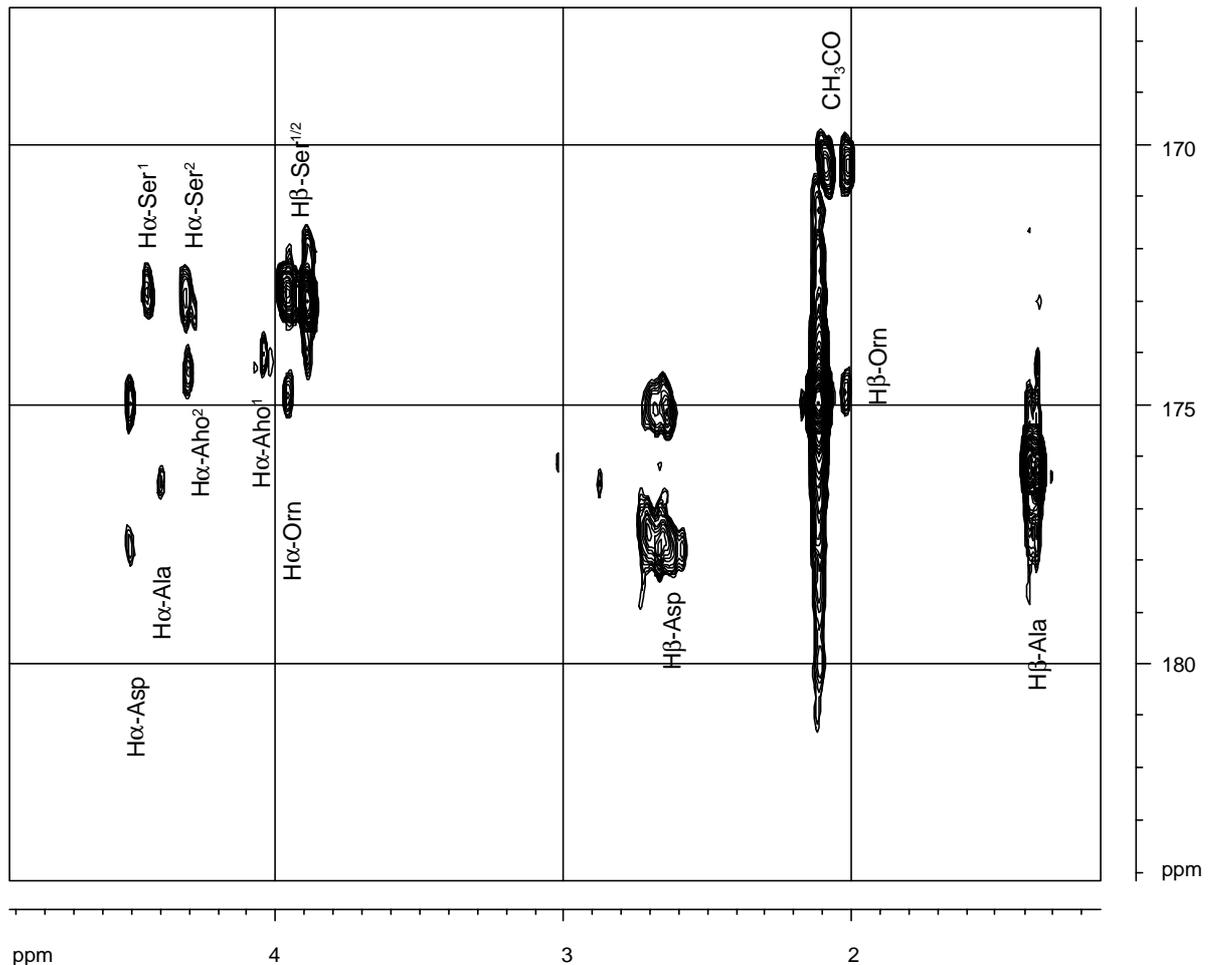


Abb. 5.9 Ausschnitt aus dem 2D-HMBC von PVD G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1,v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen von **Ornithin** gelang ebenfalls über das HBCQ-Experiment. Über dieses Spektrum sowie über das HMBC-Konturdiagramm können die chemischen Verschiebungen der Ornithinkohlenstoffe bei 55,8 ppm ($\text{C}\alpha$), 29,1 ppm ($\text{C}\hat{\alpha}$), 23,5 ppm ($\text{C}\bar{\alpha}$), 39,7 ppm ($\text{C}\ddot{\alpha}$) und 174,5 ppm (Carbonylkohlenstoff) zugeordnet werden.

Die Signale der Kohlenstoffe der **Asparaginsäure** wurden durch das HMCQ-Spektrum zugeordnet und liegen bei 53,5 ppm ($\text{C}\alpha$) und 38,6 ppm ($\text{C}\hat{\alpha}$). Da in dem HBCQ-Experiment sich alle möglichen Cross-peaks beobachten lassen, gelang die eindeutige Zuordnung beider Carbonylgruppen nicht.

5.2.3 Sequenzierung der Peptidkette

Durch Zuordnung aller ^1H - und ^{13}C -Resonanzen konnte die Zusammensetzung von PVD G173 bestätigt werden. Die NMR-spektroskopischen Ergebnisse zeigten, daß alle α -Aminogruppen an einer Peptidbindung beteiligt sind, daß keine Esterbindung existiert, und daß beide Aminogruppen des Ornithins gebunden vorliegen. Dies bestätigt eine cyclische Unterstruktur. Zur Bestimmung der Peptidsequenz wurden zwei NMR-Experimente durchgeführt, ein ROESY- und ein HMBC-Experiment.

Im ROESY-Experiment lassen sich Protonen aufgrund räumlicher Wechselwirkungen miteinander korrelieren, sofern der Kernabstand 0,5 nm nicht übersteigt. Bei Peptiden können damit, in Abhängigkeit von der Konformation der Peptidkette, NOE-Cross-peaks zwischen dem Amidproton einer Aminosäure und den α - oder β -Protonen der vorherigen Aminosäure beobachtet werden [91].

Die Sequenz der Peptidkette von PVD G173 konnte aus dem ROESY-Spektrum ermittelt werden. Der für die Sequenzierung relevante Bereich des ROESY-Spektrums bei 298 K ist in **Abb. 5.10** dargestellt. Die sequenzspezifischen Cross-peaks sind in **Tab. 5.3** zusammengefaßt und alle sequenzspezifischen ROESY-Cross-peaks sind in **Abb. 5.11** schematisch dargestellt.

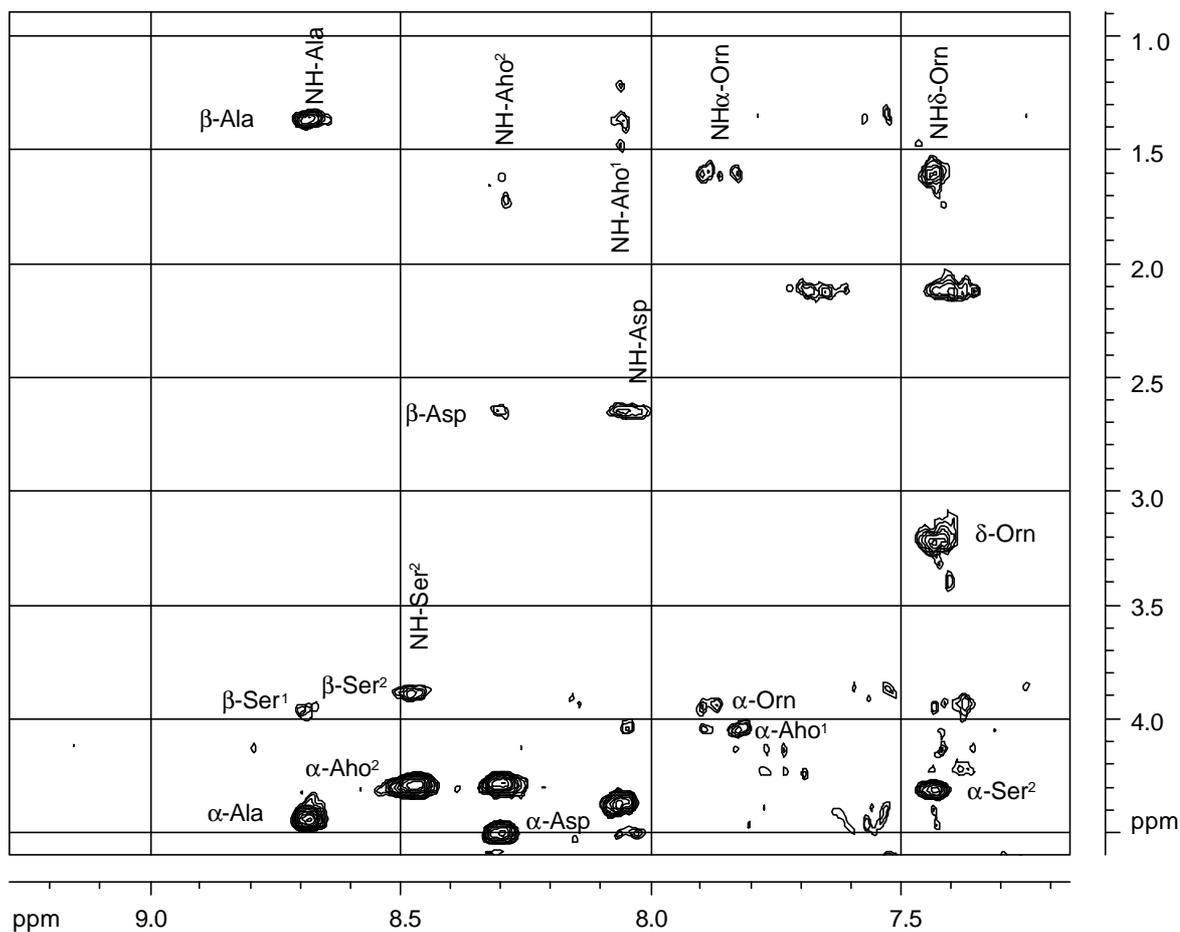


Abb. 5.10 Ausschnitt aus dem 2D-ROESY von PVD G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

NH-Ser ¹	Chr-1, Chr2a/b
NH-Ala	Hâ-Ser ¹
NH-Aho ¹	Há-Orn
NHá-Orn	Há-Aho ¹
NH-â-Orn	Há-Ser ² , Hâ-Ser ²
NH-Ser ²	Há-Aho ²
NH-Aho ²	â-Asp, â-Asp
NH-Asp	â-Orn, â-Orn

Tab. 4.3 ROESY-Cross-peaks zur Sequenzierung von PVD G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v), (pH 4,3, 298K)

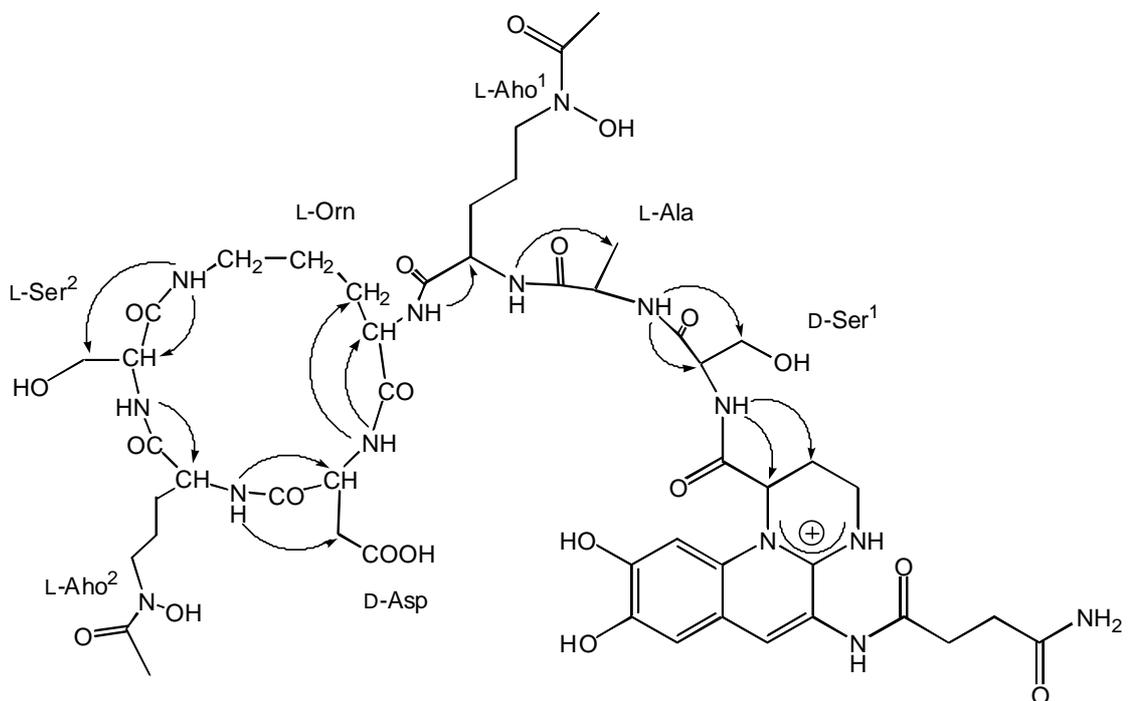


Abb. 5.11 ROESY-Cross-peaks (pH 4,3, 298 K) zur Sequenzierung der Peptidkette

Durch das ROESY-Experiment kann bestätigt werden, dass die Aminosäure Ornithin einen Cyclus bildet, wobei es α -peptidisch mit der Asparaginsäure und β -peptidisch mit dem Serin² verknüpft ist. Diese NMR-Untersuchungen bestätigen den mittels der massenspektrometrischen Untersuchungen gewonnenen Strukturvorschlag.

5.3 Ferribactin G173

5.3.1 Zuordnung der $^1\text{H-NMR}$ -Resonanzen von Ferribactin G173

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Ferribactins G173 bei 298 K in D_2O ist in **Abb. 5.12** wiedergegeben. Wie erwartet, treten im Tieffeldbereich des Spektrums anstelle der Signale des Pyoverdinchromophors die Signale des AA'BB'-Systems der aromatischen Protonen des Tyrosins auf.

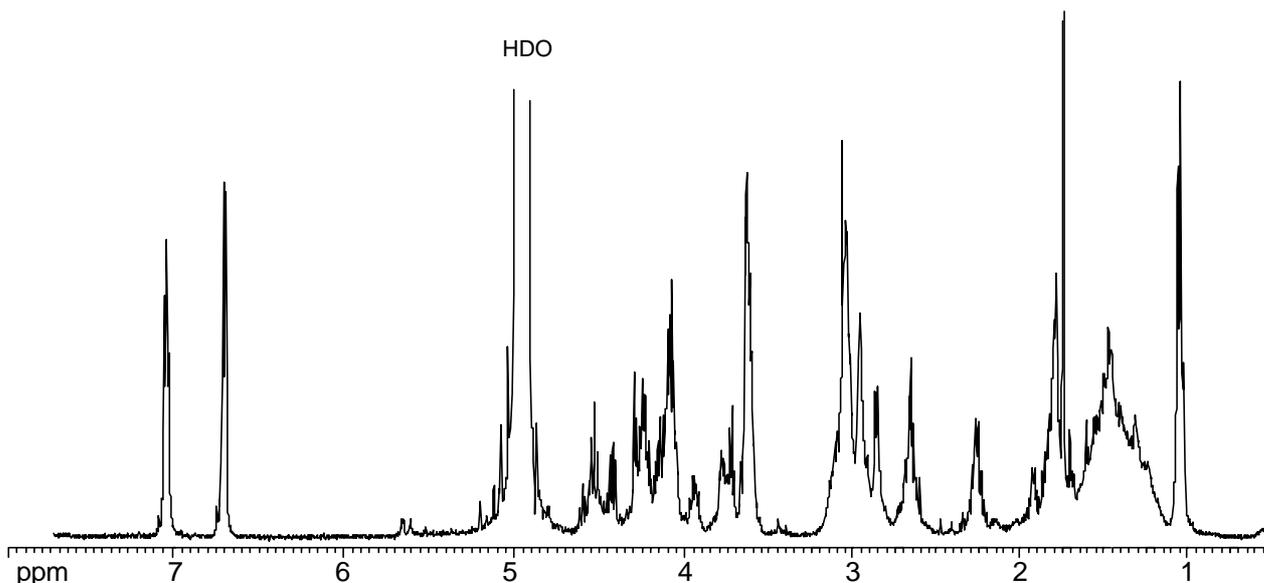


Abb. 5.12 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz) von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Identifizierung charakteristischer Spinsysteme in H,H-COSY- und TOCSY-Experimenten. In **Tab. 5.4** sind die $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Ferribactin G173 zusammengestellt. Die Struktur des Ferribactinchromophors ist in **Abb. 5.13** wiedergegeben.

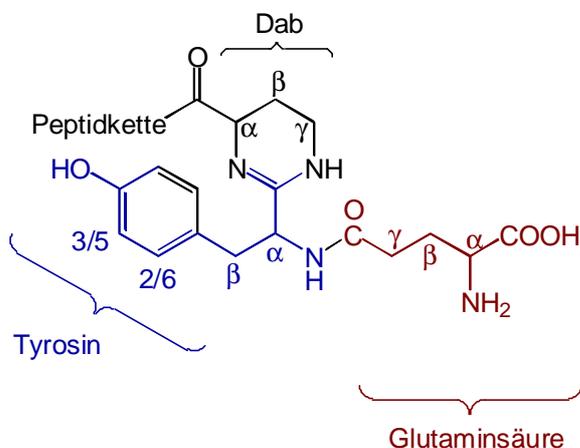


Abb. 5.13 Chromophor der Ferribactine

Bei 4,71 ppm liegt das Signal des α -Protons von **Tyrosin**. Es zeigt ein Kreuzsignal im H,H-COSY-Spektrum zu den Tyr-H β -Atomen bei 3,11 ppm (**Abb. 5.15**). Die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen konnten bereits aus dem eindimensionalen Spektrum entnommen werden, wobei die Protonen H2/6 bei 7,19 ppm und die H3/5 bei 6,88 ppm liegen. Das NH-Proton lässt sich im TOCSY-Spektrum bei 8,66 ppm finden (**Abb. 5.14**).

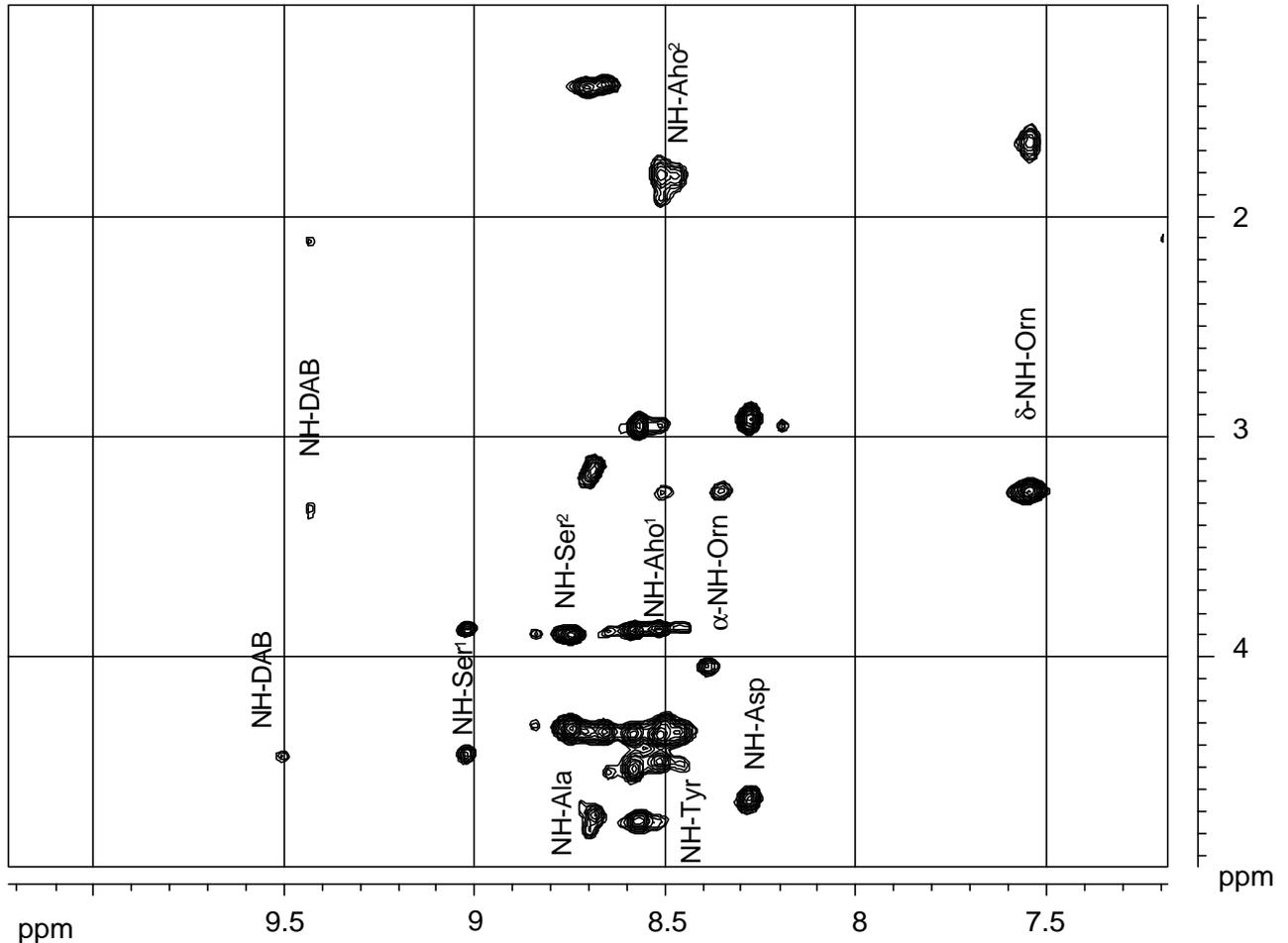


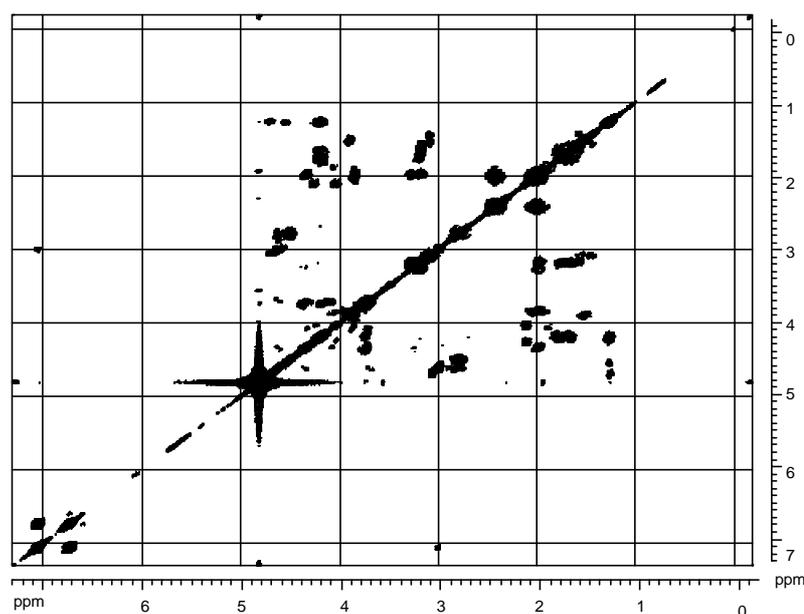
Abb. 5.14 Ausschnitt aus dem 2D-TOCSY von Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Protonen der **Glutaminsäure** wurden ausgehend von der charakteristischen chemischen Verschiebung des α -Wasserstoffatoms bei 3,85 ppm identifiziert. Das α -Proton zeigt einen Cross-peak zu den β -Protonen bei 2,10 ppm, diese koppeln zu den γ -Protonen bei 2,34 ppm. Analog wurde das Spinsystem der **Diaminobuttersäure** identifiziert. Die Resonanz des NH-Protons tritt bei 9,44 ppm und 9,51 ppm auf, wobei das Signal bei 9,44 ppm mit den H β -Protonen bei 3,38 ppm, und das Signal bei 9,51 ppm mit den H α -Protonen bei 4,48 ppm koppelt. Die direkten Kopplungen zwischen den α - und den β -Protonen, sowohl zwischen den β - und γ -Protonen lassen sich in H,H-COSY beobachten.

	NH	á	â	ã	ä	ä-NH ₂	CH ₃	H2/6	H3/5	ã-NH2
Dab	9,44/9,51	4,48	2,12	3,38						
Glu		3,85	2,10	2,34						8,66
Tyr	8,66	4,71	3,11					7,19	6,88	
Ser ¹	9,03	4,44	3,87							
Ala	8,67	4,34	1,41							
Aho ¹	8,47	4,52	2,04	1,68	3,12		2,08			
Orn	8,39	3,89	2,19	1,66	3,25	7,53				
Ser ²	8,75	4,32	3,90							
Aho ²	8,51	4,34	1,81	1,67	3,31		2,08			
Asp	8,23	4,63	2,91							

 Tab. 5.4 ¹H-NMR-Daten (500 MHz) von Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v), (pH 4,3, 298 K)

Die ¹H-Signale für die Peptidkette des Ferribactins liegen bei sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen wie die des Pyoverdins. Ein Unterschied zu den entsprechenden Spektren des Pyoverdins G173 zeigt sich bei dem NH-Proton von **Serin¹** (9,03 ppm). Es ist um 0,4 ppm hochfeld-verschoben, da der entschirmende Einfluß des Ferribactinchromophors kleiner als der des Pyoverdinchromophors ist. Im TOCSY-Spektrum zeigt das Ser¹-NH-Proton sowohl einen Cross-peak zu Há-Ser¹ (4,45 ppm) als auch zu Hâ-Ser¹ (3,96 ppm). Das Signal des NH-Protons von **Alanin** ist auch leicht hochfeld-verschoben und liegt bei 8,67 ppm. Es läßt sich anhand der Cross-peaks im TOCSY-Spektrum leicht zuordnen. Es zeigt Cross-peaks zu Há-Ala (4,34 ppm) und besonders intensiv zu Hâ-Ala (1,41 ppm).


 Abb. 5.15 H,H-COSY von Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

5.3.2 Zuordnung der ^{13}C -NMR-Resonanzen von DFB G173

In Abbildung 5.16 ist das ^1H -breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum von Ferribactin G173 in D_2O bei 298 K dargestellt. Bereits aus dem eindimensionalen Spektrum lassen sich die Signale der Kohlenstoffatome des Tyrosins durch Literaturvergleich zuordnen [39, 63, 92].

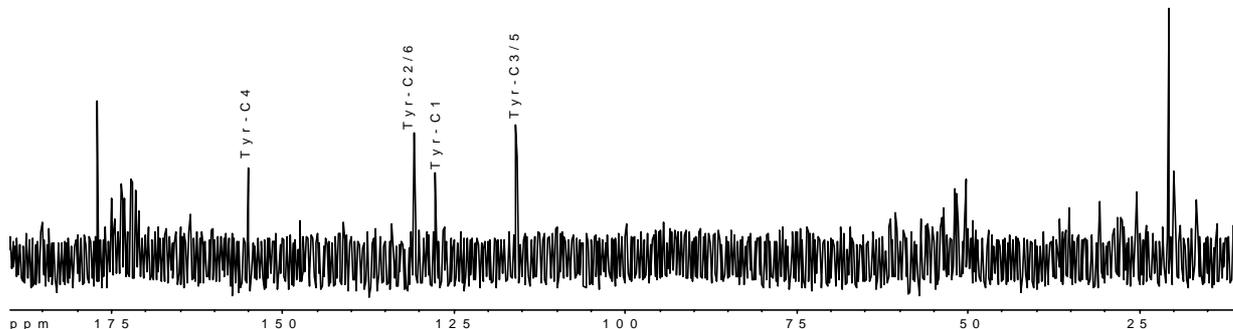


Abb. 5.16 ^{13}C -NMR-Spektrum (125,8 MHz) von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Die Zuordnung der Signale erfolgte durch heteronukleare zweidimensionale Experimente. Die ^{13}C -NMR-Daten sind in Tab. 5.5 zusammengefasst.

	CO	á	â	ã	ã-CO	C2/6	C3/5	C1	C4	C=N
Dab	172,2	51,1	24,7	36,2						
Glu	177,0	51,5	25,0	32,2	174,8					
Tyr		55,0	37,5			131,8	116,9	127,3	156,3	164,0
	CO	á	â	ã	ã	CO´	CH3			
Ser ¹	172,9	53,4	60,4							
Ala	176,0	51,2	16,3							
Aho ¹	175,0	55,4	28,2		23,1	51,1	170,4			
Orn	171,2	51,4	29,2		23,5	38,3	171,2			
Ser ²	173,1	53,2	60,8							
Aho ²	174,3	54,8	29,1		23,4	50,1	170,4			
Asp	177,5	51,4	39,6				179,2			

Tab. 5.5 ^{13}C -NMR-Daten (125,8 MHz) von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v), (pH 4,3, 298 K)

Die Abb. 5.17 zeigt die für die Charakterisierung der Kohlenstoffatome des Ferribactin-chromophors relevanten Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum. Die Lage der Kohlenstoffatome der Peptidkette entspricht denen des Pyoverdins G173; sie werden nicht mehr diskutiert.

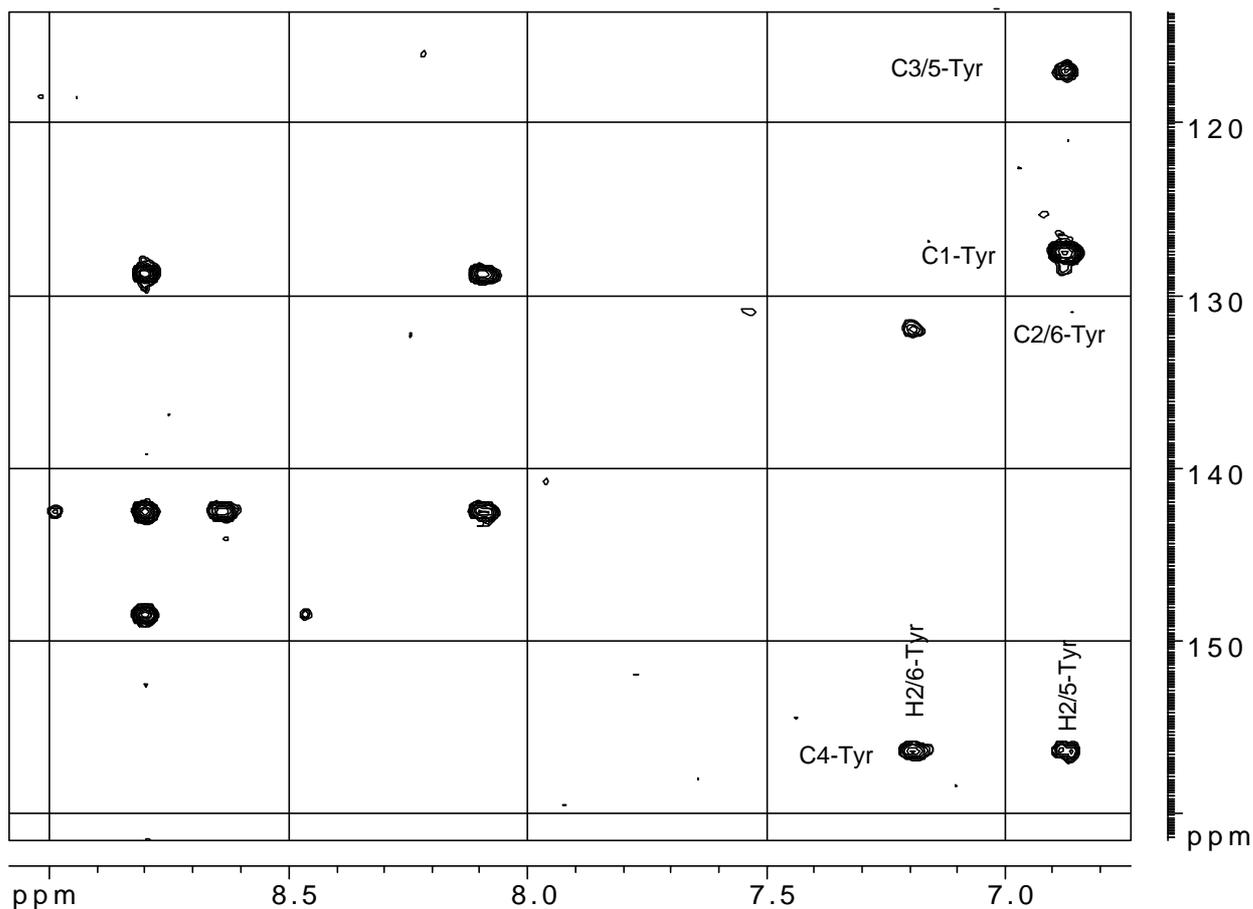


Abb. 5.17 Ausschnitt aus dem 2D-HMBC von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

Ausgehend von den bereits zugeordneten Protonensignalen wurden die chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatome durch Direktkopplungen bestimmt und die Zuordnung durch Vergleich mit Literaturdaten betätigt [44, 92, 93]. Die Sequenzierung der Peptidkette erfolgte über die ROESY-, NOESY-, und HMBC-Experimente. Diese Spektren befinden sich im Anhang. Diese Sequenzierung erwies eine Peptidkette, die identisch mit der des Pyoverdins G173 ist; sie wird hier nicht weiter diskutiert (s. 5.2.3).

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 *Pseudomonas fluorescens* G173

Aus Eisenmangelkulturen von *Pseudomonas fluorescens* G173 wurden mehrere Siderophore isoliert, und es wurden Untersuchungen zur Aufklärung deren Struktur durchgeführt. Der massenspektrometrische Strukturvorschlag des Pyoverdins SUCA-G173 konnte bestätigt werden. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, das Ornithin, α -amidisch mit Aho und β -amidisch mit Serin verknüpft ist [58].

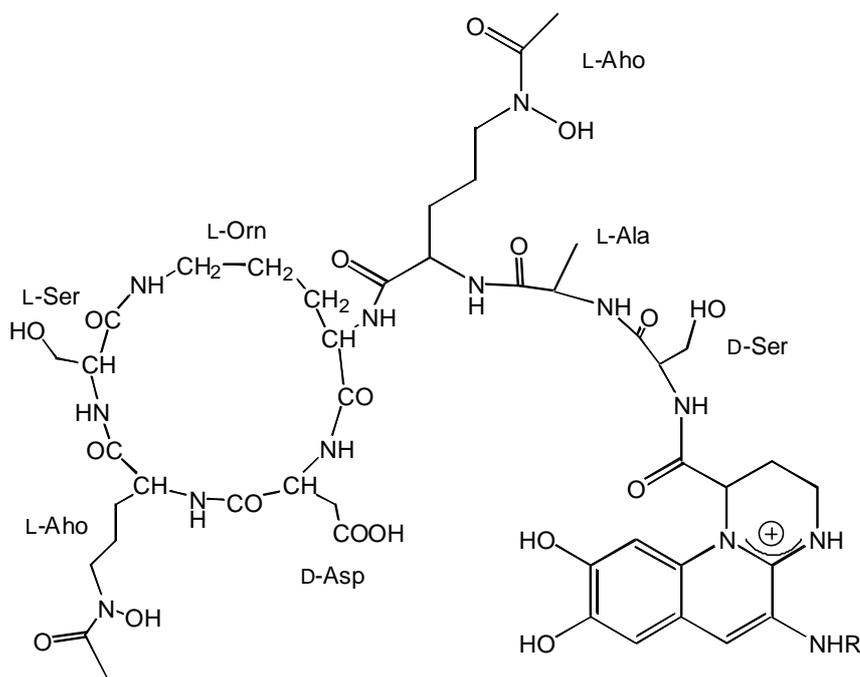


Abb. 6.1 Strukturvorschlag für das Pyoverdin G173 aus *Pseudomonas fluorescens* G173

Zusammen mit dem SUCA-Pyoverdin konnte auch MALA-Pyoverdin, Azotobactin, Succinopyoverdin und Ferribactin nachgewiesen werden. Das Ferribactin wurde sowohl massenspektrometrisch wie NMR-spektroskopisch untersucht.

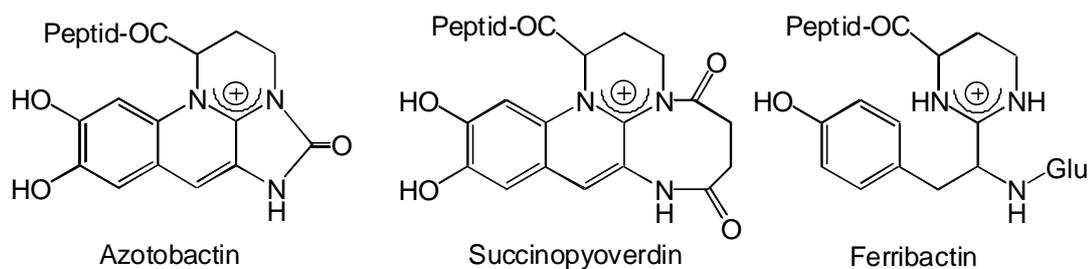


Abb. 6.2 Chromophore anderer zusammen mit den Pyoverdinen isolierter Siderophore aus *P. fl.* G173

6.2 *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173

Bei einer Kontrolluntersuchung der Siderophore aus dem in Köln gezüchteten *Pseudomonas fluorescens* G173 wurde festgestellt, daß dieser Stamm vermutlich wegen einer Mutation nicht mehr in der Lage war, große Pyoverdinmengen zu produzieren, und statt Pyoverdinen neue, bisher nicht bekannte Ferribactin-Varianten produzierte. Dieser neue Stamm wurde *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 genannt.

Die neuen Ferribactine konnten auf Grund ihrer Ähnlichkeit nicht getrennt werden und wurden lediglich massenspektrometrisch untersucht. Sie können in zwei Gruppen eingeordnet werden.

- Ferribactine mit Veränderungen lediglich in der Seitenkette, bei welchen die Glutaminsäure durch N-Hydroxy-glutaminsäure (1), N-Acetyl-glutaminsäure (2) oder N-Acetyl-N-hydroxy-glutaminsäure (3) ersetzt ist.

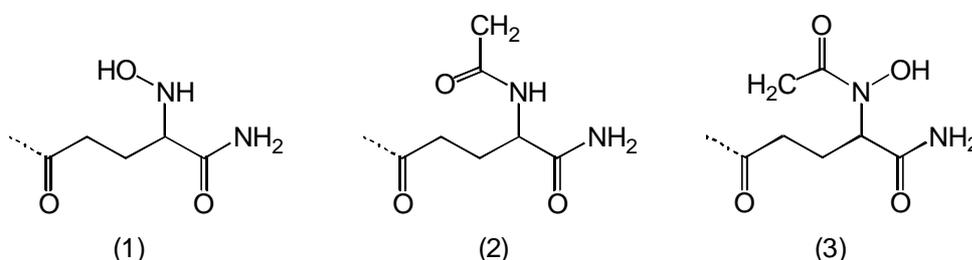


Abb. 6.3 Vorgeschlagene Seitenketten für die Ferribactine aus *P. fluorescens* Koeln-G173

- Ferribactine, die außer in den bereits besprochenen Seitenketten, Änderungen in der Peptidkette zeigen. Bei ihnen ist die Asparaginsäure (4) entweder als Methylester (5) vorhanden oder durch Glutaminsäure (6) ersetzt worden.

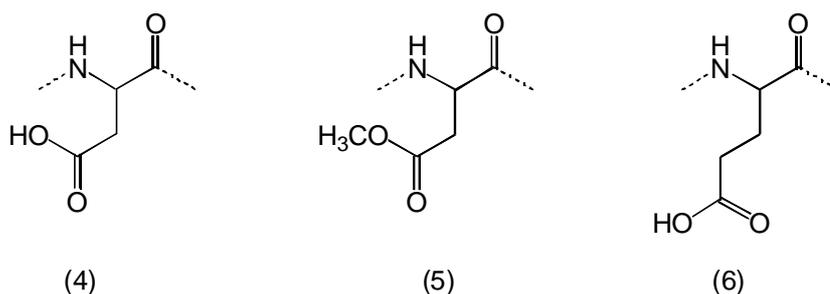


Abb. 6.4 Vorgeschlagene Peptidkettenänderungen für die Ferribactine aus *P. fluorescens* Koeln-G173

TEIL II

ISOLIERUNG UND MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER IROMP´s VON *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173

7 ISOLIERUNG DES IROMPs

7.1 Zucht der Bakterien

Der Bakterienstamm *Pseudomonas fluorescens* G173 wurde von Dr. Meyer (Universität Straßburg) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm mutierte vermutlich spontan. Die Mutante wird als *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 bezeichnet. Beide Stämme unterscheiden sich in den von ihnen produzierten Siderophoren. Da die Peptidkette fast aller Siderophore die gleiche ist, wurden lediglich die IROMPs von *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 isoliert und massenspektrometrisch untersucht.

Damit die Gefahr einer Fremdinfection mit anderen Bakterien oder Pilzen vermieden wird, erfolgte die Zucht der Stämme auf Minimalmedium. Als Kohlenstoffquelle und Nährsalze wurden Bernsteinsäure, Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat und Kaliumsulfat verwendet.

Die IROMPs sind äußere Membranproteine, die unter Eisenmangelbedingungen überexprimiert sind. Eine Möglichkeit, diese Proteine zu erkennen, ist die simultane Zucht der Bakterien unter normalen Bedingungen und unter Eisenmangelbedingungen. Bei den Proteinen, die deutlich überproduziert werden, handelt es sich um die gesuchten IROMPs. Im folgenden werden die unter Eisenmangelbedingungen gezüchteten Bakterien als "-KG173" und die in einem eisenhaltigen Medium gezüchteten Bakterien als "+KG173" bezeichnet.

<i>Pseudomonas fluorescens</i> Koeln-G173 (gezüchtet unter Eisenmangelbedingungen)	= -KG173
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Koeln-G173 (gezüchtet in einem eisenhaltigen Medium)	= +KG173

7.2 Isolierung der äußeren Membranen

Die Präparation der äußeren Membranen erfolgte durch Behandlung mit Lysozym bei 37°C. Die Zellen wurden vom Kulturmedium durch Zentrifugation abgetrennt und in einer 20%igen Sucroselösung (w:v) resuspendiert. Anschließend wurden sie 60 Minuten bei 30°C mit Lysozym behandelt [94].

Nach der Behandlung wurden die Bakterien rezentrifugiert und die ausgefallenen Spheroplasten abgetrennt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert, die ausgefallenen äußeren Membranen in 1 mM NaEDTA gelöst und gegen 27 mM NaEDTA mindestens 48 Stunden dialysiert. Die so erhaltene äußeren Membranen wurden durch Lyophilisierung von Wasser befreit. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Mikro-Lowry UV/Vis-spektrometrisch bestimmt [95].

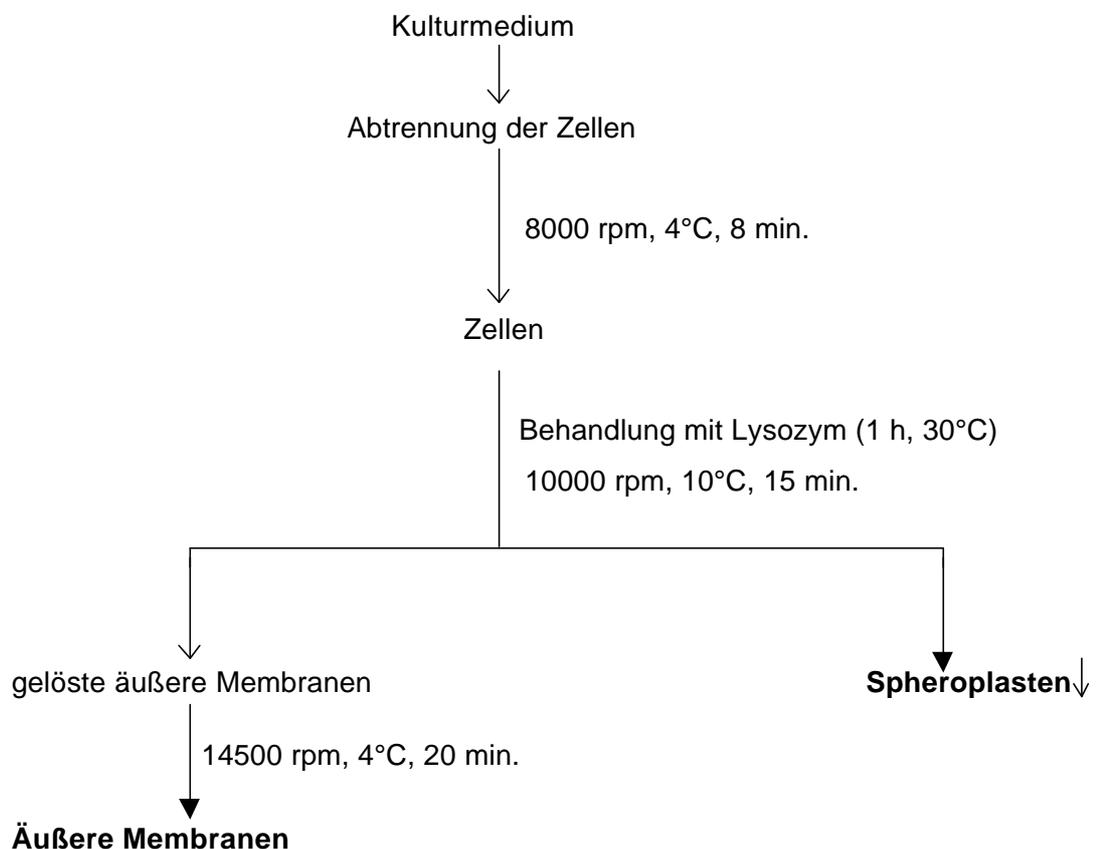


Abb. 7.1 Schematische Darstellung der Isolierung der äußeren Membranen.

7.4 Elektrophoretische Verfahren

7.4.1 Einleitung

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Geladene Teilchen unterschiedlicher Ladung und Größe wandern in elektrischen Feld mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Ein Substanzgemisch wird dabei in einzelne Zonen aufgetrennt [96]. Elektrophoretische Trennungen können in unterschiedlichen Medien durchgeführt werden, wobei eine Möglichkeit die Polyacrylamidgele sind. Diese Gele sind chemisch inert und besonders stabil. Durch chemische Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer, (z.B. N,N'-Methylenbisacrylamid) erhält man ein klares, durchsichtiges Gel, das für Proteinentrennung gut geeignet ist (**Abb. 7.3**). Die Porengröße wird durch die Totalacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad definiert.

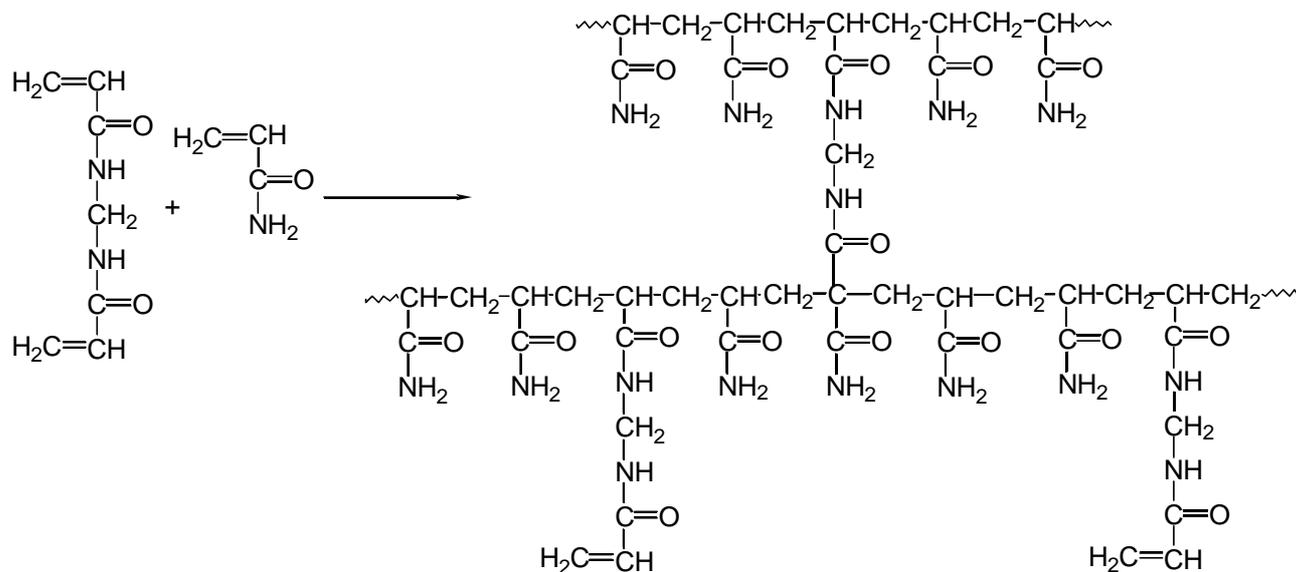


Abb. 7.3 Struktur eines Polyacrylamidgeles

Die Proteinlösung für die Elektrophorese darf keine festen Partikeln enthalten, weil sie die Poren der Matrix verstopfen und die Trennung stören. Aus diesem Grund wird die Löslichkeit hydrophober Proteine (z.B. Membranproteine) durch die Zugabe nicht-ionischer Detergenzien gesteigert.

Nach der Trennung können die Proteine direkt im Gel angefärbt werden. Ein viel verwendeter Farbstoff ist Coomassie-Brilliant-Blau, ein Triphenylmethanfarbstoff [97]. Diese Färbung hat den Vorteil, reversibel zu sein. Man erreicht bei dieser Methode Nachweisempfindlichkeiten von 0,1 bis 1 µg.

7.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen effektiv überdeckt. Mit SDS gehen auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine in Lösung. Proteinaggregationen werden verhindert, weil die Oberflächen negativ geladen sind. Die Trennung erfolgt sehr schnell, weil die SDS-Proteine-Micellen hohe Ladungen tragen und erfolgt nach lediglich einem Parameter, der Masse.

Die Proteine der äußeren Membranen aus *P. fluorescens* +KG173 und -KG173 wurden mittels SDS-PAGE getrennt (**Abb. 7.4**). Nach der Coomassie-Färbung des Gels wurde eine Bande in dem Bereich um 80 kDa beobachtet, die nur in den äußeren Membranen aus *P. fl.* -KG173 anwesend ist. Bei diesem Protein handelt es sich vermutlich um das gesuchte IROMP.

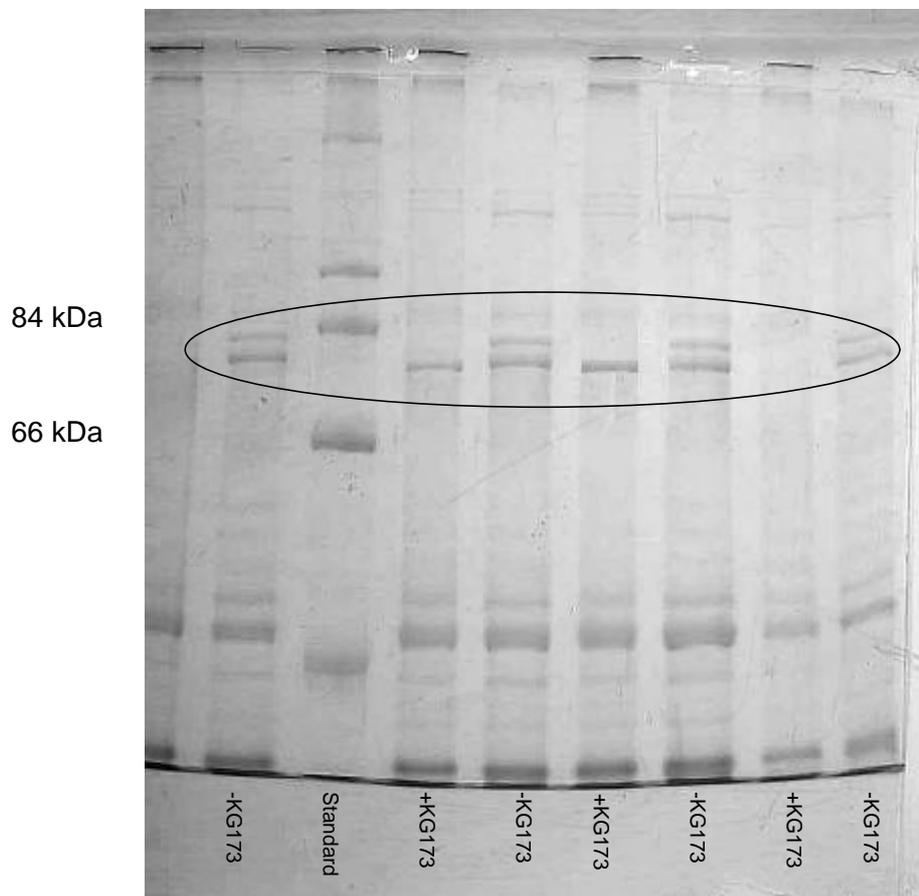


Abb. 7.4 SDS-Gel der Proteine aus *P. fluorescens* +KG173 und -KG173

Die Bande bei ca. 80 kDa, die nur in den äußeren Membranen aus *P. fl.* -KG173 anwesend ist, wurde ausgestanzt, von der Coomassie-Färbung befreit und mit Trypsin behandelt. Die extrahierten Verdauprodukte wurden massenspektrometrisch analysiert.

8 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

8.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

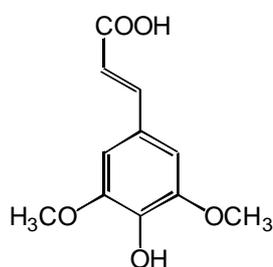
8.1.1 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

Bei der MALDI-Massenspektrometrie handelt es sich um eine relative neue massenspektrometrische Methode [98], bei der eine "schonende" Desorption/Ionisation der Analytmoleküle durch den sogenannten MALDI-Prozeß herbeigeführt wird. Die gebildeten Ionen können durch Kopplung zu verschiedenen Analysatoren detektiert werden, wobei sich die Flugzeitmassenspektrometrie (TOF Time-of-Flight) besonders anbietet.

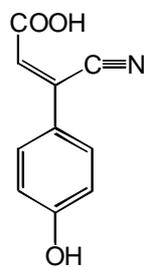
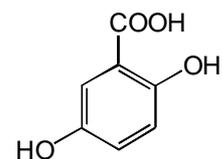
Um ein Ionensignal zu erhalten, wird die gelöste Probe mit der Lösung einer geeigneten Matrix vermischt und auf einem Probenhalter zur Kristallisation gebracht. Die Matrix besteht aus niedermolekularen Verbindungen, die im Wellenlängenbereich des Lasers eine hohe Absorption zeigen. Der Analyt wird mit einem 10^3 - 10^4 fachen Matrixüberschuß vermischt, um einen effizienten Übergang unzersetzter Analytmoleküle in die Gasphase zu erhalten. Die Matrix hat verschiedenen Funktionen [99, 100, 101]:

- Sie absorbiert die Laserenergie und schützt die Probe vor der Zersetzung.
- Sie kann bei der Ionisierung als Brönsted-Säure bzw. -Base wirken.
- Sie kann Wechselwirkungen zwischen den Probenmolekülen untereinander produzieren.

Prinzipiell kann der MALDI-Prozeß sowohl mit IR- als auch UV-Laserlicht erzeugt werden, wobei die Spektren eines gleichen Analyts und bei gleicher Matrix Unterschiede aufweisen [102]. In jedem Fall muß jedoch die Matrix auf die jeweilige Wellenlänge des eingestrahlen Lichts abgestimmt sein. In der Routineanalytik wird MALDI zumeist mit gepulsten Stickstoff-Lasern ($\lambda = 337$ nm) betrieben. Typische Matrix für UV-MALDI sind z.B. Sinapinsäure, α -Cyano-4-hydroxizimtsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**Abb. 8.1**).



Sinapinsäure

 α -Cyano-4-hydroxizimtsäure

2,5-Dihydroxybenzoesäure

Abb. 8.1 Typische UV-MALDI-Matrix

Nach Kristallisierung der Probe wird sie im Hochvakuum mit gepulstem Laserlicht von wenigen Nanosekunden Dauer bestrahlt. Dadurch wird die Desorption und Ionisation der Analytmoleküle eingeleitet. Der Mechanismus, der bei MALDI zur Verdampfung und Ionisierung der Probenmoleküle führt, wird noch nicht in allen Details verstanden. Der MALDI-Prozeß wird formal in "Desorption" und "Ionisation" der Analytmoleküle unterteilt.

8.1.1.1 Die Desorption beim MALDI-Prozeß

Im Zusammenhang mit dem MALDI-Prozeß wird der Begriff "Desorption" als die Freisetzung von Teilchen aus der Festphase verstanden. Für den MALDI-Desorptionsprozeß werden in der Literatur unterschiedliche Modelle diskutiert. Diese gehen davon aus, daß die Übertragung der für die Desorption nötigen Energie über resonante elektronische Anregung der Matrixmoleküle erfolgt. Die nachfolgenden Ereignisse werden unterschiedlich diskutiert.

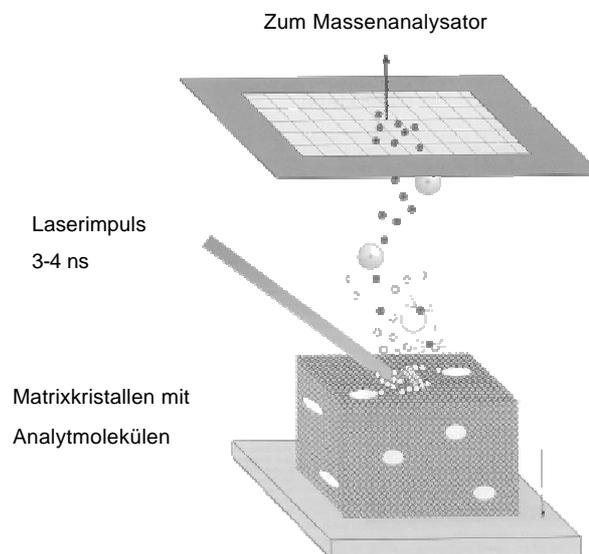


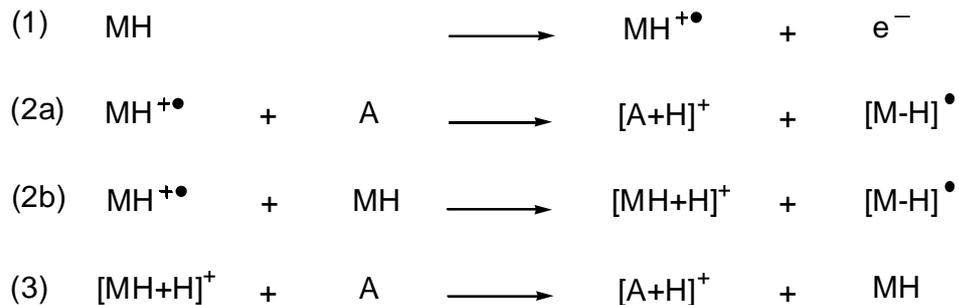
Abb. 8.2 Prinzip des MALDI-Prozesses

- Eine Möglichkeit ist, daß der Energieeintrag über Gitterrelaxation zu starker Störung und Aufweitung der Kristalle führt, was in einem explosiven Phasenübergang fern des thermischen Gleichgewichts resultiert. Es kommt zum Ausstoß einer großen Anzahl von Partikeln; diese Partikeln bestehen aus Verbänden vereinzelter Analytmoleküle mit einer großen Zahl von Matrixmolekülen. Die Matrixmoleküle dampfen im folgenden ab und lassen dabei die untersetzten Analytmoleküle in der Gasphase zurück [103].
- Die andere Möglichkeit geht bei der Desorption von einem Übergang vom Festkörper in eine Hochdruckgasphase aus, bei dem die Schwingungsenergie der elektronisch angeregten Matrixmoleküle in nur sehr geringem Maße auf die Analytmoleküle übertragen wird. Es folgt unter Bildung eines Überschallstrahls eine adiabatische Expansion von Analyt-Matrixpartikeln ins Vakuum und somit die Freisetzung der Analytmoleküle in die Gasphase [104].

8.1.1.2 Die Ionisation beim MALDI-Prozeß

Systematische Untersuchungen zum MALDI-Ionisationsprozeß sind für solche Proteine und Peptide als Analytsubstanzklasse gemacht worden, die im MALDI-Spektrum entweder als einfach-protonierte oder einfach-deprotonierte Molekülionen detektiert werden [105]. Es wird angenommen, daß die Matrix neben dem Desorptions- auch für den Ionisationsprozeß eine entscheidende Rolle spielt.

Die wichtigsten Reaktionsprozesse sind:



Durch die elektronische Anregung wird eine Photoionisation der Matrixmoleküle (MH) induziert; im positiven Ionenmodus führt dies zu Elektronenabstraktion und daher zu positiv geladenen Matrixradikalen (1). Durch Stoß mit diesen wird auf ein ungeladenes Matrix- (2b) oder Analytmolekül (2a) ein Proton übertragen. Hierbei entstehen zum einen protonierte Matrix- bzw. Analytmoleküle und zum anderen werden ungeladene, deprotonierte Matrixradikale gebildet. Die protonierten Matrixmoleküle können nur ihrerseits Protonen auf ungeladene Analytmoleküle transferieren und somit ebenso die gewünschten Analytsignale zum Ergebnis haben (3) [106].

8.1.2 Time-of-flight-Analysator

Bei der TOF-Massenspektrometrie erfolgt die Bestimmung der Masse (m/z) in Abhängigkeit von der Flugzeit, welche die gasförmigen Ionen von der Ionenquelle bis zum Detektor benötigen. Ionen gleicher Ladung werden im elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt.

$$E_{\text{kin}} = E_{\text{elek}} = q \cdot E = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Die Ionen erhalten dabei eine Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zur Wurzel aus ihrer Masse ist. Das bedeutet für Ionen unterschiedlicher Masse, daß sie sich mit verschiedener Geschwindigkeit bewegen [107]

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot q \cdot E}{m}}; v = \frac{L}{t}; t = \sqrt{\frac{m \cdot L^2}{2 \cdot q \cdot E}}$$

Die Flugzeit ist bei einer bestimmten Ionenladung proportional zur Wurzel aus der Masse der Teilchen. Die zeitaufgelöste Messung des Ionensignals läßt sich daher in ein Massenspektrum transformieren.

E_{kin} = kinetische Energie

E_{elek} = elektrische Energie

v = Geschwindigkeit

E = Intensität des elektrischen Feldes

m = Masse

L = Länge des Flugrohrs

q = Ladung

T = Zeit

Ein Flugzeitspektrometer wird gepulst betrieben, das heißt, es gibt einen festen Startzeitpunkt für das Experiment. Zu Beginn des Massenscans wird ein elektrisches Feld erzeugt, das alle zu diesem Zeitpunkt in der Quelle befindlichen Ionen in Richtung des Detektors bewegt. Die Methode erfordert einen gepulsten, diskontinuierlichen Ionenstrahl und eignet sich daher besonders gut zur Kombination mit MALDI. Ihr grosser Vorteil ist, daß man prinzipiell mit einem einzigen Laserpuls ein komplettes Massenspektrum erhält.

Die Flugzeit-Massenspektrometrie erreicht in der Regel nicht so hohe Auflösungen wie andere Methoden. Zur Verbesserung der Auflösung kann ein Reflektor verwendet werden. Ein Reflektor ist ein Ionspiegel, der die Ionen in eine andere Richtung fokussiert (**Abb. 8.3**).



Abb. 8.3 Skizze eines TOF-Analysators

Die Ionen mit höherem Potential durchlaufen eine längere Beschleunigungsstrecke und bekommen eine höhere kinetische Energie. Im Ortsfokus der ersten Flugstrecke überholen sie die langsameren Ionen und kommen eher am Reflektor an. Durch ihre höhere kinetische Energie dringen sie jedoch tiefer in das Reflektor ein und verlassen es später als die langsameren Ionen. Bei geeigneter Wahl des Reflexionsfeldes werden die Ionen gleicher Masse so refokussiert, daß alle gleichzeitig am Detektor eintreffen.

8.2 MALDI-MS-Untersuchungen an dem IROMP aus *P. fl.* -KG173

8.2.1 Peptide mass fingerprint

Eine Möglichkeit, MALDI-MS zur Identifizierung von Proteinen zu verwenden, ist der Abbau des isolierten Proteins mit sequenzspezifischen Proteasen (z.B. Trypsin), um das anfallende Peptidgemisch massenspektrometrisch zu analysieren. Die Peptidsignale erzeugen ein charakteristisches Massenspektrum, den sogenannte "Peptide mass fingerprint", der durch anschließende Datenbanksuche dem Protein zugeordnet wird [108, 109, 110, 111]. Die Genauigkeit der Massenmessungen ist besser als eine Masseneinheit.

Aus dem durch elektrophoretische Verfahren isolierten und tryptisch abgebauten Protein wurde durch MALDI-MS der "Peptide mass fingerprint" aufgenommen. Dieses Spektrum ist in **Abb. 8.4** dargestellt. Als Kontrolle wurden alle die im Gel benachbarten Proteine auch ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Sie erwiesen sich bei +KG173 und -KG173 als identisch. Somit handelt es sich bei dem Protein, dessen Fingerabdruck nur in der Präparation der äußeren Membranen aus -KG173 gefunden wurde, um das gesuchte Protein.

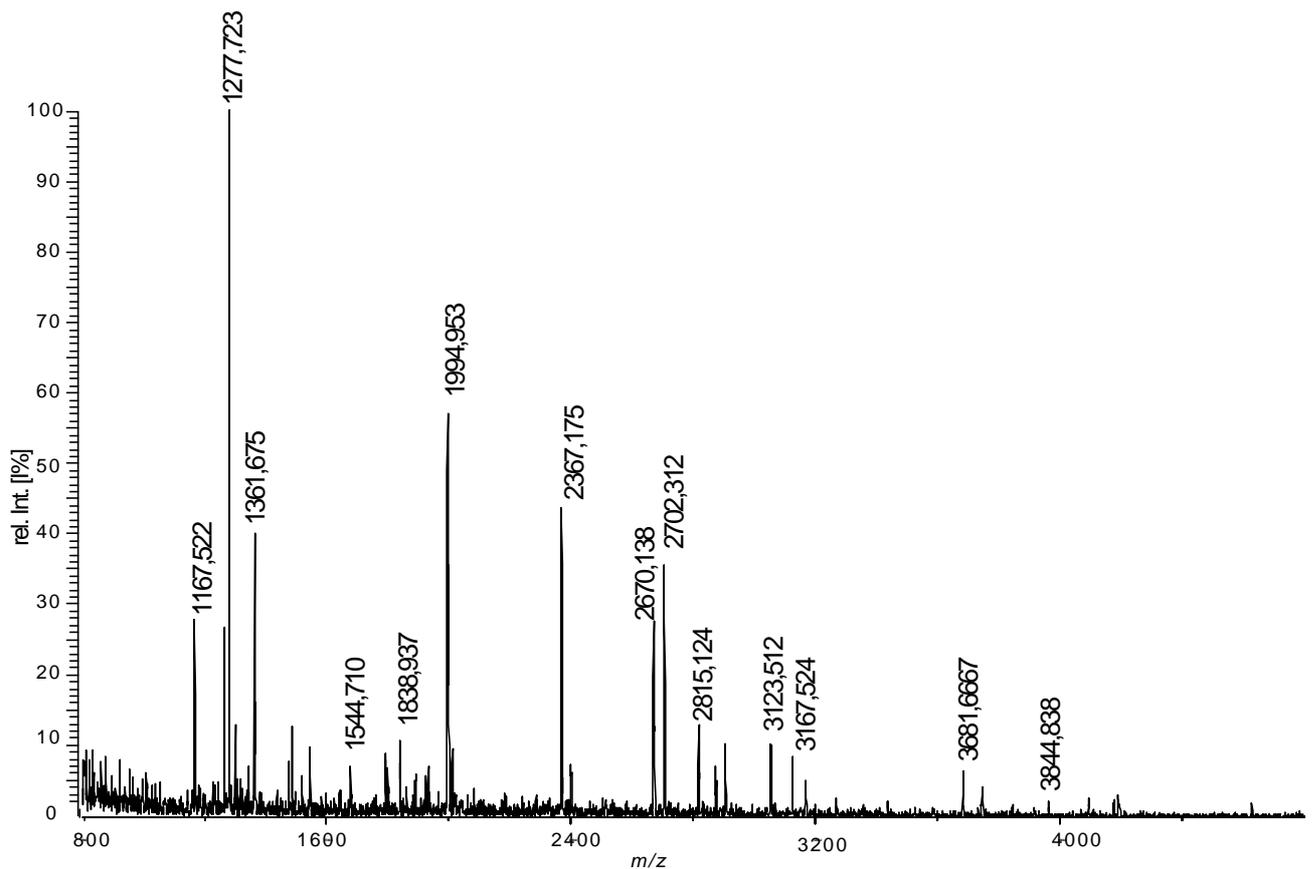


Abb. 8.4 MALDI-MS-Spektrum des IROMPs aus *P. fluorescens* -KG173

Bei der Datenbanksuche mit dem Ergebnissen aus der MALDI-Messungen wurden die Sequenzdatenbanken MASCOT [112] und MS-TAG SIMPLE [113] verwendet (kostenlos zugänglich im Internet). Leider war keine Identifizierung möglich.

8.2.2 Vergleich des Rezeptorproteins aus *P. aeruginosa* PAO1 und *P. putida* WCS358

Eine mögliche Erklärung für die Nicht-identifizierung des isolierten Proteins könnte an der spärlichen Information über die IROMPS, die zur Zeit zur Verfügung steht, liegen. Aus diesem Grund wurden die zwei bekannten Pseudomonas-Rezeptoren miteinander verglichen. Dafür wurde ein tryptischer Verdau simuliert (Trypsin spaltet die Aminosäuren spezifisch nach Lysin und nach Arginin) und die Massen der so erhaltene Peptide berechnet [114]. Die Ergebnisse dieser Simulation sind in **Tab. 8.1** zusammengefaßt. Matrixsignale werden bis ca. m/z 900 u beobachtet, und unterscheiden sie sich nicht von den Analytsignalen. Aus diesem Grund sind nur die Signale bei einem m/z -Wert größer als 950 u repräsentativ .

<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>
970,5686	970,4787	1888,0597	1856,7662
1017,4940	970,6049	1903,9455	1875,9816
1026,5042	988,5104	1927,9918	1885,9806
1221,5111	1014,5009	1946,8918	1905,9558
1230,6694	1124,5410	1999,9514	1922,9711
1234,6618	1244,6850	2028,9918	1954,0021
1242,5544	1245,6592	2075,9351	2144,0471
1406,7280	1249,6979	2359,1458	2146,9868
1533,6482	1318,6829	2395,1505	2202,1307
1560,7295	1402,6450	2491,1894	2391,1217
1580,8073	1405,7990	3394,5677	2619,2843
1659,8190	1421,7786	3607,7625	2929,3663
1715,9081	1466,8405	3959,8155	3047,3509
1717,8649	1528,6556	4380,0981	3227,4387
1772,8318	1597,8702	5595,0749	3509,7593
1798,8149	1611,7511		4001,0880
1835,8928	1638,7665		4166,4484
1856,0605	1709,8710		5018,6216
1896,8220	1720,7542		

Tab. 8.1 Vergleich des simulierten tryptischen Verdau der Ferripyoverdinrezeptoren von *P. aeruginosa* PAO1 und *P. putida* WCS358

Diese Simulation zeigt, daß die primären Strukturen der zur Zeit bekannten Ferripyoverdinrezeptoren nicht konserviert sind. Die sekundären Strukturen beider Rezeptoren wurden berechnet und verglichen [114, 115, 116] (Daten befinden sich im Anhang). Es konnte festgestellt werden, daß die sekundären Strukturen (d. h. α -Helix und β -Falten) hoch konserviert sind (Homologie um 95%).

Alle diese Daten deuten darauf hin, daß die einzige Rolle der primären Struktur, die Konservierung der sekundären Struktur und damit der räumlichen Struktur ist. Auf dieser Weise können Aminosäuren wie z.B. Glycin bzw. Serin durch Alanin bzw. Threonin ersetzt werden, ohne daß die räumlichen Struktur des Proteins sich verändert, was die Identifizierung des Proteins durch seinen "Peptid mass fingerprint" verhindert.

8.3 Untersuchungen zur Sequenzierung des IROMPs

Bei nicht in den Datenbanken verzeichneten Proteinen muß zumindest partiell die Aminosäuresequenz von Peptiden bestimmt werden [117]. Dazu können unterschiedliche massenspektrometrische Techniken verwendet werden, die zur Fragmentierung führen, wie z.B. durch metastabilen Zerfall (MALDI-PSD) [118, 119] oder durch Kollision mit einem Inertgas (ESI-MS auf Tripelquadrupol-, Ionenfallen- oder Q-TOF-Massenspektrometern) [120, 121].

Aus Grunde der hohen Empfindlichkeit, die bei der geringen Analytmenge benötigt wurde, wurden diese Experimente an einem Q-TOF-Massenspektrometer durchgeführt. Die Ionisation der Probe erfolgte an einer nano-Elektrosprayquelle.

8.3.1 Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie

Die Q-TOF-MS liefert mehr Informationen über einen tryptischen Verdau als MALDI-TOF-MS. Sie ergänzt die Möglichkeiten der MALDI-MS um die feanalytischen Optionen der Peptidsequenzierung und Charakterisierung post-translationaler Modifikationen [122].

Dieser Analysator läßt sich mit der Elektrospray- oder nano-Elektrospray-Verfahren gut kombinieren (**Abb. 8.5**).

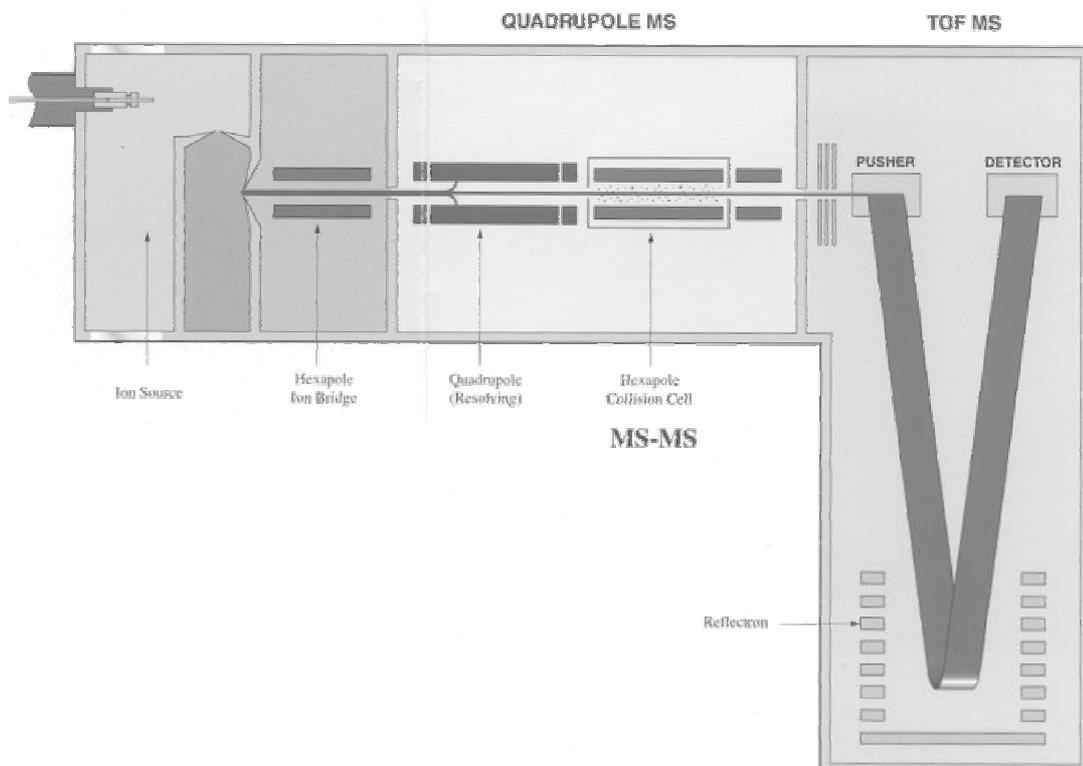


Abb. 8.5 Skizze eines Q-TOF-Analysators

Nach Ionisierung der Gemischprobe werden die so erhaltenen Molekülonen in den Analysator eingeführt. Die erste Trennung erfolgt durch einen Quadrupol. Da lässt sich aus allen Peptiden des Verdau ein einziges auswählen, das in einer Kollisionskammer (normalerweise ein Hexapol) beim Zusammengestoß mit einem Inertgas zerfällt. Die entstehenden Bruchstücke werden in einem TOF-Analysator getrennt [123, 124]. Die detektierten Fragmente der Peptidkette lassen durch ihre Massenunterschiede auf die Aminosäureabfolge des Peptids schließen.

8.3.2 Q-TOF-Untersuchungen am IROMP -KG173

Die Aufnahme dieser Spektren wurde von Dr. S. Heim an der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) durchgeführt. Das isolierte Protein wurde nach seinem tryptischen Verdau zur Trockne eingeeengt und für die Analyse nach Braunschweig geschickt.

Die repräsentativen Peptide wurden durch nano-Elektrospray ionisiert und in einen Q-TOF-Analysator nach m/z getrennt. Die Peptide bei m/z 1361,58, m/z 2815,09 und m/z 2702,32 wurden sequenziert.

8.3.2.1 Ion bei m/z 1361,58: $[M+2H^+]^{2+} = 681,25$

In diesem Fall wurde das doppelt geladene Ion im Quadrupol isoliert und im Hexapol durch CID fragmentiert. Das so erhaltene Spektrum ist in **Abb. 8.6** wiedergegeben. In diesem Spektrum treten alle Fragmente der Y'' -Ionen Serie auf. Die Zuordnung der Fragmentationen ist in **Tab. 8.2** gegenübergestellt.

Aminosäure	n	Y''_n	Δm	Berechnete Masse
Arginin	1	175,11		175,12
Glutamin	2	303,17	128,06	128,06
Prolin	3	400,20	97,03	97,05
Leucin	4	513,29	113,09	113,08
Phenylalanin	5	660,36	147,07	147,07
Threonin	6	761,38	101,02	101,05
Tryptophan	7	947,47	186,09	186,08
Asparagin	8	1061,49	114,02	114,04
Asparagin	9	1175,55	114,06	114,04
Tryptophan	10	1361,58	186,03	186,08

Tab. 8.2 Zuordnung der in **Abb. 8.6** beobachtete Fragmentationen

Bei der Aminosäure Glutamin könnte es sich auch um die Aminosäure Lysin handeln (berechnete Masse 128,10). Anhand der Masseunterschiede zwischen die gefundenen Massen und die berechneten Massen ist es wahrscheinlicher, daß es sich um Glutamin handelt.

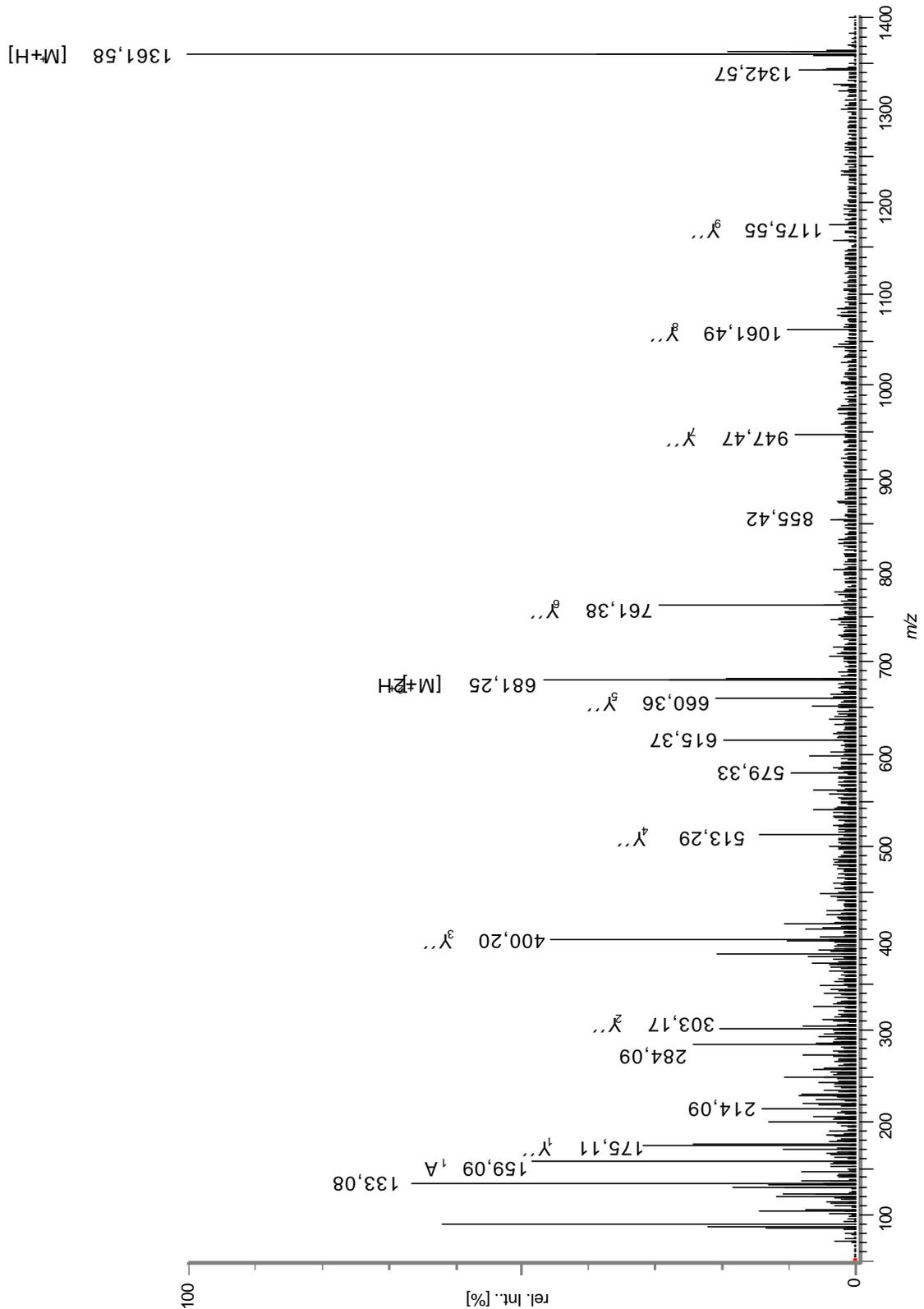


Abb. 8.6 nanoESI-Q-TOF-Massenspektrum des doppelt geladenen Ions $[M+2H]^{2+} = 681,25$

8.3.2.2 Ion bei m/z 2815,09

In diesem Fall wurde das einfach geladene Ion im Analysator isoliert und dann durch CID im Hexapol fragmentiert. Die am TOF detektierten Fragmentationen lassen sich zum Teil zuordnen (**Tab. 8.3**). Das Spektrum ist in **Abb. 8.7** dargestellt.

Aminosäure	N-terminal		C-terminal	
	n	ab 1021,37	n	ab 938,41
Glycin	1	1079,51	9	<i>1053,44</i>
Leucin	2	1192,48	8	1124,48
Asparagin	3	1306,52	7	1223,49
Alanin	4	<i>1377,56</i>	6	1351,53
Serin	5	1464,59	5	1438,64
Glutamin	6	1592,65	4	1509,68
Valin	7	1691,72	3	1623,64
Alanin	8	<i>1762,76</i>	2	1736,71
Asparaginsäure	9	1876,82	1	1793,82

Tab. 8.3 Zuordnung der in Abb. 8.7 beobachtete Fragmentationen

Nicht beobachteten Ionen sind kursiv hervorgehoben

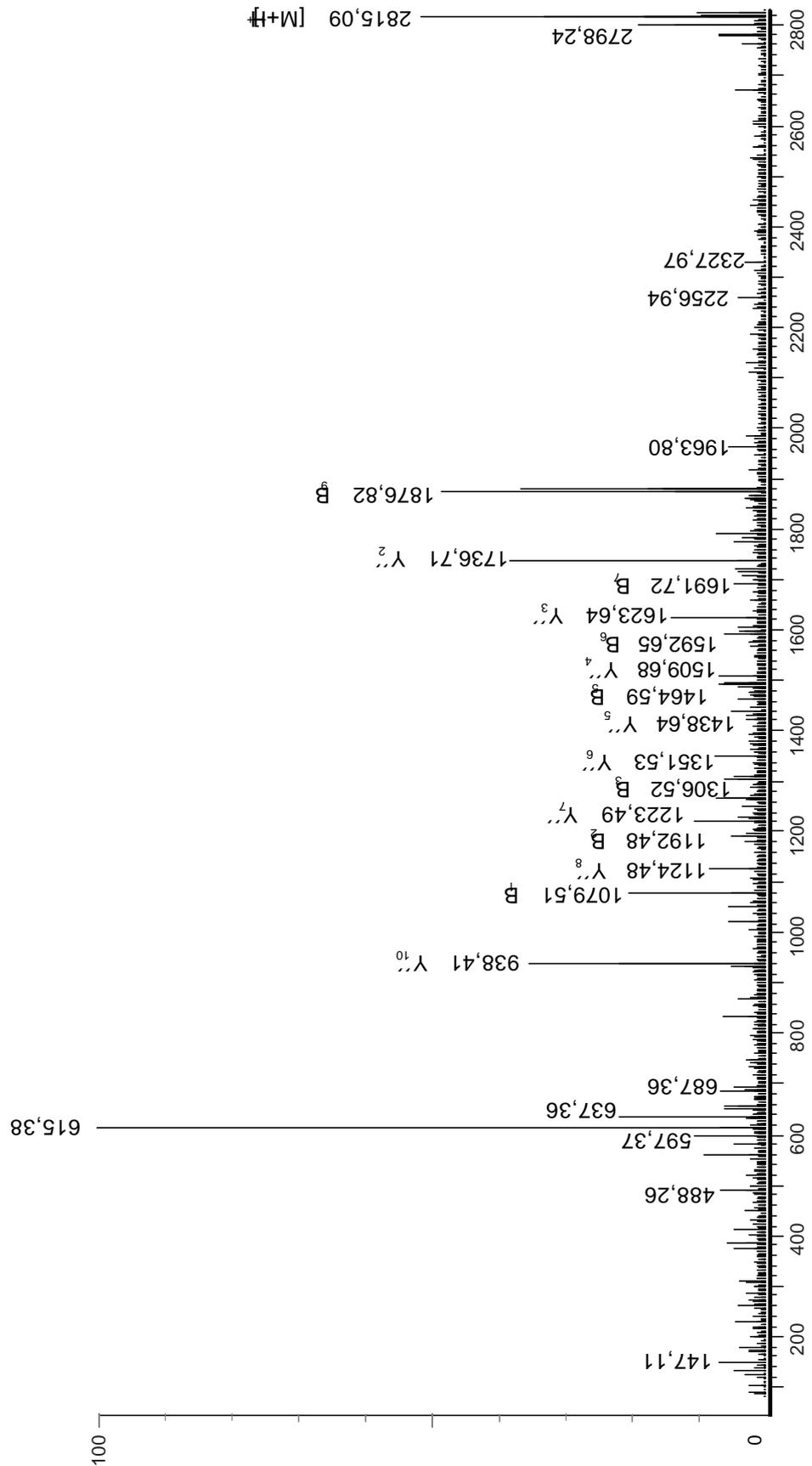


Abb. 8.7 nanoESI-Q-TOF-Massenspektrum des einfach geladenen Ions $[M+H]^+ = 2815,09$

8.3.2.3 Ion bei m/z 2702,32

Bei der Fragmentierung dieses Ion lässt sich wieder ein Peptid nur zum Teil sequenzieren (**Abb. 8.8**). Die zugeordneten Fragmentationen sind in **Tab. 8.4** gegenübergestellt.

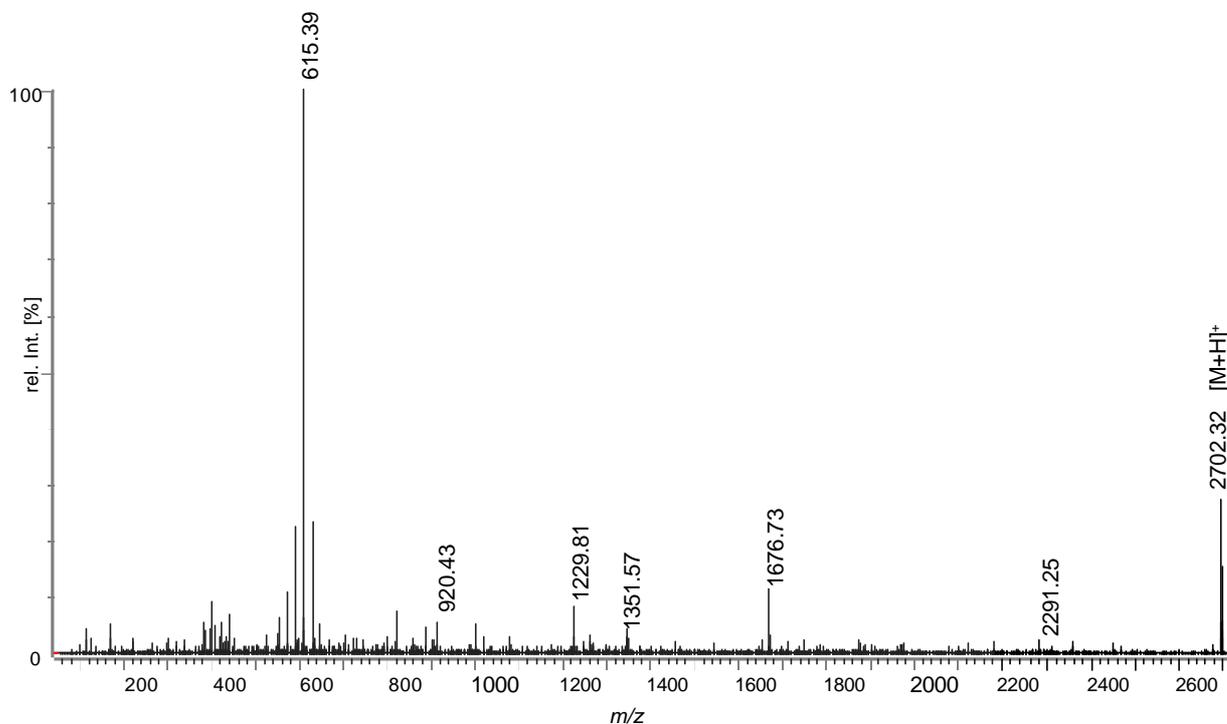


Abb. 8.8 nanoESI-Q-TOF-Spektrum des einfach geladenen Ions $[M+H]^+ = 2702,32$

Aminosäure	N-terminal		C-terminal	
	n	Ab 651,37	n	Ab 1493,78
Asparagin	1	765,42	9	1493,78
Glutamin	2	893,48	8	1379,74
Alanin	3	964,52	7	1251,68
Prolin	4	1061,57	6	1180,64
Glycin	5	1118,59	5	1083,59
Leucin	6	1231,67	4	1026,57
Serin	7	1318,70	3	913,49
Valin	8	1417,77	2	826,46
Glycin	9	1474,79	1	727,39

Tab. 8.3 Zuordnung der in **Abb. 8.7** beobachtete Fragmentationen

Nicht beobachteten Ionen sind kursiv hervorgehoben

8.4 Datenbanksuche

Mit den mittels nanoESI-QTOF sequenzierten Peptiden wurde eine Datenbanksuche durchgeführt [112-114]. Als Ergebnis wurde nur ein Protein gefunden, das eine hohe Homologie mit den drei sequenzierten Peptiden zeigt. Bei diesem Protein handelte es sich um den Hämrezeptor von *P. aeruginosa*, dessen Sequenz aus der Genomaufklärung des Bakteriums bekannt ist [125]. Die folgende Abbildung (**Abb. 8.9**) zeigt den Hämrezeptor mit den drei sequenzierten Peptiden in Vergleich.

Fragmentierte Masse	erhaltene Sequenz
$m/z = 2702.3$	nqapglsvg
$m/z = 2815.09$	glnasqvadp
$m/z = 681,25$	wnnwtfpqr

mplsppfalr pclallllsp slalagnavp lpttitatr teqavdsvps tvsvqtreql rqnvnike lvryepgvsv **ggagqragit**
nqapg lsv g

gynirgidgn riltqidgve lpndffsgpy qthryvdp divkrveilr gpasalygsn aiggavsyft ldpdsdiikd

kdvgarlkag esashswlt satvagradd fdgllhygyr qghetesngg hggtglsrse anpedadsys lgklgwnya

egsrfglvfe kyksdvtdtq ksayggpydk gkpaippsml pggmyqwrkg ndltreryg lehfflidsq **vadriqwsln**
gl nasq vadp

yqlaktdqat refyypitrk vlrrdtttyk erlwvfdsqf dksfaigete hllsyginlk hqkvtgmrsg tgnldtgad

sprdalerss dfpdptvcky alfaqdsisw **ndwftpglr** ydytrmephi tdeflrmkq sqntavdesd kkwhrvspkf
w nnwtfpqr

gvtydfaqhy twygyaqgf rtptakalyg rfenlqagyh iepnplkpe ksqsfetglr gkfdegsgfv avfynkyrdf

idedalntds tggngqtfqs nnieravikg velkgrlelg afgapqglyt qgsvayaygr nkdngepins vnpltgvgf

gydeadgnyg gllswtlvkr kdrvdstfh tpdgtasqfk tpgfgvldls ayyrskdlit lnaglynltid kkywlwddvr

gydsvgeasa lapanidrls qpgrnfavnl vwdi

Abb. 8.9 Vergleich des Hämrezeptors mit den sequenzierten Peptiden

8.5 Zusammenfassung

Die Bakterien *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 wurden auf Minimalmedium parallel unter Eisenmangelbedingungen und in einem eisenhaltigen Medium gezüchtet. Die äußeren Membranen wurden isoliert und die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert. Bei den Proteinen, die deutlich überproduziert wurden, handelte es sich um die gesuchten IROMPs (Iron Rezeptor Outer Membrane Proteins).

Nach Erkennung des IROMPs wurde die Bande, die das Rezeptorprotein enthielt, ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Bei Trypsin handelt es sich um ein Enzym, das die Peptidkette spezifisch nach Arginin und Lysin spaltet, es sei denn, daß ihnen Phenylalanin folgt. Die verdauten Proteine wurden mittels MALDI-MS analysiert und mit den so erhaltenen "peptide mass fingerprint" wurde eine Databanksuche durchgeführt. Bei dieser Databanksuche gelang nicht die Identifizierung des Proteins.

Die "peptide mass fingerprints" der zur Zeit bekannten Ferripyoverdinrezeptore wurden mittels Bioinformatik simuliert. Nach Vergleich der so erhaltenen Ergebnisse wurde festgestellt, daß diese Rezeptorproteine keine konservierte Domäne haben und nur die sekundäre Struktur des Proteins konserviert ist. Um eine Identifizierung des isolierten Proteins zu ermöglichen, mußte Information über die Aminosäuresequenz gewonnen werden. Dafür wurden massenspektrometrische Techniken angewendet, die nicht im Köln zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurde das isolierte Protein im DFG-Zentrum in Braunschweig mittels nanoESI-QTOF teilweise sequenziert.

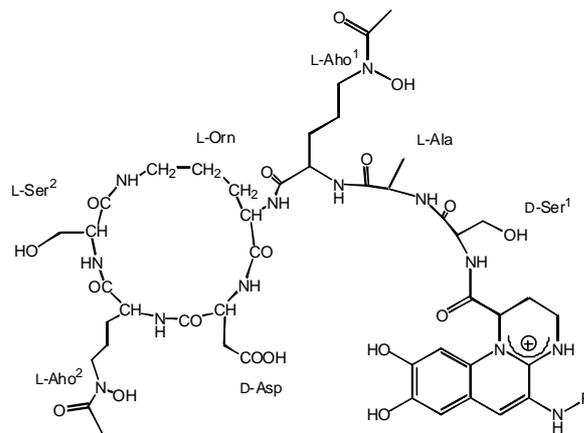
Im Braunschweig erfolgte auch die Datenbanksuche, wobei das isolierte Protein eine sehr hohe Homologie mit dem Hämrezeptor von *Pseudomonas aeruginosa* zeigt. Nach Vergleich mit anderen Häm- und Ferripyoverdinrezeptorproteinen konnte festgestellt werden, daß alle diese Proteine eine ähnliche dreidimensionale Struktur haben, d. h. ein sogenanntes α -Faß-Protein mit ca. 20 α -Falten-Transmembransegmenten sind, die sich zu einem Faß zusammenfügen. Dieses Faß besteht ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren und befindet sich innerhalb der äußeren Membran. Aus diesem Faß ragen mehrere α -Helix-Loops, die für die Erkennung und Bindung des Siderophors verantwortlich sind.

Bei dem isolierten Protein handelt es sich um ein IROMP, ein Protein, das in der äußeren Membran lokalisiert ist und eine Rolle im Eisentransport spielt. Die eindeutige Identifizierung und Charakterisierung des Proteins muß warten, bis es *de novo* sequenziert wird und das Genom für diesen Stamm (*Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173) aufgeklärt wird.

9 AUSBLICK

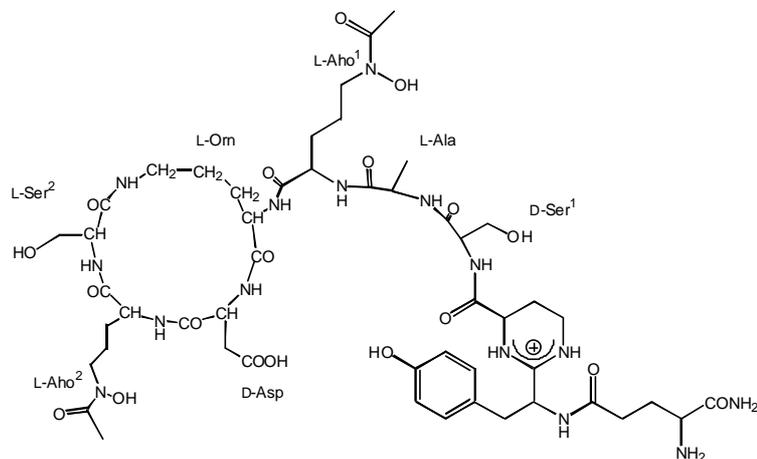
In Rahmen dieser Arbeit wurde der Eisentransport von *Pseudomonas fluorescens* G173 und *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 untersucht. Pseudomonaden produzieren unter Eisenmangelbedingungen Siderophore, um Eisen gezielt aufzunehmen.

Bei dem Hauptsiderophor des Stamms *P. fluorescens* G173 handelt es sich um das Pyoverdin G173 **(1)**. Dieses Pyoverdin kann mit zwei unterschiedlichen Seitenketten (Bernstein- und Äpfelsäureamid) isoliert werden. Dieser Stamm produziert auch kleinere Mengen von Succinopyoverdin, Azotobactin und Ferribactin.



(1)

Der Stamm *P. fluorescens* Koeln-G173 ist wahrscheinlich eine Mutation des ursprünglichen Stamms *P. fluorescens* G173. Beide Stämme unterscheiden sie sich in den von ihnen produzierten Siderophoren. Der Hauptsiderophor dieses mutierten Stamms ist das Ferribactin **(2)**. Als Nebensiderophore wurden neue bisher nicht bekannte Ferribactine gefunden und massenspektrometrisch untersucht (s. Abb. 4.47). In zukünftigen Arbeiten könnten sie isoliert und mittels NMR charakterisiert werden. Es könnten auch Kreuzfütterungsversuche durchgeführt werden, um die Effizienz der Eisenaufnahme zu vergleichen. Die Komplexkonstanten sollten auch bestimmt und verglichen werden.



(2)

Der Stamm *Pseudomonas fluorescens* Koeln G173 wurde parallel unter Eisenmangelbedingungen und auf eisenhaltigem Medium gezüchtet. Die äußeren Membranen wurden isoliert und mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Bei dem bei Eisenmangel überproduzierten Protein handelt es sich um ein sogenanntes IROMP (Iron Regulated Outer Membrane Protein).

Die Bande, die nur in den unter Eisenmangelbedingungen gezüchteten Bakterien vorhanden ist, wurde ausgeschnitten und das so erhaltene Protein mit Trypsin enzymatisch verdaut.

Das verdaute Protein wurde zuerst mit MALDI-MS untersucht und sein charakteristisches "peptide mass fingerprint" aufgenommen. Da bei diesen Rezeptoren nur die sekundäre Struktur konserviert ist, gelang die Identifizierung des Proteins durch eine Datenbanksuche nicht. Aus diesem Grund wurde das verdaute Protein mit nanoESI-QTOF-MS untersucht und drei von den repräsentativen Peptiden sequenziert. Mit diesen neuen Daten gelang die Identifizierung des Proteins als ein IROMP aufgrund der hohen Homologie mit dem Hämrezeptorprotein von *Pseudomonas aeruginosa*.

In zukünftigen Arbeiten sollte das isolierte Protein *de novo* sequenziert werden, um die komplette Aminosäuresequenz zu erhalten. Mit dieser Sequenz wäre die Identifizierung des Proteins eindeutiger. Das Genom für diesen Stamm sollte auch aufgeklärt werden; dann wäre ein Vergleich zwischen den genetischen und den massenspektrometrischen Daten möglich.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, welche die Isolierung und massenspektrometrische Charakterisierung von IROMPs ermöglicht. Anhand dieser Methode sollten die Untersuchungen der Rezeptoren anderer Stämme möglich sein. Wenn die Zahl der Daten über Pyoverdine und ihre Proteinrezeptoren groß genug ist, wird es möglich sein, einen Zusammenhang zwischen Struktur des Pyoverdins und des Rezeptors zu finden.

10 EXPERIMENTELLER TEIL

10.1 Verwendete Geräte und Materialien

10.1.1 Massenspektrometrische Instrumente

- ESI-Massenspektrometer
Finnigan MAT 900ST
(EB-Trap-Geometrie)
Spritzenpumpe Model 22
Fa. FINNIGAN MAT, Bremen
Fa. HAVARD APPARATUS, South Nakis, USA
- MALDI-Massenspektrometer
Voyager-DE™ ST
(BioSpectrometry Workstation)
Fa. PerSpective Biosystems, Frankfurt am Main
- Q-TOF-Massenspektrometer
Q-TOF II
(mit nanoESI-Quelle)
Fa. MICROMASS, Manchester, UK
- GC-Massenspektrometer
Finnigan INCOS 500
Fa. FINNIGAN MAT, Bremen

10.1.2 Spektroskopische Geräte

- UV/VIS
PERKIN-ELMER Lambda 7
U 2000 Spectrophotometer
Fa. PERKIN-ELMER, Überlingen
Fa. HITACHI, Tokyo, Japan
- NMR-Spektroskopie
BRUKER AC 300
BRUKER DRX 500
Indy 4400SC Workstation
Fa. BRUKER ANALYTISCHE MESSTECHNIK,
Karlsruhe
Fa. BRUKER ANALYTISCHE MESSTECHNIK,
Karlsruhe
Fa. SILICON GRAPHICS, Mountain View, CA/USA

10.1.3 Geräte für analytische Trennungen

- GC/MS
 - Gas chromatograph (VARIAN 3400) Fa. VARIAN INSTRUMENTS, Sunnyvale, CA/USA
 - Säule: Chirasil-L-Val (22 m, 0,25 mm ID, 0,1 µm Schichtdicke) Fa. MACHERAY NAGEL, Düren

- GC
 - GC 9000 Series (mit FID-80 Detektor) Fa. FISIONS INSTRUMENTS, Egelsbach
 - HITACHI -2000 Integrator) Fa. HITACHI, Tokyo, Japan
 - Säule: Chirasil-L-Val (22 m, 0,25 mm ID, 0,1 µm Schichtdicke) Fa. MACHERAY NAGEL, Düren

- HPLC
 - HPLC-Pumpe 64 Fa. KNAUER, Berlin
 - Gradientenprogrammer 50 B Fa. KNAUER, Berlin
 - UV/Vis-Filterphotometer 730 Fa. KNAUER, Berlin
 - CHROMSTAR Software v. 3.10 Fa. BRUKER-FRANZEN ANALYTIK, Bremen
 - Säule: Nucleosil-100 C₁₈ (250 x 4 mm ID mit 5mm Vorsäule) Fa. KNAUER, Berlin

- SDS-PAGE
 - Spannungsgerät LKB 2197 Fa. LKB, Bromma, Schweden

- Niederdruckchromatographie
 - Peristatic Pump P-3 Fa. PHARMACIA, Uppsala, Schweden
 - UV/VIS-Detektor ISCO (UA-5 Absorbance-Monitor) Fa. ISCO, Lincoln, NE/USA

10.1.4 Sonstige Geräte

- Zentrifugen
 - Labofuge 15000 Fa. HERAEUS-CHRIST, Osterode am Harz
 - Heraus Sepatech Suprafuge 22 Fa. HERAEUS-CHRIST, Osterode am Harz

- Schüttler
 - SM25 Fa. E. BÜHLER, Tübingen
 - Thermomixer 5436 Fa. EPPENDORF, Hamburg
 - Vortex-Genie Mixer Fa. SCIENTIFIC INDUSTRIES, Bohemia, NY/USA

- pH-Elektrode
 - pH-Meter 766 Calimatic Fa. KNICK, Berlin

- Autoklav
 - Varioklav Dampsterilisator Fa. H+P LABORTECHNICK, Oberschleißheim
 - Webeco C Fa. WEBECKE, Bad Schwartau

- Tangentialfiltration
 - THLF-System Fa. MILLIPORE, Bedford, MA/USA

- Lyophilisatoren
 - Lyovac GT 2 Fa. LEYBOLD, Hanau
 - Univapo 150 H Fa. SAVANT INSTRUMENTS, Hollbrock, NY/USA
 - (mit Unicryo MC 1C)

- Ultraschall
 - V1A Fa. SONICS AND MATERIALS, Danbury, CT/USA
 - Sonorex Super RK 255H Fa. BANDELIN ELECTRONIC, Berlin

- Wasseraufarbeitung
 - Clear Plus Fa. WASSERAUFARBEITUNG + REGENERIERSTATION, Barsbüttel
 - Ultra Clear Fa. WASSERAUFARBEITUNG + REGENERIERSTATION, Barsbüttel

10.1.5 Materialien

- Adsorption
 - Sep-Pak RP₁₈-Kartuschen Fa. WATERS, Milford, MA/USA
 - XAD-4, Korngröße 0,3-1 mm Fa. SERVA, Heidelberg
 - ZipTip RP₁₈ Fa. MILLIPORE, Bedford, MA/USA
- Niederdruckchromatographie
 - Biogel P2 (200-400 mesh) Fa. BIO-RAD LAB, Richmond, USA
 - DEAE Sephadex A-25 Fa. PHARMACIA, Uppsala, Schweden
 - CM Sephadex C-25 Fa. PHARMACIA, Uppsala, Schweden
- Dialyse
 - Dialyseschläuche (cut off 14 kDa) Fa. BIOMOL, Hamburg

10.1.6 Chemikalien

Es wurde vollentsalztes und entweder zweimal in einer Quarzapparatur destilliertes oder an einem Wasseraufarbeitungssystem gereinigtes Wasser verwendet. Sinapinsäure und α -Cyano-4-Hydroxy-zimtsäure wurden aus Methanol umkristallisiert.

Alle organischen Lösungsmittel wurden einmal destilliert. Die übrigen Reagenzien sowie die Lösungsmittel für die Spektroskopie besaßen p.A. Qualität.

(Firmen: ALDRICH, Steinheim; FLUKA, Buchs, Schweiz; MERCK, Darmstadt; RIEDEL DE HAEN, Steelze; SIGMA, Deisendorf; PROMEGA, Mannheim)

10.1.7 Bakterienstamm

Alle Untersuchungen in Rahmen dieser Arbeit wurden an den Stämme G173 und Koeln-G173 der Bakterienspecies *Pseudomonas fluorescens* durchgeführt.

10.2 Massenspektrometrische Messungen

10.2.1 ESI-Massenspektrometrie

10.2.1.1 Probenvorbereitung

Die in Wasser gelösten Proben wurden zuerst am Sep-Pak RP₁₈ adsorbiert und mit Wasser vollentsalzt. Die Elution erfolgte mit einem 0,01 N Essigsäure/Methanol-Gemisch (20:80, v:v). Das Eluat wurde direkt untersucht, wobei die Probenkonzentration 5-100 µM betrug.

10.2.1.2 Probenanalyse

- MS¹

Sprayspannung	3,4-3,6 kV
Kapillartemperatur	230 °C
Auflösung	>1800 (10% Tal)

- MSⁿ

Stoßgas	Helium 99,9999%
Stoßgasdruck	ca. $2,5 \cdot 10^{-3}$ Pa

10.2.2 MALDI-Massenspektrometrie

10.2.2.1 Probenvorbereitung durch Target-Präparation

Die Proben wurden durch Dünnschichtpräparation vorbereitet [107]. Auf jedem Target-Spot wurde 1 µl einer gesättigten Lösung von Sinapinsäure bzw. 2-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 0,1% TFA/Acetonitril (50:50, v:v) aufgetragen und an der Luft eintrocknen gelassen. Die Proben wurden nach Entsalzung an C₁₈ Material in 0,1% TFA/Acetonitril (50:50, v:v) mit einer Konzentration von ca. 0,01-1 µM gelöst und mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Matrixlösung versetzt. Unmittelbar danach wurde 1 µl des Gemisches auf das Target aufgetragen. Eintrocknen der Proben erfolgte an Luft bei Raumtemperatur.

10.2.2.2 Probenanalyse

Beschleunigungsspannung	20 kV
Extraction Modus	delayed
Gridspannung	66%
Laser	337 nm, die Laserleistung wurde individuell für jede Probe eingestellt.
Low Mass Gate	750 Da
Kalibrierung	Extern für die Verdauproben

10.2.3 Q-TOF-Massenspektrometrie

10.2.3.1 Probenvorbereitung

Die in Wasser gelösten Proben wurden zuerst am ZipTip RP₁₈ adsorbiert und mit Wasser vollentsalzt. Die Elution erfolgte mit einem 0,01 N Essigsäure/Methanol-Gemisch (20:80, v:v). Das Eluat wurde direkt untersucht, wobei die Probenkonzentration 5-100 nM betrug.

10.2.3.2 Probenanalyse

Einlass	nano-Electrospray
Flußrate	3µl/h
Spannung am Quadrupol	>9,1 kV

10.3 Isolierung der Siderophore aus *P. fl.* G173 und *P. fl.* Koeln-G173

10.3.1 Mikrobiologische Arbeiten

Der Stamm *Pseudomonas fluorescens* G173 wurde von Dr. J.-M. Meyer (Institut Louis Pasteur, Universität Straßburg) zur Verfügung gestellt. Der Stamm *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173 ist eine Variante dieses Stamms, deren Bakterien sich von den Bakterien aus *P. fl.* G173 in den produzierten Siderophoren unterscheiden. Diese Variante wurde vermutlich nach einer Spontanmutation produziert.

Für die Zucht beider Stämme wurde ein Medium folgender Zusammensetzung verwendet:

4,0 g Bernsteinsäure in 800 ml Wasser
6,0 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ in 50 ml Wasser
3,0 g KH_2PO_4 in 50 ml Wasser
0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in 50 ml Wasser
1,0 g $(NH_4)_2SO_4$ in 50 ml Wasser

Die Lösungen wurden bei Bedarf mit 40%iger KOH auf pH 7,1 eingestellt und autoklaviert (20 Minuten bei 130 °C und 2×10^5 Pa.)

Die autoklavierten Zuchtgefäße wurden mit Sterilstopfen verschlossen und 26 Stunden bei 30 °C mit 100 U/min geschüttelt. Um aerobe Bedingungen einzuhalten, wurden die Kulturen passiv belüftet. Der pH-Wert wurde regelmäßig überprüft und bei einem Anstieg auf über 7,8 mit 6 M HCl auf pH 7,3 gebracht.

Nach der Abtrennung der Zellen entweder mittels Zentrifugation oder Tangentialfiltration wurde der pH-Wert mit 6 M Salzsäure auf pH 5 eingestellt und dem Kulturmedium 10 ml einer 5%igen Eisen(III)citrat-Lösung pro Liter Kulturlösung zugegeben. Anschließend wurden 0,2 g NaN_3 je Liter zur Verhinderung von neuem Bakterienwachstum zugegeben.

10.3.2 Adsorption an XAD-4-Harz

Die im Kulturfiltrat enthaltenen Ferrisiderophore wurden an preaktiviertes XAD-4 Material adsorbiert und gründlich mit Wasser gespült, damit die Salze aus dem Kulturmedium und überschüssiges Eisen(III)citrat entfernt wurden. Die Desorption der Ferrisiderophore erfolgte mit Methanol/Wasser (50:50, v:v). Das Eluat wurde unter Vakuum bei 30°C zur Trockne eingengt.

10.3.3 Chromatographische Auftrennung der Ferrisiderophore

Der XAD-4-Extrakt wurde im Laufmittel gelöst und auf die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Biogel P-2 Säule aufgetragen.

Gelbett:	20 x 52 cm
Laufmittel:	0,2 M PyAc-Puffer (pH 5)
Fluß:	1,2 ml/min
Detektion	405 nm

10.3.3.1 Siderophore aus *Pseudomonas fluorescens* G173

Bei der Trennung an Biogel Material wurden zwei Fraktionen erhalten, eine ferribactinhaltige und eine pyoverdinhaltige (s. Abb. 3.1, Seite 16). Beide Fraktionen wurden zur Trockne eingengt und im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Die zweite Biogel-Fraktion erhielt unterschiedliche Siderophore, deren Trennung durch Ionenaustauschchromatographie am CM-Sephadexmaterial erfolgte

Material	CM-Sephadex C-25
Gelbett	2,6 x 55 cm
Laufmittel	0,02 M PyAc-Puffer (pH 5)
Fluß	1,8 ml/min
Detektion	405 nm

Die erste CM-Fraktion erhielt die Pyoverdine mit einer Bernsteinsäureamidseitenkette und einer Äpfelsäureamidseitenkette. Die zweite Fraktion erhielt das Succinopyoverdin und das Azotobactin. Alle die Fraktionen wurden bei 30 °C im Vakuum zur Trockne eingengt.

Die Trennung der Pyoverdine erfolgte am DEAE-Material.

Material	DEAE-Sephadex A-25
Gelbett	3 x 27 cm
Laufmittel	0,02 M PyAc-Puffer (pH 5)
Fluß	1,8 ml/min
Detektion	405 nm

Das Succinopyoverdin und das Azotobactin wurden durch Adsorption an einer Sep-Pak RP₁₈-Kartusche dekomplexiert und anschließend durch Chromatographie an Biogel-Material getrennt.

Material	Biogel P-2
Gelbett	2 x 72 cm
Laufmittel	0,01 M HAc
Fluß	0,8 ml/min
Detektion	280 nm

10.3.3.2 Siderophore aus *Pseudomonas fluorescens* Koeln-G173

Der XAD-Extrakt enthielt eine Mischung aus Ferribactinen und Pyoverdinen mit unterschiedlichen Seitenketten als Nebensiderophore, die durch Gelchromatographie getrennt werden konnte.

Material	Biogel P-2
Gelbett	20 x 52 cm
Laufmittel	0,2 M PyAc-Puffer (pH 5)
Fluß	1,2 ml/min
Detektion	405 nm

Die ferribactinhaltige Fraktion wurde zur Trockne eingengt und im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

10.3.4 Dekomplexierung der Ferri-Siderophore

10.3.4.1 Dekomplexierung am Sep-Pak RP₁₈

Die Sep-Pak RP₁₈-Kartuschen wurden mit 5 ml Methanol aktiviert. Nach Waschen mit 10 ml Wasser wurde die in Wasser gelöste CM-Fraktion aufgetragen. Die Dekomplexierung erfolgte mit 4%igem Kaliumoxalatpuffer. Nach Waschen mit Wasser wurden die eisenfreie Siderophore mit einem Gemisch 0,1 M Essigsäure/Methanol (75:25, v:v) eluiert und unter vermindertem Druck bei 30 °C zur Trockne eingengt.

10.3.4.2 Dekomplexierung mit 8-Hydroxychinolin

Die ferribactinhaltige Biogel-Fraktion wurde in 1%iger wäßriger Zitronensäurelösung gelöst und solange mit 5 ml einer 5%igen Lösung von 8-Hydroxychinolin in Chloroform extrahiert, bis sich die organische Phase sich nicht mehr verfärbte. Die wäßrige Phase wurde mit 5 ml Chloroform gewaschen und unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,05 M Essigsäure aufgenommen und an Biogel P-2 chromatographiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer von Lösungsmittel befreit und zur vollständigen Entfernung der Essigsäure mehrmals im Wasser aufgenommen und jeweils i.v. zur Trockne eingengt.

Gelbett: 2 x 72 cm
Laufmittel: 0,05 M Essigsäure
Fluß: 1,2 ml/min
Detektion 254 nm

10.3.5 RP-HPLC

Zur Reinheitsüberprüfung der Siderophore mittels RP-HPLC wurden 25 µl einer Lösung (0,5 mg/ml) auf eine Nucleosil-100 C₁₈ Säule injiziert.

Säule: 250 mm, 4 mm ID
Laufmittel: 0,1 M Essigsäure
Methanol
Gradient bezogen auf Methanol
3% (5 min), 3.78% (25 min), 78% (5 min)
Fluß 0,7 ml/min
Detektion 254 nm

10.4 Isolierung des Rezeptorproteins G173

10.4.1 Zucht der Bakterien

Die Identifizierung des Rezeptorproteins erfolgte über den Vergleich der äußeren Membranen von den Bakterien. Diese wurden in zwei unterschiedlichen Kulturmedien gezüchtet. Das erste Medium ist in 5.3.1 beschrieben und das zweite unterscheidet sich von diesem nur in der Zugabe von 0.05% Fe(III)citrat.

10.4.2 Isolierung der äußeren Membranen

Zur Gewinnung der äußeren Membranen wurden die nach der Trennung durch Zentrifugation erhaltenen Zellpellets zweimal mit einer 20%igen Sucroslösung (w:v) gewaschen, in der gleichen Sucroslösung resuspendiert und wieder zentrifugiert. Anschließend wurden die äußeren Membranen durch Behandlung mit Lysozym abgetrennt [94].

30 ml 0,1 M TRIS-HCl (pH 7,8)

30 ml 2M Sucrose

4ml 1% Na-EDTA (pH 7,8)

10ml 0.5% Lysozym

je 1g äußere Membranen

Nach 60 Minuten bei 30 °C wurden die Bakterienzellen pelletiert (8000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand nochmals zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 10 °C). Der Rückstand nach der zweiten Zentrifugation wurde in 1mM NaEDTA gelöst und mindestens 48 Stunden gegen Na-EDTA 27 mM dialysiert und dann lyophilisiert.

10.4.3 Micro-Lowry Proteinbestimmung

Mit dieser Nachweismethode können Proteinkonzentrationen zwischen 1–50 µg/ml bestimmt werden. Die Kupferionen bilden einen Komplex mit den Proteinen, der in der Lage ist, ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz zu reduzieren, wobei eine intensive blaue Farbe entsteht. Die Konzentration des Proteins läßt sich direkt aus der Extinktion bei 750 nm berechnen

Folgenden Lösungen wurden verwendet:

Lösung A: 0,8 M NaOH

Lösung B 10% SDS-Lösung (w:v)

Lösung C 0,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und 1 g $\text{KNaC}_4\text{H}_6\text{O}_6$ in
250 ml H_2O und 250 ml 20%igen Na_2CO_3 (w:v) gelöst

Lösung D Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:5 mit H_2O verdünnt)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Lösungen A, B, C und H₂O im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt, 0,4 ml dieser Lösung zu 0,4 ml Probenvolumen hinzugegeben und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Folin-Ciocalteau Reagenz zugefügt und nach 30 Minuten die Extinktion bei 750 nm gemessen. Zur Umrechnung der Extinktion auf die Gewichtsmenge des eingesetzten Proteins wurde eine Eichgerade mit einem Rinderserumalbuminstandard verwendet.

10.4.4 SDS-PAGE

10.4.4.1 Präparative SDS-PAGE

Die Proben wurden in Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer versetzt. Der wässrige Probenpuffer hat folgende Zusammensetzung:

Tris/HCl, pH 6,8	62,5 mM
SDS	2% (w:v)
Glyzerin	10% (w:v)
Bromphenolblau	0,005% (w:v)

Zur Trennung der Proteine wurden 10%ige Trenngelle mit einer Schichtdicke von 1,6 mm (14 cm x 14,0 cm) verwendet, die mit einem 6%igen Sammelgel zur Fokussierung überschichtet waren. Ein Dichtgel diente zur Abdichtung der Gelkammern.

	Trenngel	Sammelgel	Dichtgel
Monomerlösung (ml)	10	2	2
Trenngelpuffer (ml)	7,5	-	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	1,5	-
Wasser	12	4	4
10%-ige SDS-Lösung (w:v) (ml)	0,3	0,1	-
10%-ige APS-Lösung (w:v) (ml)	0,3	0,15	0,15
TEMED (µl)	15	10	10

Tab. 5.1 Zusammensetzung der verwendeten Gele

Die Monomerlösung wurde aus 29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid in 100 ml Wasser bereitet. Bei dem Trenngelpuffer handelte es sich um eine Tris 1,5 M Lösung, die auf pH 8,8 mit HCl eingestellt wurde. Als Sammelgelpuffer wurde eine 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) Lösung verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte zur Fokussierung der Proben im Sammelgel bei einer Stromstärke von 35 mA. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 45 mA erhöht.

Als Elektrophoresepuffer wurde folgende Lösung verwendet:

0,25 M Tris/HCl, pH 8,3

0,1% (w:v) SDS

1,9 M Glycin

10.4.4.2 Coomassiefärbung

Die Gele wurden zwei Stunden in 200 ml einer Lösung aus 40% Methanol (v:v); 20% Essigsäure (v:v) und 0,1% (w:v) Coomassie Farbstoff gleichzeitig fixiert und gefärbt. Danach wurden sie viermal 2 Stunden mit je 250 ml einer Lösung aus 20% Methanol (v:v) und 10% Essigsäure (v:v) gewaschen zur Entfärbung des Hintergrunds. Anschließend wurden die Gele 4 Stunden mit Wasser gewaschen zur Entfernung von Methanol- und Essigsäureresten.

Die G173-Protein-haltigen Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 0,3 ml Wasser aufbewahrt.

10.4.5 Tryptische Verdauung

10.4.5.1 Entfärbung der Gelbanden

Zur Entfernung von Staub und andere Verunreinigungen wurden die Gelbanden zweimal 5 Minuten mit 1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ unter leichtem Schütteln gewaschen. Danach wurden sie zweimal 30 Minuten mit je einem Gemisch 1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ /Acetonitril (50:50, v:v) zur Entfernung des Farbstoffs behandelt. Anschließend wurden die Banden 15 Minuten mit Acetonitril von Wasserresten befreit und unter Vakuum bei Raumtemperatur (SpeedVac) getrocknet.

10.4.5.2 Verdauung des Proteins

Die dehydratisierten Gelbanden wurden mit einer Lösung aus Trypsin in NaHCO_3 (10 $\mu\text{g/ml}$) unter leichtem Schütteln 16 Stunden bei 30°C behandelt. Um die Verdauung zu beenden, wurde dem Überstand 1 μl 0.1%TFA zugegeben. Aus der verbleibenden Lösung wurden die Proben für MALDI bzw. Q-TOF direkt vorbereitet.

10.5 Spektroskopie

10.5.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme der UV/Vis-Spektren der eisenfreien Siderophore erfolgte in 0,025 M Phosphatpuffer pH 4,5 gegen den jeweiligen Puffer als Referenz.

10.5.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren der Siderophore wurden mit einer Lösung von 10-15 mg Substanz in 0,6 ml D₂O bzw. H₂O/D₂O (9:1, v:v), pH 4,3) durchgeführt. Die Angabe der chemischen Verschiebungen erfolgte relativ zu DSS (¹H(δ(DSS)) = 0 ppm, ¹³C(δ(DSS)) = -1,61 ppm). Das Wassersignal wurde bei Bedarf durch die Watergate-Pulssequenz (D₂O-Messungen) oder durch Vorsättigung (H₂O/D₂O-Messungen) unterdrückt.

10.6 Aminosäureanalyse

Die Hydrolyse und die Derivatisierung wurden in einem druckbeständigen Pyrex-Glasröhrchen (1,5 x 10 cm) mit teflonbeschichteter Schraubkappe durchgeführt.

10.6.1 Totalhydrolyse

1 mg des Pyoverdins wurde in 1,5 ml 6 M Salzsäure gelöst und 21 Stunden bei 110 °C hydrolysiert. Nach Abkühlen wurde das Hydrolysat unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt und durch wiederholtes Aufnehmen mit bidestilliertem Wasser und erneutes Einengen vollständig von Säure befreit. Die Probe wurde an der Ölpumpe getrocknet.

10.6.2 Partialhydrolyse

1,5 mg des Pyoverdins wurde in 1,5 ml 6 M HCl gelöst und 2 Stunden bei 90 °C hydrolysiert. Die Probe wurde anschließend mit Na₂CO₃ 20% (w:v) neutralisiert und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 5 ml Wasser gelöst und auf eine aktivierte Sep-Pak RP₁₈-Kartusche aufgetragen. Nach Spülen mit 15 ml Wasser wurde die Probe mit einem Gemisch aus Methanol/ 0,1 N Essigsäure (10:1, v:v) eluiert. Das chromophorhaltig Eluat wurde unter verminderten Druck zur Trockne eingengt, totalhydrolysiert und weiter wie in dem Fall der Totalhydrolyse aufgearbeitet.

10.6.3 TAP-Derivatisierung der Hydrolysate

Der Rückstand der Hydrolyse wurde mit 1,5 ml einer Isopropanol/Acetylchlorid-Lösung (5:1, v:v) versetzt, 1 min im Ultraschallbad behandelt und 60 Minuten auf 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch i. v. bei 50 °C zur Trockne eingengt und anschließend im Ölpumpenvakuum 30 Minuten getrocknet.

Das isopropilierte Hydrolysat wurde in 1 ml Dichlormethan aufgenommen, 2 min mit Ultraschall behandelt und nach Zugabe 0,3 ml TFAA 5 min auf 150 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Probe bei Raumtemperatur im Vakuum zur Trockne eingengt und direkt gemessen.

10.6.4 GC/MS Analyse

Für die GC/MS-Untersuchung wurde der Rückstand in 100 µl Dichlormethan gelöst. Es wurden 1,0 µl der TAP-Derivate injiziert.

Programm	60 °C: 14 min; 5 °C/min bis 85 °C	Säule:	Chirasil-L-Val
	85 °C: 10 min; 6 °C/min bis 190 °C		
	190 °C: 10 min		

Die Identifizierung erfolgte anhand der Massenspektren und Vergleich der Retentionszeiten mit Aminosäurestandards.

11 LITERATUR

- [1] <http://www.dmsz.de>
- [2] N.J. Palleroni,
Pseudomonas classification.
Antonie Van Leeuwenhoek, 1993. **64**: 231-251.
- [3] N.J. Palleroni, R. Kunisawa, R. Contopoulou, M. Doudoroff,
Nucleic Acids Homologies in the Genus Pseudomonas.
Int. J. Sys. Bacteriol., 1973. **23**: 333-339.
- [4] James A. Sullivan, cellsalive.com, Used with Permission
- [5] J.B. Neilands,
Evolution of biological iron binding centers.
Struct. Bonding, 1972. **11**: 145-170.
- [6] J.B. Neilands,
Methodology of siderophores.
Struct. Bonding, 1984. **58**: 1-24.
- [7] K.N. Raymond, C.J. Carrano,
Coordination Chemistry and Microbial Iron Transport.
J. Am. Chem. Soc., 1979. **12**: 183-189.
- [8] C.E. Lankford,
Bacterial Assimilation of Iron.
Crit. Rev. Microbiol., 1973: 273-331.
- [9] J.B. Neilands,
Iron Absorption and Transport in Microorganisms.
Ann. Rev. Biochem., 1981. **1**: 27-46.

- [10] H. Budzikiewicz,
Siderophores of Fluorescent Pseudomonads.
Z. Naturforsch., 1997. **52c**: 713-720.
- [11] L.A. de Weger, J.J.C.M. van Arendock, K. Recourt, G.A.J.M. van der Hofstad, P.J. Weisbeek, B. Lugtenberg,
Siderophore-mediated Uptake of Fe⁺³ by the Plant Growth-Stimulating Pseudomonas putida WCS358 and by Other Rhizosphere Microorganism.
J. Bacteriol., 1988. **170**: 4693-4698.
- [12] A. Stintzi, C. Barnes, J. Xu, K.N. Raymond,
Microbial iron transport via a siderophore shuttle: A membrane iron transport paradigm.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000. **97**: 10691-10696.
- [13] V. Braun, H. Killmann,
Bacterial solutions to the iron-supply problem.
Trends Biochem. Sci., 1999. **24**: 104-109.
- [14] K. Gensberg, K. Hughes, A.W. Smith,
Siderophore-specific induction of iron uptake in Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol., 1992. **138**: 2381-2387.
- [15] R.C. Hider,
Siderophore Mediated Absorption of Iron.
Springer-Verlag ed. 1984, Berlin Heidelberg. 25-87.
- [16] C. Völker, D.A. Wolf-Gladrow,
Physical limits on iron uptake mediated by siderophores or surface reductases.
Mar. Chem., 1999. **65**: 227-244.
- [17] F. Pattus, M.A. Abdallah,
Siderophores and Iron-transport in Microorganisms.
J. Chin. Chem. Soc., 2000. **47**: 1-20.

- [18] K. Poole, L. Young, S. Neshat,
Enterobactin-mediated Iron Transport in Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol., 1990. **172**: 6991-6996.
- [19] K. Schlegel,
Strukturaufklärung von Siderophoren aus fluoreszierenden Pseudomonaden
Dissertation, Universität zu Köln, 2001
- [20] H. Schäfer, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
*Zur Genese der amidisch an den Chromophor von Pyoverdinen gebundenen
Dicarbonsäuren.*
Z. Naturforsch., 1991. **46c**: 398-406.
- [21] W. Voßen, R. Fuchs, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
*Can the Peptide Chain of a Pyoverdin be Bound by an Ester Bond to the Chromophore?
- The Old Problem of Pseudobactin 7SR1.*
Z. Naturforsch., 2000. **55c**: 153-164.
- [22] D. Uría Fernández, R. Fuchs, K. Taraz, H. Budzikiewicz, P. Munsch, J.-M. Meyer,
The structure of a pyoverdine produced by a Pseudomonas tolaasii- like isolate.
BioMetals, 2001. **14**: 81-84.
- [23] I. Gwose, K. Taraz,
Pyoverdine aus Pseudomonas putida.
Z. Naturforsch., 1992. **47c**: 487-502.
- [24] H. Georgias, K. Taraz, H. Budzikiewicz, V. Geoffroy, J.-M. Meyer,
*The Structure of the Pyoverdin from Pseudomonas fluorescens 1.3. Structural and
biological Relationships of Pyoverdins from Different Strains.*
Z. Naturforsch., 1999. **54c**: 301-308.
- [25] G. Briskot, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Pyoverdin-Type Siderophores from Pseudomonas aeruginosa.
Liebigs Ann. Chem., 1988: 375-384.

- [26] K. Geisen, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Neue Siderophore des Pyoverdin-Typs aus Pseudomonas fluorescens.
Monatsh. Chem., 1992. **123**: 151-178.
- [27] S. Wong-Lun-Sang, J.-J. Bernardini, C. Hennard, P. Kyslik, A. Dell, M.A. Abdallah,
Bacterial Siderophores: Structure Elucidation, 2D ¹H and ¹³C NMR Assignments of Pyoverdins Produced by Pseudomonas fluorescens CHAO.
Tetrahedron Lett., 1996. **37**: 3329-3332.
- [28] H. Budzikiewicz,
Siderophores from Fluorescent Pseudomonas.
in: " *Studies in Natural Products Chemistry*"
Atta-ur-Rahman, Editor. 1997, Elsevier: Amsterdam. p. 793-835.
- [29] H. Budzikiewicz,
The biosynthesis of pyoverdins.
Pure Appl. Chem., 1994. **66**: 2207-2210.
- [30] B.K. Duffy, G. Défago,
Environmental Factors Modulating Antibiotic and Siderophore Biosynthesis by Pseudomonas fluorescens Biocontrol Strains.
Appl. Environ. Microbiol., 1999. **65**: 2429-2438.
- [31] B. Nowak-Thompson, S.J. Gould,
Biosynthesis of the Pseudobactin Chromophore from Tyrosine.
Tetrahedron, 1994. **50**: 9865-9872.
- [32] M. Böckmann, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Biogenesis of the Pyoverdin Chromophore.
Z. Naturforsch., 1997. **52c**: 319-324.
- [33] Ph. Jacques, M. Ongena, I. Gwose, D. Seinsche, H. Schröder, P. Delfosse, P. Thonart,
K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Structure and Characterization of Isopyoverdin from Pseudomonas putida BTP1 and Its Relation to the Biogenetic Pathway Leading to Pyoverdins.
Z. Naturforsch., 1995. **50c**: 622-629.

- [34] R. Michalke, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Azoverdin - an Isopyoverdin.
Z. Naturforsch., 1996. **51c**: 772-780.
- [35] R. Michalke, K. Taraz, H. Budzikiewicz, P. Thonart, Ph. Jacques,
Absolute Configuration of the Isopyoverdin Chromophore.
Z. Naturforsch., 1997. **52c**: 549-550.
- [36] R. Michalke, K. Taraz, H. Budzikiewicz, P. Thonart, P. Jacques,
A 5,6-Dihydro-isopyoverdin from Azomonas macrocytogenes.
Z. Naturforsch., 1997. **52c**: 855-857.
- [37] P. Demange, A. Bateman, A. Dell, M.A. Abdallah,
Structure of Azotobactin D, a Siderophore of Azotobacter vinelandii Strain D (CCM 289).
Biochem., 1988. **27**: 2745-2752.
- [38] E.M. Schaffner, R. Hartmann, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Structure Elucidation of Azotobactin 87, Isolated from Azotobacter vinelandii ATCC 12837.
Z. Naturforsch., 1996. **51c**: 139-150.
- [39] C. Amann,
Strukturaufklärung der Siderophore aus Pseudomonas fluorescens 18.1.
Dissertation, Universität zu Köln, 1999
- [40] C. Lenz,
Die Acylseitenkette der Pyoverdine aus Pseudomonas aeruginosa PAO1: Biosyntheseprodukt, Artefakt, Derivat.
Dissertation, Universität zu Köln, 2000
- [41] V. Braun, K. Hantke,
Receptor-mediated bacterial iron transport.
in: " *Transition Metals in Microbial Metabolism*"
G. Winkelmann and C.J. Carrano, Editors. 1997, Harwood Academic Publishers:
Amsterdam.

- [42] Y. Yamano, T. Nishikawa, Y. Komatsu,
Ferric iron transport system of Pseudomonas aeruginosa PAO1 that functions as the uptake pathway of a novel catechol-substituted cephalosporin, S-9096.
Appl. Environ. Biotech., 1994. **40**: 892-897.
- [43] V. Braun, K. Hantke, W. Köster,
Bacterial Iron Transport: Mechanisms, Genetics, and Regulation.
in: " *Metal Ions in biological Systems*"
A. Sigel and H. Sigel, Editors. 1998, Marcel Dekker Inc.: New York. p. 67-145.
- [44] U. Hohlneicher, R. Hartmann, H. Budzikiewicz,
Pyoverdine, Ferribactin, Azotobactin - a New Triade of Siderophores from Pseudomonas chlororaphis ATCC 9446 and Its Relation to Pseudomonas fluorescens ATCC 13525.
Z. Naturforsch., 1995. **50c**: 337-344.
- [45] H. Budzikiewicz, S. Kilz, J.-M. Meyer,
Identical Pyoverdines from Pseudomonas fluorescens 9AW and from Pseudomonas putida 9BW.
Z. Naturforsch., 1997. **52c**: 721-728.
- [46] P. Cornelis, D. Hohnadel, J.-M. Meyer,
Evidence for the Different Pyoverdine-Mediated Iron uptake Systems among Pseudomonas aeruginosa Strains.
Infect. Immun., 1989. **57**: 3491-3497.
- [47] R. Fuchs, M. Schäfer, V. Geoffroy, J.-M. Meyer,
Siderotyping - A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines.
Curr. Top. Med. Chem., 2001. **1**: 35-37.
- [48] J.-M. Meyer, A. Stintzi, K. Poole,
The ferripyoverdine receptor FpvA of Pseudomonas aeruginosa PAO1 recognizes the ferripyoverdines of P. aeruginosa PAO1 and P. fluorescens ATCC 13525.
FEMS Microbiol. Lett., 1999. **170**: 145-150.

- [49] J.-M. Meyer,
Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of luorescent Pseudomonas species.
Arch. Microbiol., 2000. **174**: 135-142.
- [50] D. Voet, J.G. Voet,
Biochemie. 1998: VCH.
- [51] Lehninger,
Principles of Biochemistry., ed. D.L. Nelson and M.M. Cox. 1997.
- [52] A.D. Ferguson, E. Hofmann, J.W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte,
Siderophore-Mediated Iron Transport: Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide.
Science, 1998. **282**: 2215-2220.
- [53] A.D. Ferguson, J. Breed, K. Diederichs, W. Welte, J.W. Coulton,
An internal affinity-tag for purification and crystallization of the siderophore receptor FhuA, integral outer membrane protein from Escherichia coli K-12.
Prot. Sci., 1998. **7**: 1636-1638.
- [54] S.K. Buchanan, B.S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm & J. Deisenhofer.
Crystal Structure of the Outer Membrane active transporter FepA from E. coli.
Nature Struc. Biol., 1999. **6**: 56-63.
- [55] K. Poole, S. Neshat, K. Krebs, D.E. Heinrichs,
Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the Ferripyoverdine Receptor Gene fpvA of Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol., 1993. **175**: 4597-4604.
- [56] J.D. Marugg, L.A. de Weger, H.B. Nielander, M. Oorthuizen, K. Recourt, B. Lugtenberg, G.A.J.M. van der Hofstad, P.J. Weisbeek,
Cloning and Characterization of a Gene Encoding an Outer Membrane Protein Required for Siderophore-Mediated Uptake of Fe³⁺ in Pseudomonas putida WCS358.
J. Bacteriol., 1989. **171**: 2819-2826.

- [57] T.E. Clarke, L.W. Tari, H.J. Vogel,
Structural Biology of Bacterial Iron Uptake Systems.
Curr. Top. Med. Chem., 2001. **1**: 7-30.
- [58] R. Fuchs,
Massenspektrometrische Untersuchung cyclischer Pyoverdine: Strukturaufklärung und Siderotyping
Dissertation, Universität zur Köln, 1999
- [59] M. Dressler,
Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers.
J. Chromatogr., 1979. **165**: 167-206.
- [60] J. Adam,
Isolierung und Untersuchungen zur Struktur von Siderophoren des Pyoverdintyps aus Pseudomonas fluorescens ATCC 13525
Diplomarbeit, Universität zu Köln, 1994
- [61] G. Briskot, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Siderophore vom Pyoverdin-Typ aus Pseudomonas aeruginosa.
Z. Naturforsch., 1986. **41c**: 497-506.
- [62] H. Budzikiewicz,
Secondary Metabolites from fluorescent pseudomonads.
FEMS Microbiol. Lett., 1993. **104**: 209-228.
- [63] K. Taraz, R. Tappe, H. Schröder, U. Hohlneicher, I. Gwose, H. Budzikiewicz,
Ferribactins - the Biogenetic Precursors of Pyoverdins.
Z. Naturforsch., 1991. **46c**: 527-533.
- [64] J.-M. Meyer, M.A. Abdallah,
The Fluorescent Pigment of Pseudomonas fluorescens: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties.
J. Gen. Microbiol., 1978. **107**: 319-328.

- [65] P. Dallakian, H. Budzikiewicz,
Gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry in amino acid analysis of pyoverdins.
J. Chromatogr. A, 1997. **787**: 195-203.
- [66] S.A. Carr, M.E. Hemling, M.F. Bean, G.D. Roberts,
Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology.
Anal. Chem., 1991. **63**: 2802-2824.
- [67] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong,
Electrospray ionization-principles and practice.
Mass Spectrom. Rev., 1990. **9**: 37-70.
- [68] P. Kebarle, L. Tang,
From ions in solution to ion in the gas phase, the mechanism of electrospray mass spectrometry.
Anal. Chem., 1993. **65**: 972-986A.
- [69] B.E. Wingerm, K.J. Light-Wahl, R.R. Ogorzalek Loo, H.R. Udseth, R.D. Smith,
Observation and implications of high mass-to-charge ration ions from electrospray ionization mass spectrometry.
J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1993. **4**: 524-535.
- [70] I.A. Papayannopoulos,
The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides.
Mass Spectrom. Rev., 1995. **14**: 49-73.
- [71] J.C. Schwartz, J. Jordine,
Quadrupole ion trap mass spectrometry.
Methods Enzymol., 1996. **270**: 552-586.
- [72] R.E. March,
Ion trap mass spectrometry.
Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 1992. **118/119**: 71-135.

- [73] R.E. March,
An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry.
J. Mass Spectrom., 1997. **32**: 351-369.
- [74] W. Paul,
Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen(Nobel Vortrag).
Angew. Chem., 1990. **102**: 780-789.
- [75] P. Roepstorff,
Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides.
Biomed. Mass Spectrom., 1984. **11**: 601.
- [76] S.J. Gaskell,
Electrospray: Principles and Practice.
J. Mass Spectrom., 1997. **32**: 677-688.
- [77] P. Demange, S. Wendenbaum, C. Linget, C. Mertz, M.T. Cung, A. Dell, M.A. Abdallah,
Bacterial Siderophores: Structure and NMR assignment of pyoverdins Pa, siderophores of Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692.
Biol. Met., 1990. **3**: 155-170.
- [78] unveröffentlichte Ergebnisse
- [79] unveröffentlichte Ergebnisse
- [80] P. Plateau, M. Guéron,
Exchangeable proton NMR without base-line distortion using new strong-pulse sequences.
J. Am. Chem. Soc., 1982. **104**: 49-73.
- [81] W. Voßen, K. Taraz,
Structure of the Pyoverdine PVD 2908 - a new Pyoverdine from Pseudomonas sp. 2908.
BioMetals, 1999. **12**: 323-329.

- [82] M. Weber, K. Taraz, H. Budzikiewicz, V. Geoffroy, J.-M. Meyer,
The structure of a pyoverdine from Pseudomonas sp. CFML 96.188 and its relation to other pyoverdines with a cyclic C-terminus.
BioMetals, 2000. **13**: 301-309.
- [83] M. Ongena, P. Jacques, P. Thonart, I. Gwose, D. Uría Fernández, M. Schäfer, H. Budzikiewicz,
The pyoverdin of Pseudomonas fluorescens BTP2, a novel structural type.
Tetrahedron Lett., 2001. **42**: 5849-5851.
- [84] H. Beiderbeck, D. Risse, K. Taraz,
A new Pyoverdin from Pseudomonas aureofaciens.
Z. Naturforsch., 1999. **54c**: 1-5.
- [85] J.-M. Meyer, A. Stintzi, D. de Vos, P. Cornelis, R. Tappe, K. Taraz, H. Budzikiewicz,
Use of siderophores to type pseudomonads: the three Pseudomonas aeruginosa pyoverdine systems.
Microbiol., 1997. **143**: 35-43.
- [86] P. Cornelis, N. Moguilevsky, J.F. Jacques, P.L. Masson,
Study of the Siderophores and Receptors in Different Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa.
Antibiot. Chemother., 1987. **39**: 290-306.
- [87] H. Budzikiewicz, D. Uría Fernández, R. Fuchs, R. Michalke, K. Taraz, C. Ruangviryachai,
Pyoverdins with a Lys e- Amino Link in the Peptide Chain?
Z. Naturforsch., 1999. **54c**: 1021-1026.
- [88] A. Derome,
The use of N.M.R. spectroscopy in the structure determination of natural products: two-dimensional methods.
Nat. Prod. Rep., 1976. **6**: 111-141.

- [89] A. Bax, M.F. Summers,
¹H and ¹³C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR.
J. Magn. Reson., 1986. **48**: 323-327.
- [90] K. Taraz, D. Seinsche, H. Budzikiewicz,
Pseudobactin- und Pseudobactin A- Varianten: Neue Peptidsiderophore vom Pyoverdintyp aus Pseudomonas fluorescens "E2".
Z. Naturforsch., 1991. **46c**: 522-526.
- [91] A. Bax, D.G. Davis,
MLEV-17- Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy.
J. Magn. Reson., 1985. **65**: 355-360.
- [92] L. Seipold,
Komplexierungseigenschaften und Bedeutung für die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme von Ferribactin 9446 aus Pseudomonas chlororaphis ATCC 9446
Diplomarbeit, Universität zu Köln, 2000
- [93] unveröffentlichte Ergebnisse
- [94] T. Mizumo, M. Kageyama,
Separation and Characterization of the Outer Membrane of Pseudomonas aeruginosa.
J. Biochem., 1978. **84**: 179-191.
- [95] G.L. Peterson,
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more applicable.
Anal. Biochem., 1977. **83**: 346-356.
- [96] F. Lottspeich, H. Zorbas,
Bioanalytik. Vol. 1. 1998, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- [97] <http://www.bio.unc.edu/faculty/salmon/lab/protocolsbasicproteinchemistry.html>

- [98] M. Karas, D. Bachman, U. Bahr, F. Hillenkamp,
Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds.
Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 1987. **78**: 53-68.
- [99] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait,
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers.
Anal. Biochem., 1991. **63**: 1193A-1203A.
- [100] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp,
Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.
Org. Mass Spectrom., 1992. **27**: 472-480.
- [101] M.P. Chiarelli, A.G.J. Sharkey, D.M. Hercules,
Excited- State Proton Transfer in Laser Mass Spectrometry.
Anal. Biochem., 1993. **65**: 307-311.
- [102] K. Strupat, J. Kampmeier, V. Horneffer,
Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for UV and IR-MALDI. Part II: Crystallographic and mass spectrometric analysis.
Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 1997. **169/170**: 43-50.
- [103] A. Vertes, R. Gijbels, R.D. Levine,
Homogeneous Bottleneck Model of Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of Large Molecules.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 1990. **4**: 228-233.
- [104] R.C. Beavis, B.T. Chait,
Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption.
Chem. Phys. Lett., 1991. **181**: 479-484.

- [105] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer,
Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors.
J. Mass Spectrom., 2000. **35**: 1-12.
- [106] V. Böckelmann, B. Spengler, R. Kaufmann,
Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization.
Eur. J. Mass Spectrom., 1995. **1**: 81-93.
- [107] J. Franzen,
Improved Resolution for MALDI-TOF mass spectrometers: a mathematical study.
Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 1997. **164**: 19-34.
- [108] M. Mann, M. Wilm,
Error-Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags.
Anal. Chem., 1994. **66**: 4390-4399.
- [109] O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, M. Mann,
Identification of the Components of Simple Protein Mixtures by High-Accuracy Peptide Mass Mapping and Database Searching.
Anal. Chem., 1997. **69**: 4741-4750.
- [110] A. Sickmann, W. Dormeyer, S. Wortelkamp, D. Woitalla, W. Kuhn, H.E. Meyer,
Identification of proteins from human cerebrospinal fluid, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
Electrophoresis, 2000. **21**: 2721-2728.
- [111] J.S. Cottrell,
Protein identification by peptide mass fingerprint.
Pept. Res., 1994. **7**: 115-124.
- [112] <http://www.matrixscience.com>
- [113] <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/mstagfd.htm>

- [114] <http://www.psipred.net>
- [115] P. Baldi, S. Brunak, P. Frasconi, G. Pollastri, G. Soda,
Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction.
Bioinformatics, 1999. **15**: 937-946.
- [116] G. Pollastri, P. Baldi, P. Fariselli, R. Casadio,
Improved Prediction of the Number of Residue Contacts by Recurrent Neural Networks.
Bioinformatics, 2001. **ISMB2001, special issue, in press.**
- [117] C.L. Nilsson, P. Davidsson,
New Separation Tools for Comprehensive Studies of Protein Expression by Mass Spectrometry.
Mass Spectrom. Rev., 2000. **19**: 390-397.
- [118] P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler,
Peptide and Protein Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source Deca Time-of-Flight Mass Spectrometry.
J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1998. **10**: 91-103.
- [119] D.N. Nguyen, G.W. Becker, R.M. Riggan,
Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology.
J. Chromatogr. A, 1995. **705**: 21-45.
- [120] R. Aebersold, D.R. Goodlett,
Mass Spectrometry in Proteomics.
Chem. Rev., 2001. **101**: 269-295.
- [121] M.R. Larsen, P. Roepstorff,
Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis.
Fresenius. J. Anal. Chem., 2000. **366**: 677-690.
- [122] I.V. Chernushevich, A.V. Loboda, B.A. Thomson,
An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry.
J. Mass Spectrom., 2001. **36**: 849-865.

- [123] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski,
Orthogonal Acceleration time-of-flight mass spectrometry.
Mass Spectrom. Rev., 2000. **19**: 65-107.
- [124] I.V. Chernushevich, W. Ens, K.G. Standing,
Orthogonal-Injection TOF-MS.
Anal. Chem. News Feat., 1999. **July**: 452A-461A.
- [125] C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrener, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K.-S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S. Lory, M.V. Olson,
Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PA01, an oppotunistic pathogen.
Nature, 2000. **406**: 959-964.

12 ANHANG

12.1 EI-Massenspektrum der TAP-derivatisierten Aminosäuren

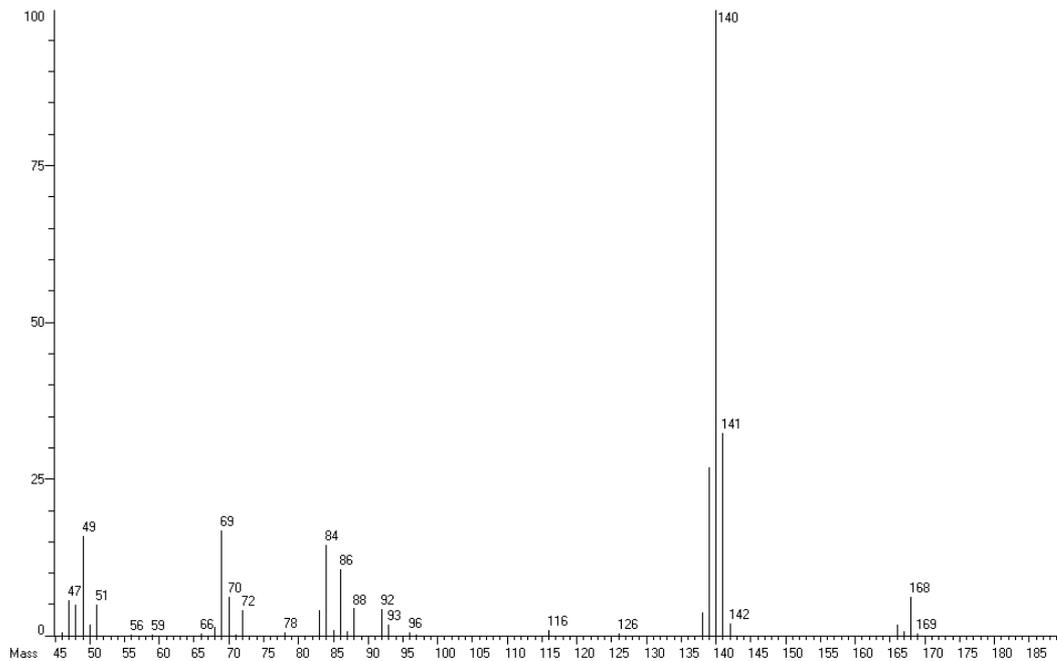


Abb. A-1 EI-Massenspektrum des TAP-derivatisierten Alanins

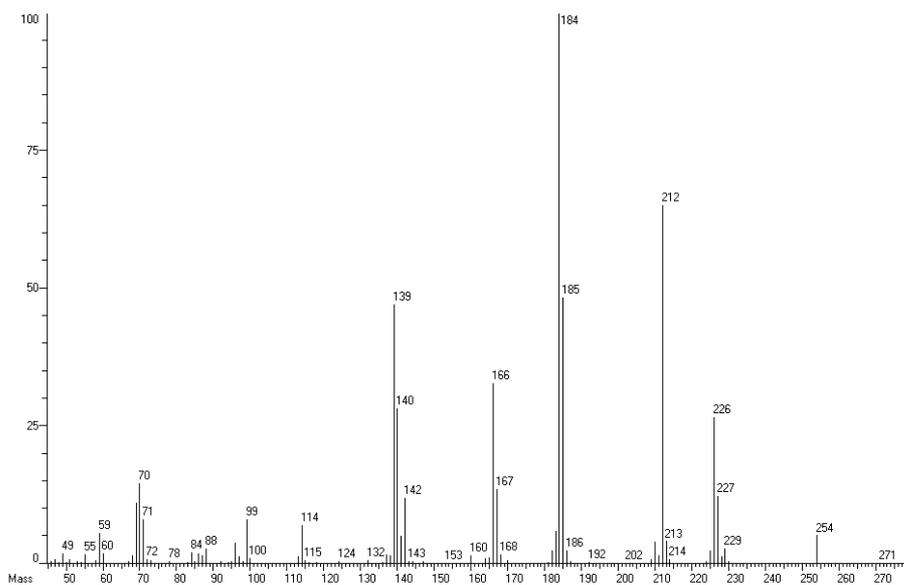


Abb. A-2 EI-Massenspektrum der TAP-derivatisierten Asparaginsäure

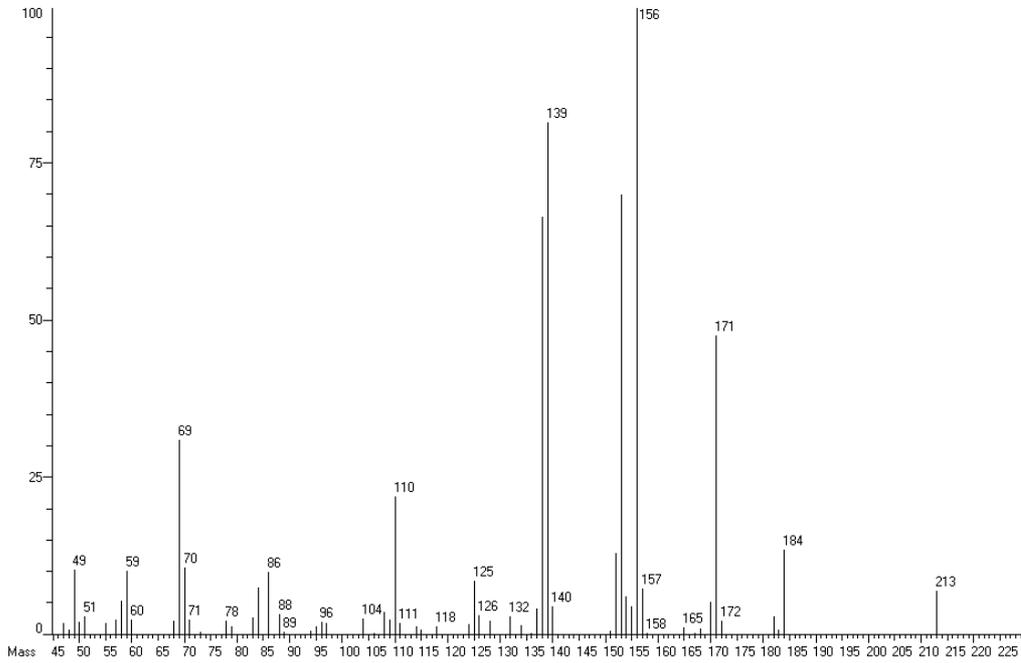


Abb. A-3 Massenspektrum des hydroxyacetylierten TAP-Derivats des Serins

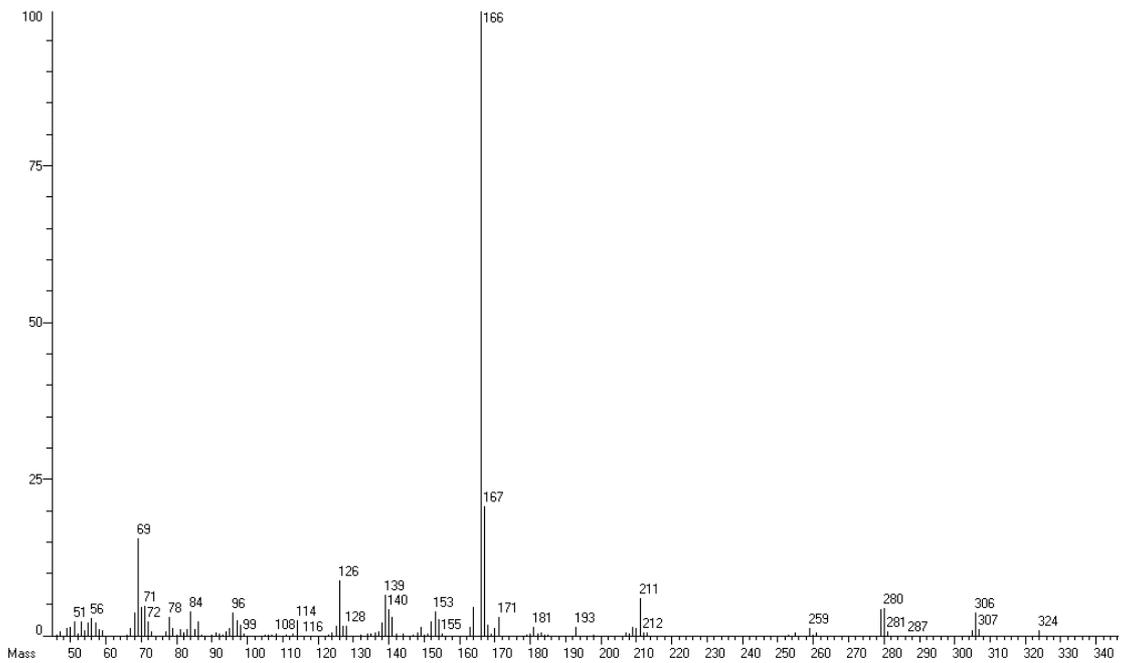
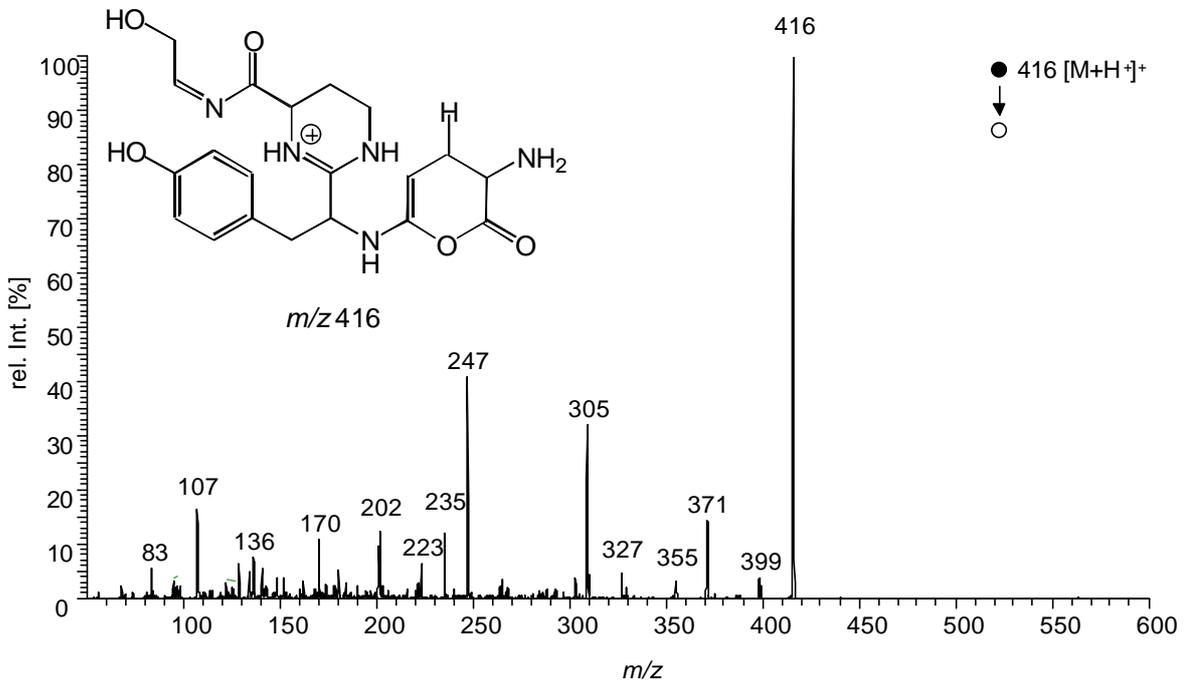
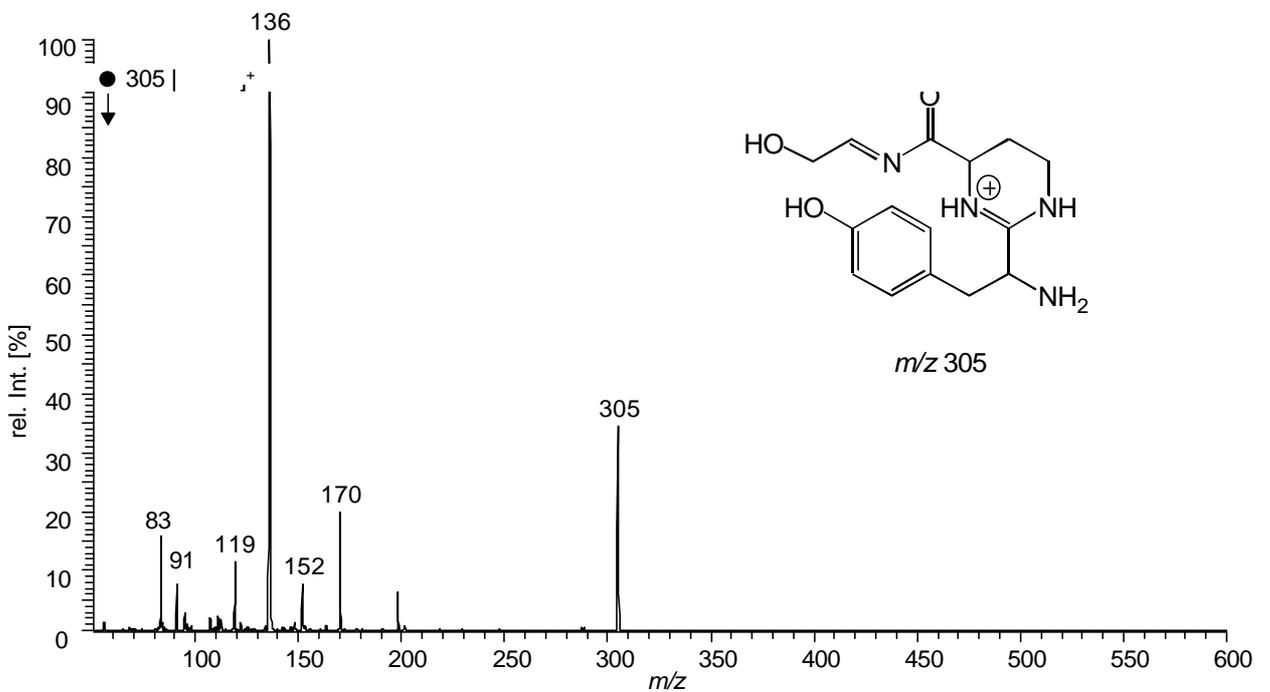
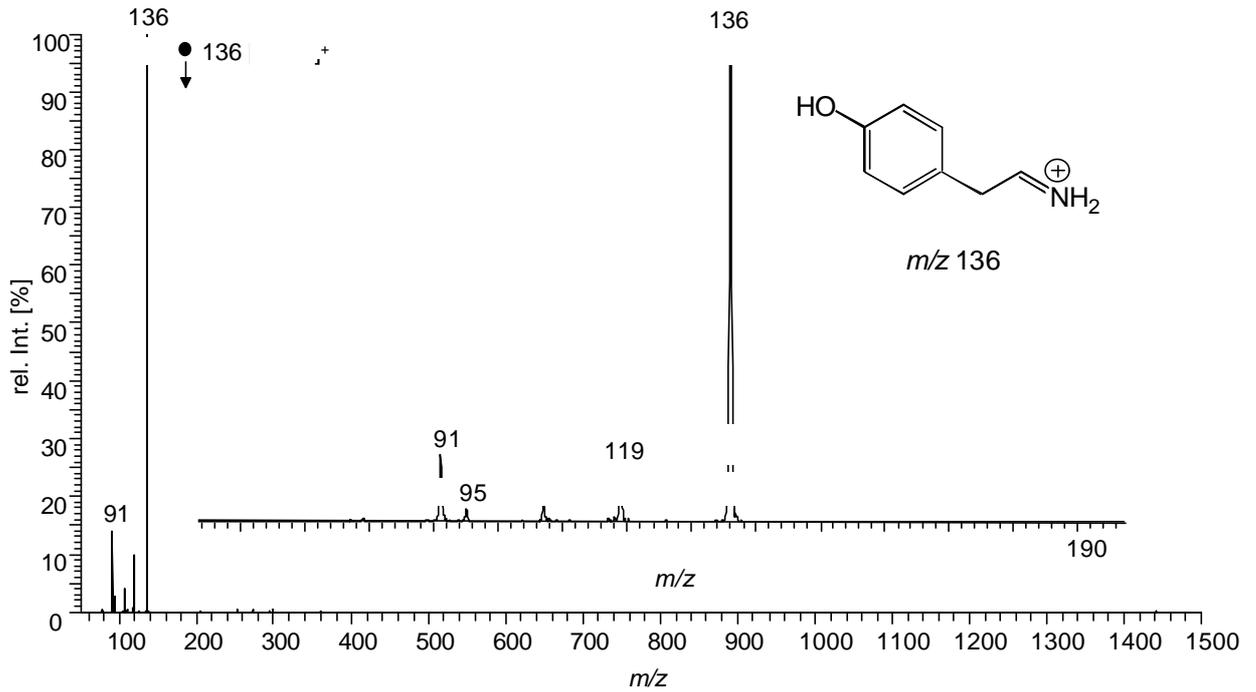
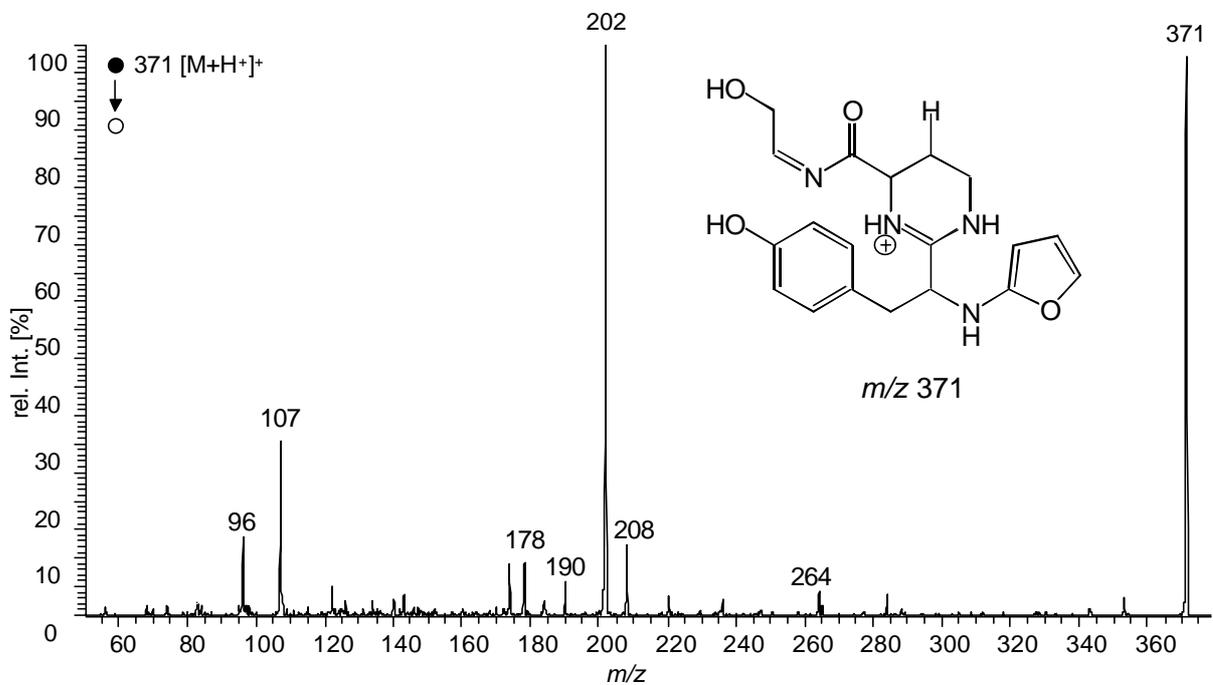


Abb. A-4 Massenspektrum des TAP-derivatisierten Ornithins

12.2 In source-CID-Oktapol-ESI-Massenspektren

Abb. A-5 In source-CID-Oktapol-Spektrum des Ferribactins G173 (aus $A_1^{\circ} = 416$)Abb. A-6 In source-CID-Oktapol-Spektrum des Ferribactins G173 (aus A_1° -Sk = 305)

Abb. A-7 In source-CID-Oktapol-Spektrum des Ferribactins G173 (aus m/z = 136)Abb. A-8 In source-CID-Oktapol-Spektrum des Ferribactins G173 (aus m/z = 371)

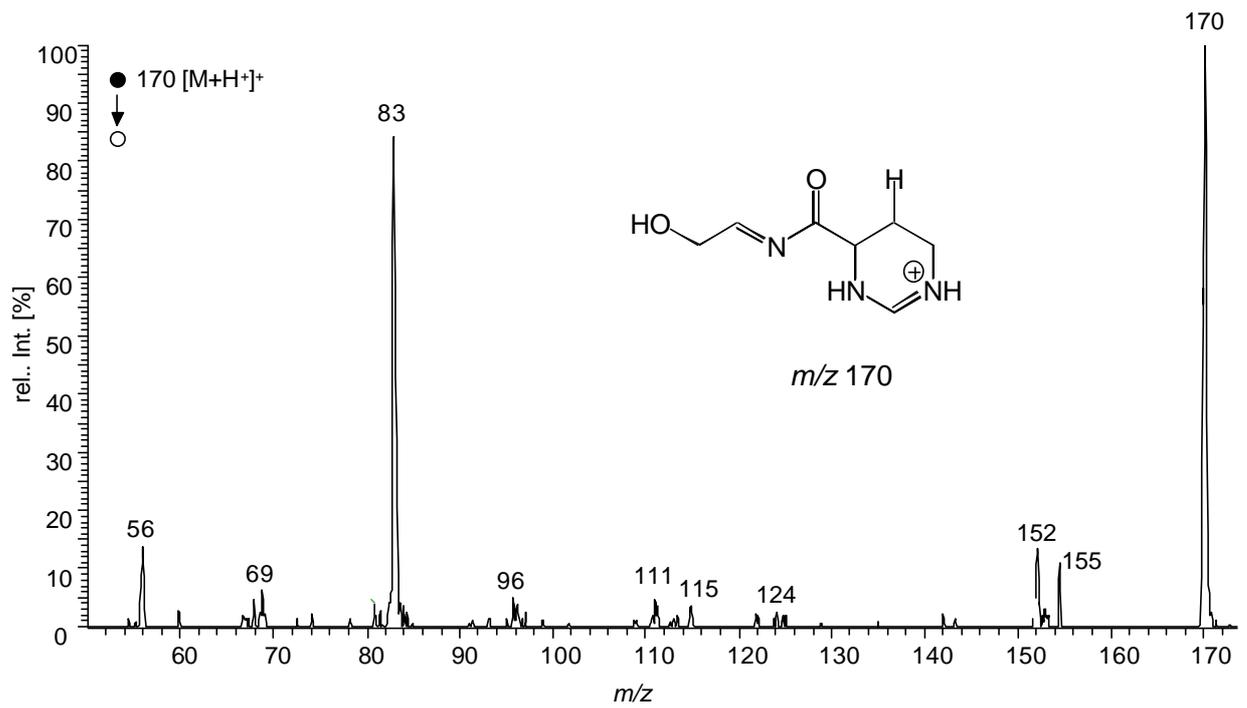
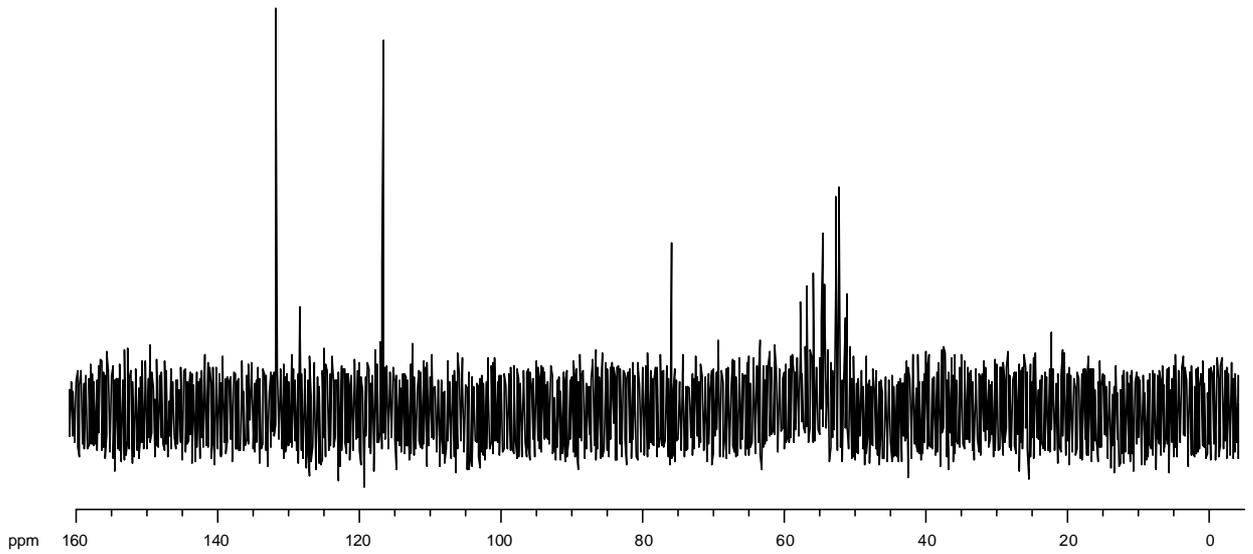
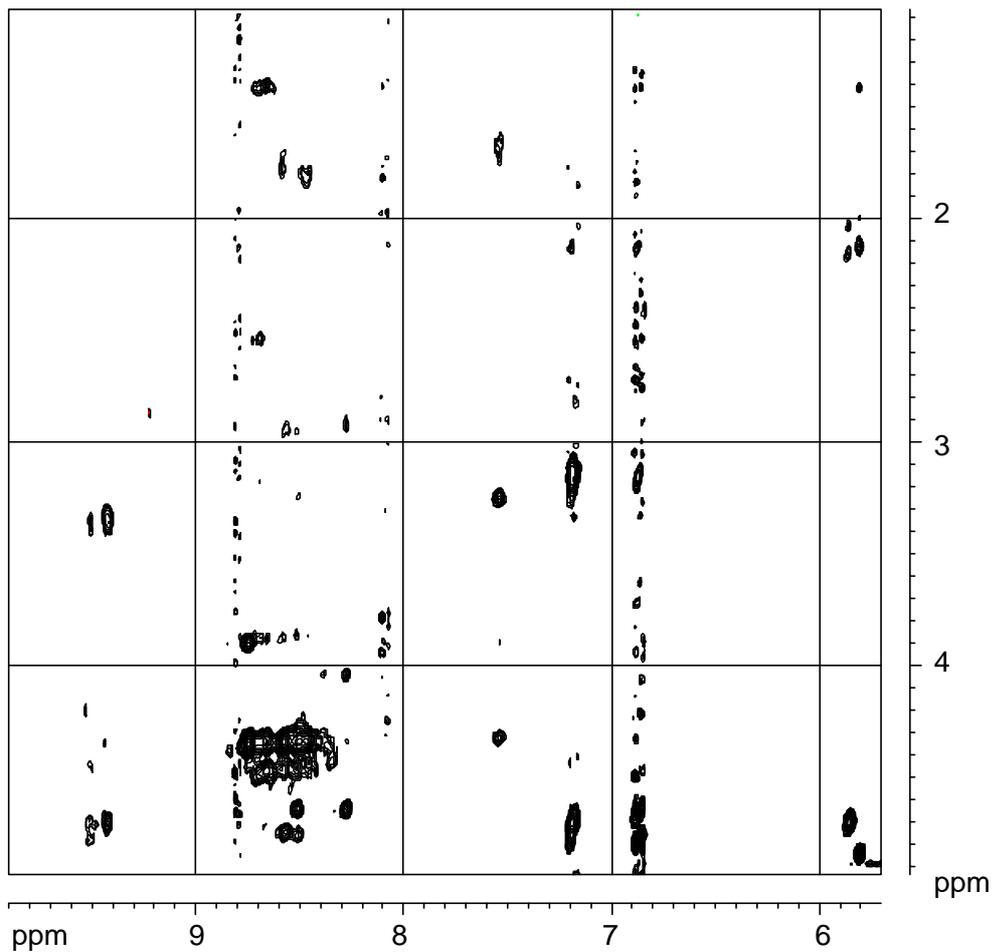


Abb. A-9 In source-CID-Oktapol-Spektrum des Ferribactins G173 (aus *m/z* = 170)

12.3 NMR-Spektren

Abb.A-10 ^{13}C -DEPT₁₃₅-Spektrum von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)Abb. A-11 Ausschnitt aus dem 2D-ROESY von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

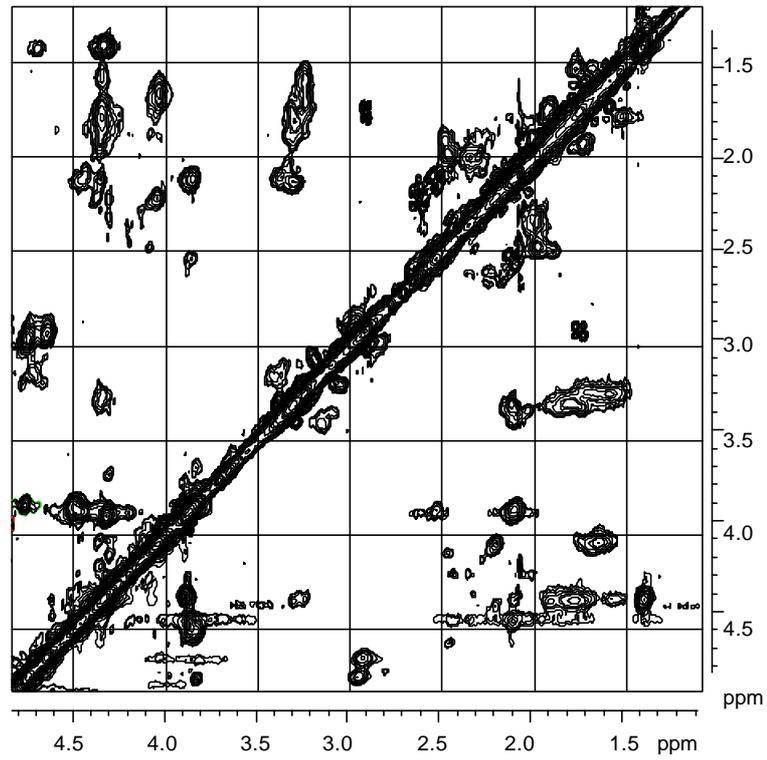


Abb. A-12 Ausschnitt aus dem 2D-ROESY von Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

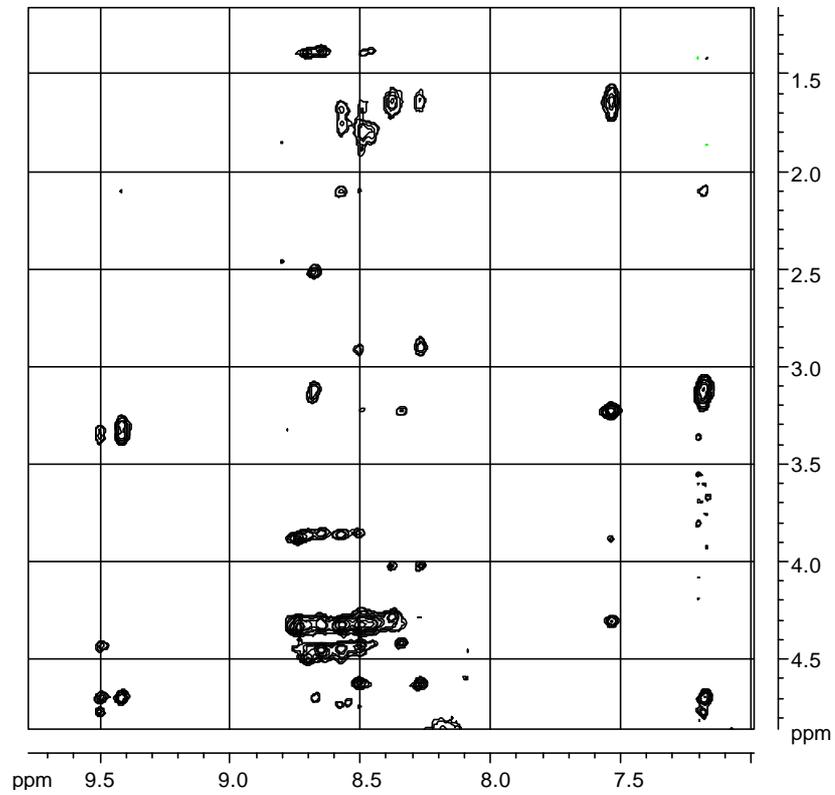


Abb. A-13 Ausschnitt aus dem 2D-NOESY von Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

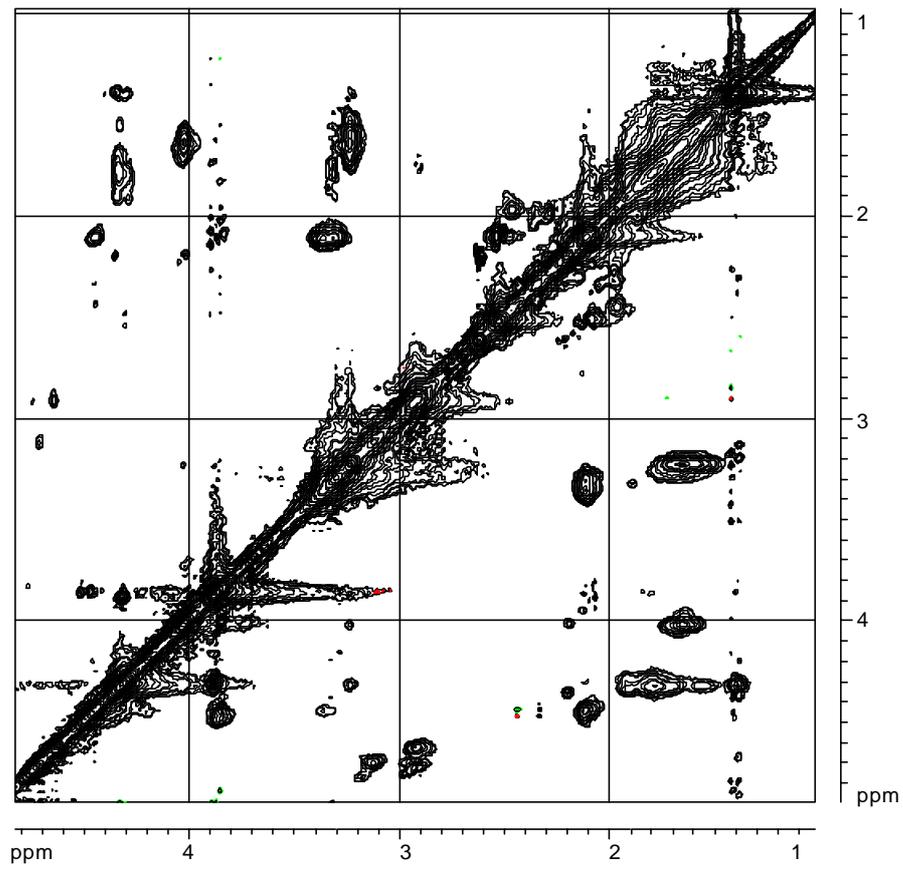
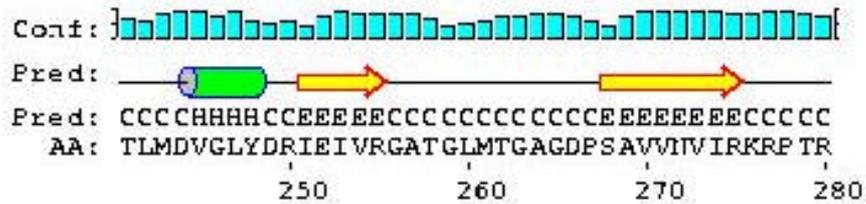
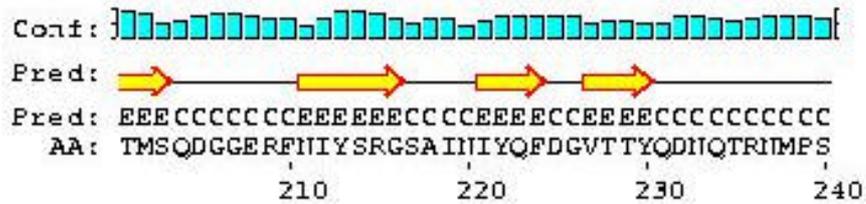
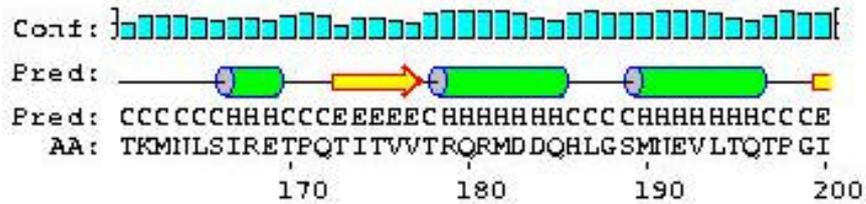
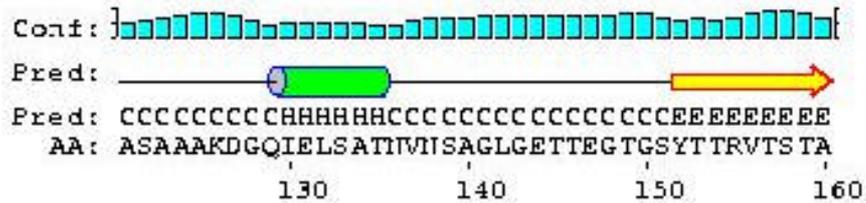
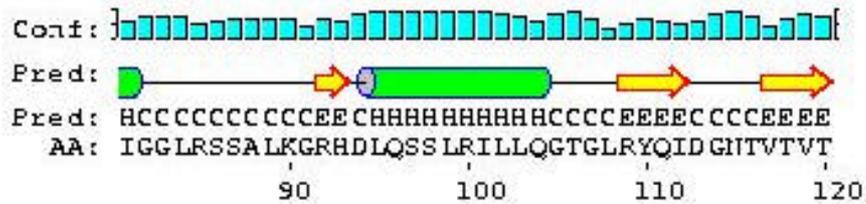
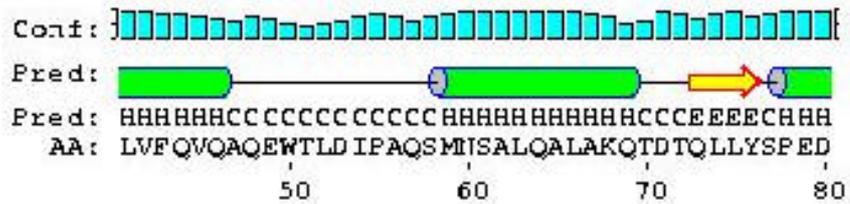
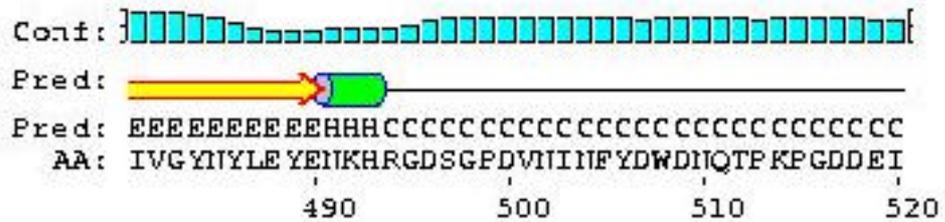
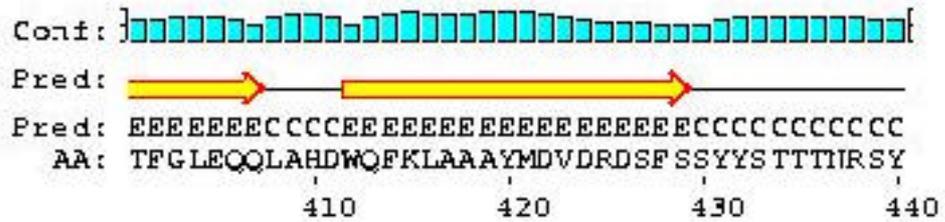
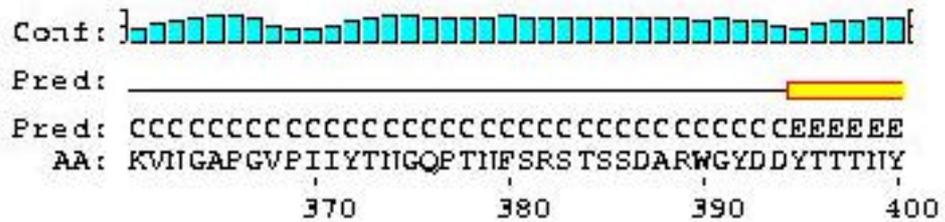
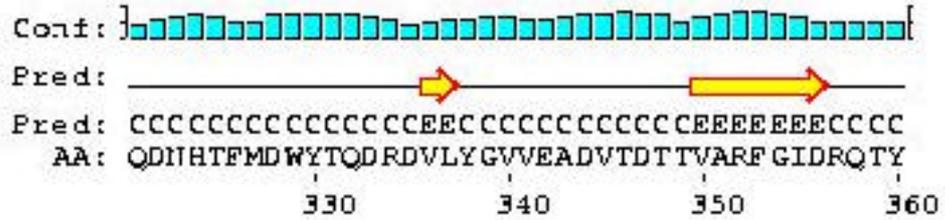
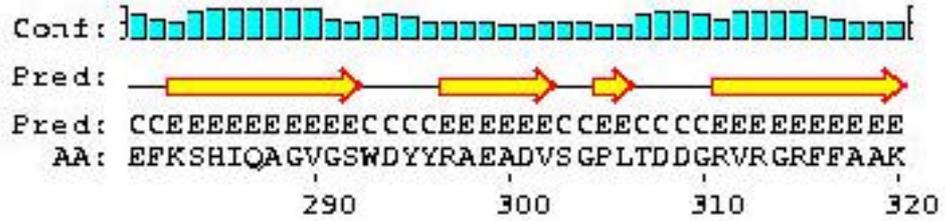


Abb. A-14 Ausschnitt aus dem 2D-NOESY von Ferribactin G173 in H₂O/D₂O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)

12.4 Predict Protein-Ergebnisse

12.4.1 *Pseudomonas putida* WCS358





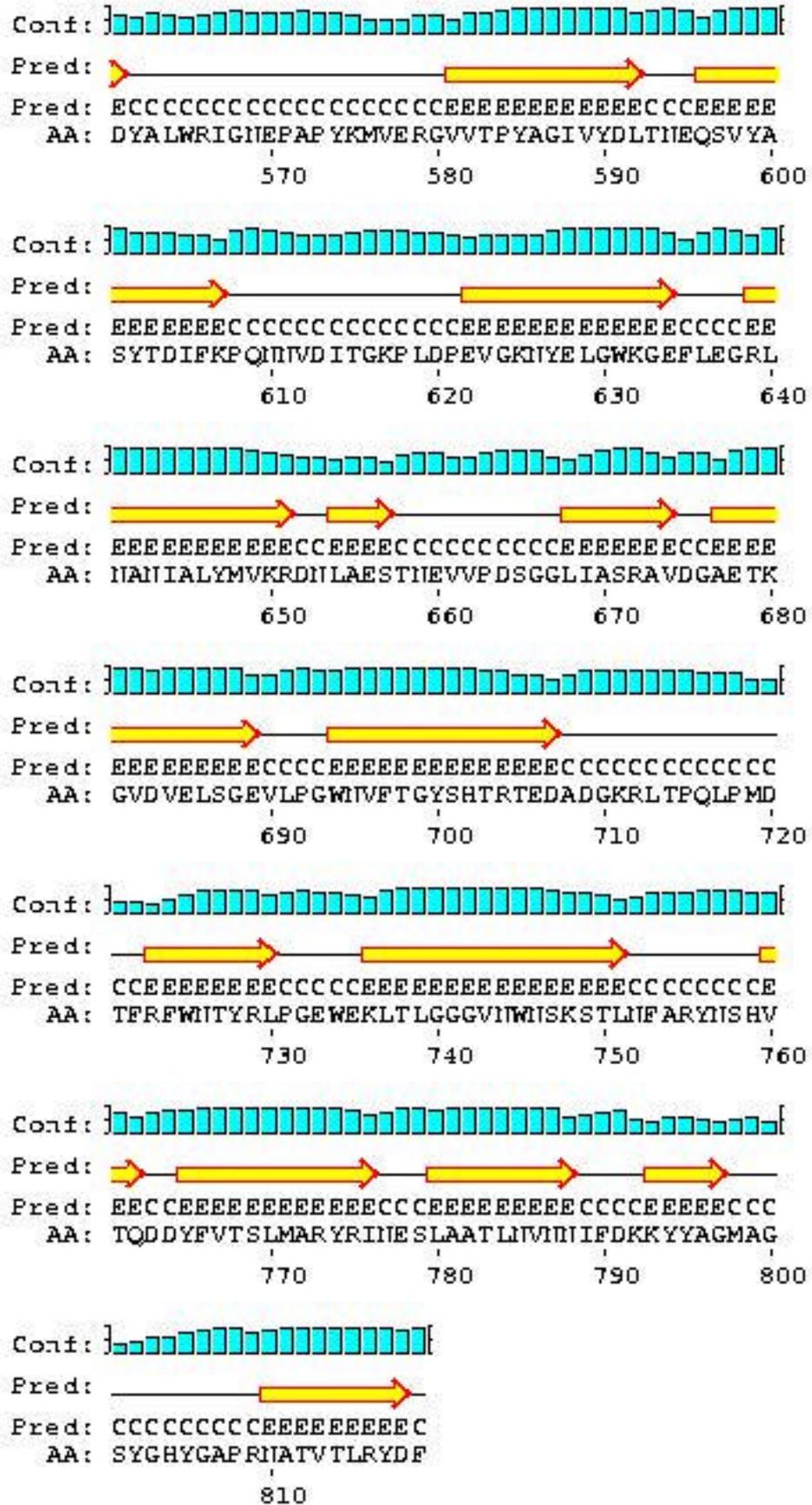
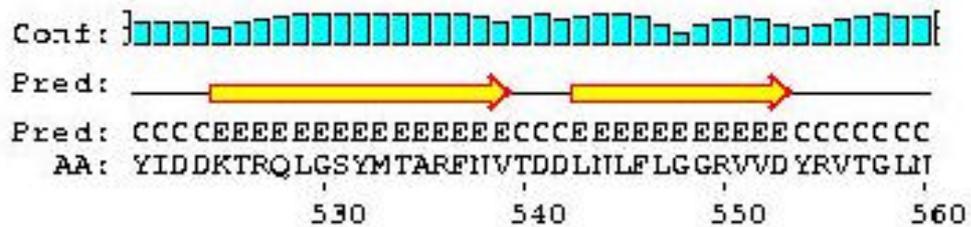
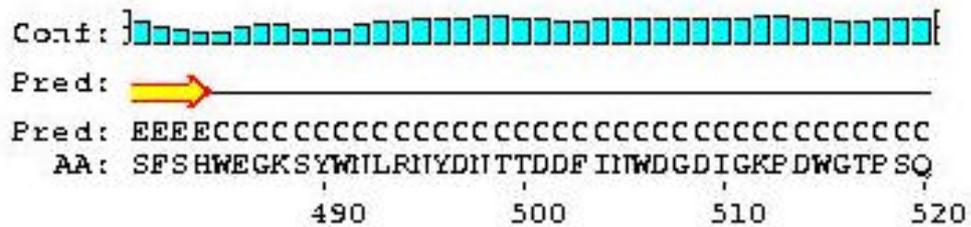
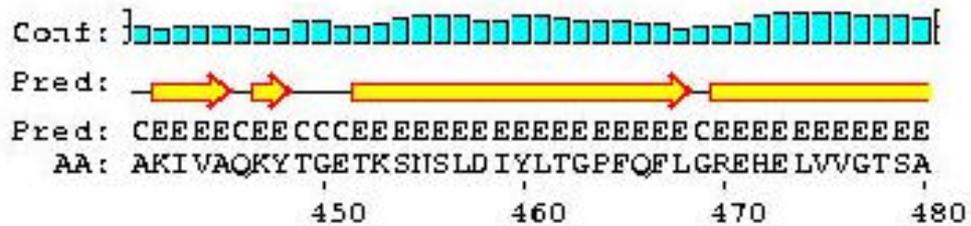
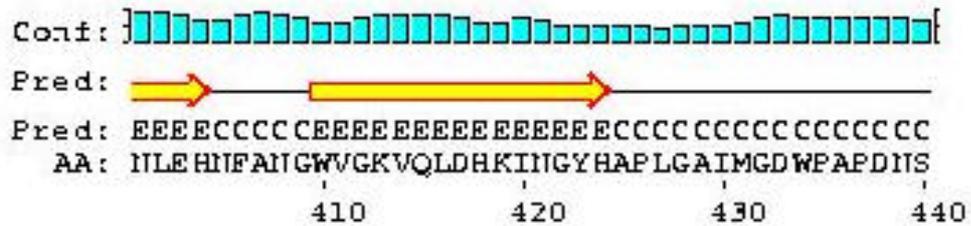
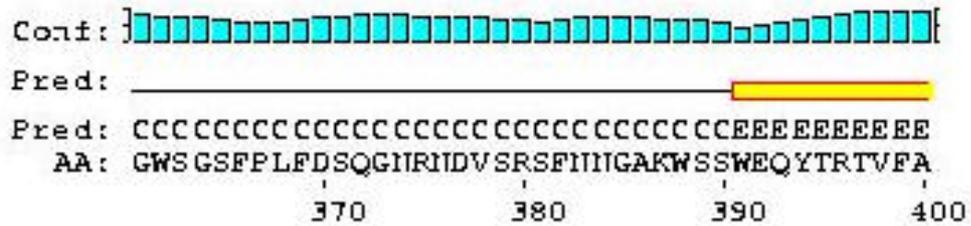
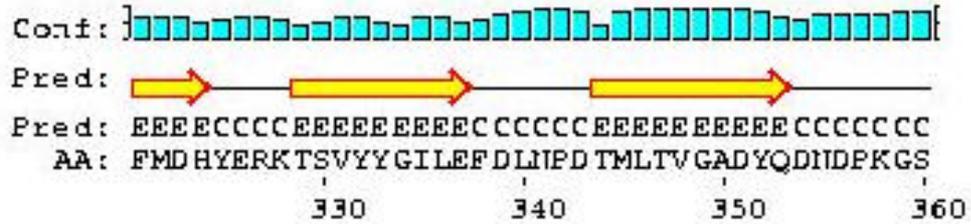
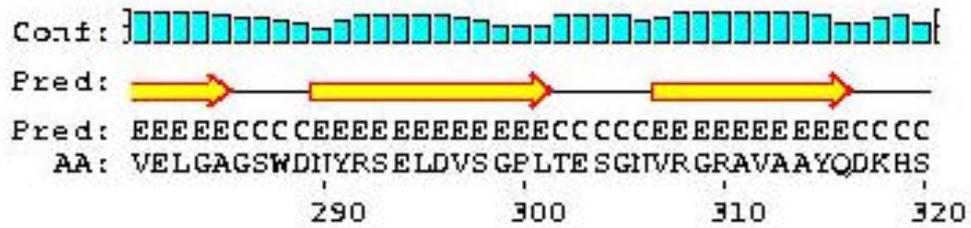
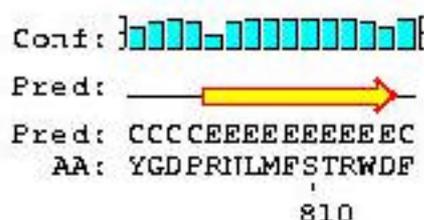
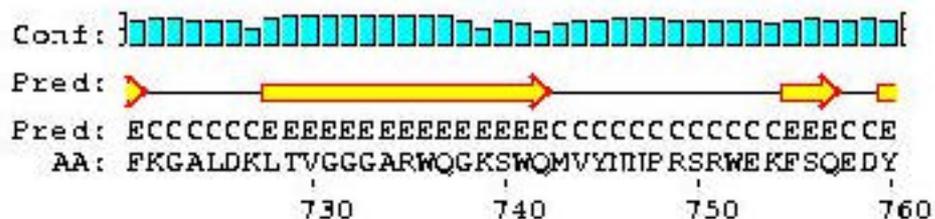
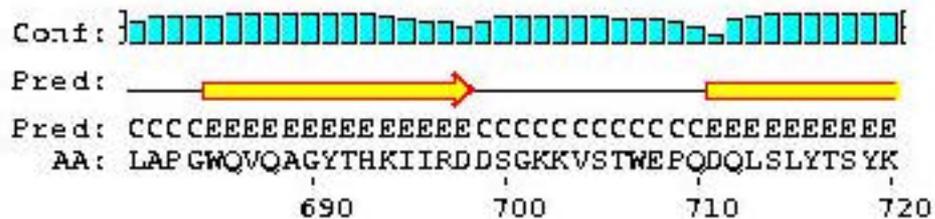
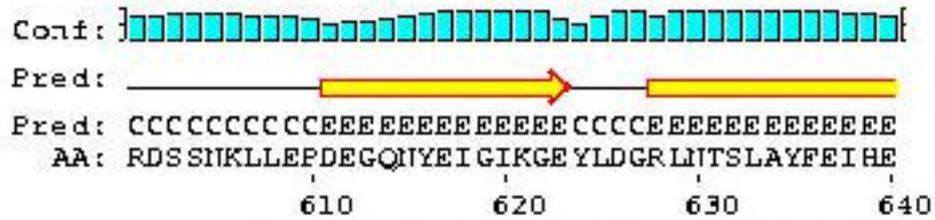
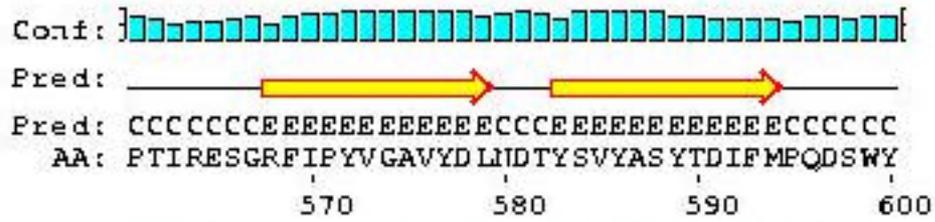


Abb. A-15 Predict-Protein Ergebnis für *Pseudomonas putida* WCS358





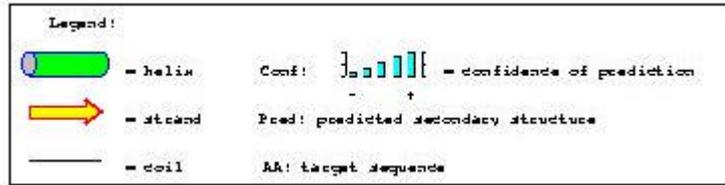


Abb. A-16 Predict-Protein-Ergebnis für *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung

Abb. 1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Abb. 1.2	Beispiel für den Transport von Fe ⁺³ in eine Zelle mit Hilfe eines Siderophores.....	2
Abb. 1.3	Beispiele für Hydroxamat- und Catechol-Siderophore.....	3
Abb. 1.4	Ferrichrom.....	3
Abb. 1.5	Enterobactin.....	4
Abb. 1.6	Rhizobactin und Pyochelin.....	4
Abb. 1.7	Pyoverdin aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> BTP2.....	4
Abb. 1.8	Schematische Darstellung eines Pyoverdins.....	5
Abb. 1.9	Zwischenprodukten bei der Biosynthese von Pyoverdinen.....	6
Abb. 1.10	Isopyoverdin und 5,6-Dihydroisopyoverdin-7-sulfonsäure.....	6
Abb. 1.11	Azotobactin.....	7
Abb. 1.12	Succinopyoverdin.....	7
Abb. 1.13	Eisentransport in Gram-negativen Bakterien.....	8
Abb. 1.14	Lipiddoppelschicht.....	9
Abb. 1.15	Struktur des Siderophorrezeptorproteins FepA aus <i>E. coli</i>	10
Abb. 1.16	Bindung von Ferrichrom an den FhuA-Rezeptor von <i>E. coli</i>	10

2 Aufgabenstellung

Abb. 2.1	Massenspektrometrisch ermittelter Strukturvorschlag für das Pyoverdin G173.....	11
Abb. 2.2	Struktur des Pyoverdins aus <i>Pseudomonas putida</i> WCS358.....	11
Abb. 2.3	Struktur des Pyoverdins aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	11

3 Siderophore von *Pseudomonas fluorescens* G173

Abb. 3.1	Isolierung der Siderophore aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> G173.....	16
Abb. 3.2	UV/Vis-Spektrum des Pyoverdins G173 in Phosphatpuffer, pH 4,5.....	17
Abb. 3.3	UV/Vis-Spektrum des Ferribactins G173 in Phosphatpuffer, pH 4,5.....	17
Abb. 3.4	Gaschromatogramm des TAP-derivatisierten Totalhydrolysats des Pyoverdins G173.....	18

4 Massenspektrometrische Untersuchungen

Abb. 4.1	Bildung des Taylor-Conus.....	19
Abb. 4.2	Skizze einer ESI-Quelle.....	20
Abb. 4.3	Schematische Aufbau des Massenspektrometers MAT900ST.....	21

Abb. 4.4	Nomenklatur der Peptidfragmentierungen.....	22
Abb. 4.5	B- und Y''-Ionen eines cyclischen Peptides.....	22
Abb. 4.6	Bildung der B- und Y''-Ionen.....	23
Abb. 4.7	PI-ESI-MS Spektrum des XAD-Extrakts aus <i>P. fluorescens</i> G173.....	24
Abb. 4.8	Mögliche Fragmentierungsabfolge der Aminosäure Acetylhydroxyornithin.....	25
Abb. 4.9	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektren der Pyoverdine SUCA-G173 (<i>m/z</i> 588,3) und MALA-G173 (<i>m/z</i> 596,3)	26
Abb. 4.10	Fragmentierung des Pyoverdinschromophors.....	27
Abb. 4.11	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 551,7$	28
Abb. 4.12	Fragmentierung des Azotobactinschromophors.....	28
Abb. 4.13	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 579,8$	29
Abb. 4.14	Fragmentierung des Succinopyoverdinchromophors.....	30
Abb. 4.15	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 597,4$	31
Abb. 4.16	Mögliche Fragmentierungsabfolge des Ferribactinchromophors.....	32
Abb. 4.17	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 588,4$	33
Abb. 4.18	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 596,3$	34
Abb. 4.19	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 551,8$	35
Abb. 4.20	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 579,8$	36
Abb. 4.21	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 597,4$	37
Abb. 4.22	Mögliche Mechanismus der Umacetylierung des Acetylhydroxyornithins.....	38
Abb. 4.23	Vorschlag für den Verlust von Keten aus Acetylhydroxyornithin.....	38
Abb. 4.24	PI-ESI-MS-Spektrum des XAD-Extrakts aus <i>P. fluorescens</i> Koeln-G173.....	40
Abb. 4.25	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 605,3$	42
Abb. 4.26	Ion Trap-CID-MS ³ -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M-Sk+2H^+]^{2+} = 605,3/532,8$	43
Abb. 4.27	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 605,4$	44

Abb. 4.28	Vorgeschlagene Seitenkette für das Ferribactin der Masse 1208 u.....	44
Abb. 4.29	Mögliche Fragmentierungsabfolge für den Ferribactinchromophor mit einer α -Hydroxyamingleutaminsäureseitenkette.....	45
Abb. 4.30	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 618,3$	47
Abb. 4.31	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 618,3$	48
Abb. 4.32	Vorgeschlagene Seitenkette für das Ferribactin der Masse 1234 u.....	48
Abb. 4.33	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des einfach geladenen Quasi- molekülions $[M+H^+]^+ = 1251,7$	49
Abb. 4.34	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des einfach geladenen Quasi- molekülions $[M+H^+]^+ = 1251,7$	50
Abb. 4.35	Vorgeschlagene Seitenkette für das Ferribactin der Masse 1251 u.....	51
Abb. 4.36	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 532,8$	51
Abb. 4.37	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 604,3$	53
Abb. 4.38	Asparaginsäure, veresterte Asparaginsäure und Glutaminsäure.....	53
Abb. 4.39	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 604,3$	54
Abb. 4.40	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$	55
Abb. 4.41	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 612,4$	56
Abb. 4.42	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 625,3$	57
Abb. 4.43	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 625,3$	58
Abb. 4.44	Ion Trap-Oktapol-CID-Spektrum des einfach geladenen Quasi- molekülions $[M+H^+]^+ = 1265,7$	59
Abb. 4.45	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des einfach geladenen Quasi- molekülions $[M+H^+]^+ = 1265,7$	60
Abb. 4.46	Ion Trap-CID-MS ² -Massenspektrum des doppelt geladenen Quasi- molekülions $[M+2H^+]^{2+} = 539,8$	61
Abb. 4.47	Mögliche Veränderungen an der Seitenkette bei einigen Ferribactinen aus <i>P. fluorescens</i> Koeln-G173.....	62

Abb. 4.48	Mögliche Veränderungen an der Peptidkette bei einigen Ferribactinen aus <i>P. fluorescens</i> Koeln-G173.....	63
-----------	---	----

5 NMR-Untersuchungen

Abb. 5.1	¹ H-NMR-Spektrum (500 MHz) von Pyoverdin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	65
Abb. 5.2	Chromophor der Pyoverdine.....	65
Abb. 5.3	H,H-COSY-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	66
Abb. 5.4	TOCSY-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	67
Abb. 5.5	Ausschnitt aus dem 2D-TOCSY-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	68
Abb. 5.6	¹³ C-NMR-Spektrum (125,8 MHz) von Pyoverdin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	70
Abb. 5.7	Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	71
Abb. 5.8	Ausschnitt aus dem 2D-HMQC-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	72
Abb. 5.9	Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	73
Abb. 5.10	Ausschnitt aus dem 2D-ROESY-Spektrum von PVD G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)	74
Abb. 5.11	ROESY-Cross-peaks (pH 4,3, 298 K) zur Sequenzierung der Peptidkette.....	75
Abb. 5.12	¹ H-NMR-Spektrum (500 MHz) von Ferribactin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)	76
Abb. 5.13	Chromophor der Ferribactine.....	76
Abb. 5.14	Ausschnitt aus dem 2D-TOCSY-Spektrum von Ferribactin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)	77
Abb. 5.15	H,H-COSY-Spektrum von Ferribactin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)	78
Abb. 5.16	¹³ C-NMR-Spektrum (125,8 MHz) von Ferribactin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)	79
Abb. 5.17	Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Ferribactin G173 in H ₂ O/D ₂ O (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K)	80

6 Zusammenfassung

Abb. 6.1	Strukturvorschlag für das Pyoverdin G173 aus	
----------	--	--

	<i>Pseudomonas fluorescens</i> G173.....	81
Abb. 6.2	Chromophore anderer zusammen mit den Pyoverdinen isolierten Siderophore aus <i>P. fluorescens</i> G173.....	81
Abb. 6.3	Vorgeschlagene Seitenketten für die Ferribactine aus <i>P. fluorescens</i> Koeln-G173.....	82
Abb. 6.4	Vorgeschlagene Peptidketteänderungen für die Ferribactine aus <i>P. fluorescens</i> Koeln-G173.....	82
7 Isolierung des IROMPs		
Abb. 7.1	Schematische Darstellung der Isolierung der äußeren Membranen.....	85
Abb. 7.2	Bei der Lowry-Reaktion entstehender Protein-Cu ⁺² -Komplex.....	86
Abb. 7.3	Struktur eines Polyacrylamidgeles.....	87
Abb. 7.4	SDS-Gel der Proteine aus <i>P. fluorescens</i> +KG173 und -KG173.....	88
8 Massenspektrometrische Untersuchungen		
Abb. 8.1	Typische UV-MALDI-Matrix.....	89
Abb. 8.2	Prinzip des MALDI-Prozesses.....	90
Abb. 8.3	Skizze eines TOF-Analysators.....	92
Abb. 8.4	MALDI-MS des IROMPs aus <i>P. fluorescens</i> -G173.....	93
Abb. 8.5	Skizze eines Q-TOF-Analysators.....	96
Abb. 8.6	nanoESI-Q-TOF-Massenspektrum des doppelt geladenen Ions [M+2H ⁺] ²⁺ = 681,25.....	98
Abb. 8.7	nanoESI-Q-TOF-Massenspektrum des einfach geladenen Ions [M+H ⁺] ⁺ = 2815,09.....	100
Abb. 8.8	nanoESI-Q-TOF-Massenspektrum des einfach geladenen Ions [M+H ⁺] ⁺ = 2815,09.....	101
Abb. 8.9	Vergleich des Hämrezeptors aus <i>P. aeruginosa</i> mit den sequenzierten Peptiden.....	102
12 Anhang		
Abb. A-1	EI-Massenspektrum des TAP-derivatisierten Alanins.....	136
Abb. A-2	EI-Massenspektrum der TAP-derivatisierten Asparaginsäure.....	136
Abb. A-3	EI-Massenspektrum des TAP-derivatisierten Serins.....	137
Abb. A-4	EI-Massenspektrum des TAP-derivatisierten Ornithins.....	137
Abb. A-5	In source-CID-Oktapol-spektrum des Ferribactins G173 (aus A ₁ [°] = 416).....	138
Abb. A-6	In source-CID-Oktapol-spektrum des Ferribactins G173 (aus A ₁ [°] -Sk = 305)....	138

Abb. A-7	In source-CID-Oktapol-spektrum des Ferribactins G173 (aus $m/z = 136$).....	139
Abb. A-8	In source-CID-Oktapol-spektrum des Ferribactins G173 (aus $m/z = 371$).....	139
Abb. A-9	In source-CID-Oktapol-spektrum des Ferribactins G173 (aus $m/z = 170$).....	140
Abb.A-10	^{13}C -DEPT $_{135}$ -Spektrum von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	141
Abb. A-11	Ausschnitt aus dem 2D-ROESY von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	141
Abb. A-12	Ausschnitt aus dem 2D-ROESY von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	142
Abb. A-13	Ausschnitt aus dem 2D-NOESY von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	142
Abb. A-14	Ausschnitt aus dem 2D-NOESY von Ferribactin G173 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v:v) (pH 4,3, 298 K).....	143
Abb. A-15	Predict-Protein-Ergebniss für <i>P. putida</i> WCS358.....	144
Abb. A-16	Predict-Protein-Ergebniss für <i>P. putida</i> WCS358.....	147

Dank

Mein besonderer Dank gilt,

- Herrn Professor Dr. Hans-Günther Schmalz für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen, und seine Hilfsbereitschaft bei allen chemischen und nicht-chemischen Fragen
- Herrn P.D. Dr. Taraz für seine Unterstützung während dieser Arbeit
- Herrn Dr. Jean-Marie Meyer für die Überlassung des Bakterienstamms und seine Hilfe "bei der Mutation der Bakterien"
- Herrn Dr. Mathias Schäfer für das gute Arbeitsklima und seine Unterstützung durch Anregungen, Diskussionen und Aufmunterungen
- Frau Dr. Regine Fuchs und Herrn Dr. Christof Lenz für die große Hilfe (und Geduld) bei dem "Anlernen" am MAT900 und HSQ30 und die gute Zusammenarbeit in der Gruppe Massenspektrometrie
- Frau Dr. Sabina Heim für die Aufnahme der nanoESI-QTOF-Spektren
- Herrn Dr. Hans Schmickler, Frau Ingrid Hoven und Frau Kathrin König für die Aufnahme der NMR-Spektren und ihre gute Laune
- Frau Eva Glees, Herrn Rolf Hecker, Frau Inga Bellahn, Herrn Klaus Böllig und Herrn Markus Albertsen für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft bei biochemischen Fragen
- Frau Saskia Zemolka, Herrn Florian Blume und Herrn Florian Dehmel für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die grammatikalischen Erklärungen
- Herrn Benigno Megido Almaraz für seine Hilfe bei der Formatierung der Arbeit und die Lösung "Microsoft-spezifischer" Problemen
- Allen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Organische Chemie und des Instituts für Biochemie für das kollegiale Arbeitsklima

Deutsche Zusammenfassung

In Rahmen dieser Arbeit wurde das Eisentransportsystem von *Pseudomonas fluorescens* G173 untersucht.

Pseudomonaden produzieren unter Eisenmangelbedingungen niedermolekulare, wasserlösliche Verbindungen, um Eisen gezielt aufzunehmen. Diese Verbindungen werden von einem Rezeptorprotein spezifisch erkannt und in die Zelle eintransportiert.

Mittels massenspektrometrischen sowie NMR-Untersuchungen und chirale Gaschromatographie konnte die Struktur mehrere Siderophore dieses Bakterienstamms aufgeklärt werden.

Unter Eisenmangelbedingungen konnte ein IROMP isoliert werden. Dieses Protein wurde nach einem tryptischen Verdau massenspektrometrisch untersucht. Mit den so sequenzierten Peptide wurde eine Databanksuche durchgeführt, welche die Identifizierung des Proteins wie ein IROMP erlaubte.

Abstract

The structures of the pyoverdins and ferribactins from *Pseudomonas fluorescens* G173 were determined by GC/MS, NMR and ESI-MS (ESI-MSⁿ).

Furthermore, an Iron Outer Membrane Receptor (IROMP) could be isolated from an outer membrane preparation by SDS-PAGE. The protein was in-gel digested with trypsin and analyzed by MALDI-MS and nanoESI-Q-TOF-MS. The data bank research with the sequenced amino acids shows the high similarity between the isolated IROMP and the heme receptor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H. Budzikiewicz betreut worden.

Diana Uría Fernández
Köln, den 20.02.02

Teilpublikationen: keine

Lebenslauf

Name	Diana Uría Fernández
Geburtsdatum	20.01.1974
Geburtsort	Pola de Laviana, Asturias, Spanien
Familienstand	Verheiratet mit Benigno Megido Almaraz
Eltern	Arturo Uría Pertierra Diana Fernández Arrieta
Bildungsweg:	
09/1980-06/1989	Colegio "Beata Imelda", La Felguera, Spanien Educación General Básica (Grundschule)
10/1989-07/1992	Instituto "Jerónimo Gonzalez", Sama de Langreo, Spanien Bachillerato Universal Polivalente (Gymnasium)
10/1992-06/1998	Studium der Chemie an der Universität von Oviedo (Facultad de Químicas, Universidad de Oviedo) Abschluß: Licenciada en Ciencias Químicas Wahlfach: Analytische Chemie
07/1998-01/1999	"Leonardo da Vinci" Stipendium DyStar, Leverkusen
01/1999-03/1999	Vorbereitung auf die "Prüfung zum Nachweis deutscher Sprach- kenntnisse für ausländische Studienbewerber", Universität zu Köln
01/1999-07/1999	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H. Budzikiewicz
09/1999-03/2002	Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. H. Budzikiewicz
seit 06/1999	Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln.