

Sequenzvariationen an einem antibiotisch wirksamen Tripeptid

Sequence Variation on an Antibiotically Active Tripeptide

K. Eisele

Physiologisch-chemisches Institut, Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. 30 c, 541—543 [1975]; eingegangen am 11. Februar/3. April 1975)

Antibiotics, Sequence Variation, Peptide Synthesis

Seven tripeptides with the sequence L-Arg-D,L-X-L-Phe were synthesised. Three of these peptides showed antibacterial activity on fungi. The amino- and the carboxylic terminus of the peptide L-Arg-D,L-Phe-L-Phe, which showed antibacterial activity, were changed to give the sequences L-X-D,L-Phe-L-Phe or L-Arg-D,L-Phe-L-X respectively. The resulting tripeptides showed no antibacterial activity.

Ein antibiotisch wirksames Peptid der Sequenz L-Arg-D-a Thr-L-Phe wurde von Löffler *et al.*¹ aus dem Kulturmedium des Dermatophyten *Keratinophyton terreum* isoliert und strukturell aufgeklärt. Zum Beweis der gefundenen Aminosäuresequenz synthetisierten diese Autoren das Peptid, allerdings unter Verwendung des racemischen D,L-*allo*-Threonins.

Die biologischen Messungen mit diesem synthetischen Produkt zeigten, daß dieses immer noch die

Hälfte von der antibiotischen Aktivität erbrachte, die das natürliche Peptid (mit D-*allo*-Threonin) zeigte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß D-*allo*-Threonin in der obigen Sequenz auch durch andere D-Aminosäuren ersetzt werden kann².

Diese Befunde gaben den Anlaß zur Synthese von Tripeptiden mit obiger Sequenz, bei denen D-*allo*-Threonin durch andere atypische, racemische Aminosäuren ersetzt ist.

Weitere Variationen am Amino- bzw. Carboxylende eines aktiven Tripeptides sollten Aufschluß über die Ersetzbarkeit von L-Arginin bzw. L-Phenylalanin in diesen Peptiden geben.

Experimentelles

Die Peptidsynthesen wurden anhand der Merrifield-Synthesetechnik durchgeführt. Die Reinigung der Peptide erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel bei 4 °C. Das Laufmittel war *n*-Butanol: H₂O:Eisessig = 4:2:1.

Die t-BOC-Aminosäuren wurden nach Schnabel³ hergestellt. Die racemischen Phenylserinderivate wurden analog l. c.⁴ dargestellt. N-ε-Z-L-Lysin siehe l. c.⁵, O-BZL-L-Tyrosin siehe l. c.⁶, L-Glutaminsäure-γ-benzylester siehe l. c.⁷, L-Asparaginsäure-β-benzylester siehe l. c.⁸ und das Z₃-L-Arginin siehe l. c.⁹. Die Aktivitätsmessungen wurden an den von Löffler *et al.*¹ verwendeten Testorganismen (*Paccilo-*

Tab. I. Analytische Daten der Peptide (dabei wird die vorhergehende Reihenfolge der Peptide 1—7 eingehalten).

No. d. Pept.	Ausb. * [%]	gefällt aus	N [%]	Aminosäure-Analyse	Formel *	Molekulargewicht
1	86,0	EtOH/Äther	ber. 15,30 gef. 15,22	Arg 1,01 Phe 2,00	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₄ × HBr	549,5
2	87,0	EtOH/Äther	ber. 14,40 gef. 14,29	Arg 0,97 Phe — §	C ₂₄ H ₃₁ N ₆ O ₄ Cl × HBr	583,9
3	82,6	EtOH/Äther	ber. 14,81 gef. 14,69	Arg 0,99 Phe — §	C ₂₄ H ₃₁ N ₆ O ₄ F × HBr	567,5
4	83,7	EtOH/Äther	ber. 14,86 gef. 14,70	Arg 0,98 tPse — Phe 1,00	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₅ × HBr	565,5
5	87,2	EtOH/Äther	ber. 14,40 gef. 14,23	Arg 0,96 Phe 1,00	C ₂₄ H ₃₁ N ₆ O ₅ F × HBr	583,5
6	86,5	EtOH/Äther	ber. 14,01 gef. 13,94	Arg 1,06 Phe 1,00	C ₂₄ H ₃₁ N ₆ O ₅ Cl × HBr	599,9

Dieses Peptid konnte nicht rein erhalten werden, da bei der hydrogenolytischen Abspaltung der Z-Reste ein großer Teil der Nitrogruppe reduziert wurde.

* Siehe Tab. II unter Anmerkung §.

* Ausbeuten sind auf die erste Aminosäure am Trägerharz bezogen.

§ Die atypischen Aminosäuren wurden nicht bestimmt, da sich deren Peaks im Chromatogramm des Aminosäure-Analysators teilweise mit dem des Phenylalanins überlagerten.

Tab. II. Analytische Daten der Peptide (dabei wird die vorhergehende Reihenfolge der Peptide 1–7 eingehalten).

No. d. Pept.	Ausb. * [%]	gefällt aus	N [%]	Aminosäure-Analyse	Formel	Molekulargewicht
1	86,5	EtOH/Äther	ber. 17,75 gef. 17,60	Arg 1,02 Phe 0,98 § Ala 1,00	$C_{18}H_{28}N_6O_4$ $\times HBr$	473,4
2	82,0	EtOH/Äther	ber. 16,34 gef. 16,26	Arg 1,00 Phe 0,97 § Leu 1,00	$C_{21}H_{34}N_6O_4$ $\times HBr$	514,5
3	83,9	EtOH/Äther	ber. 14,86 gef. 14,72	Arg 1,03 Phe 1,05 § Tyr 1,00	$C_{24}H_{32}N_6O_5$ $\times HBr$	565,5
4	85,7	EtOH/Äther	ber. 9,33 gef. 9,07	Lys 1,00 Phe 2,08	$C_{24}H_{32}N_4O_4$ $\times 2 HBr$	600,4
5	92,1	EtOH/Äther	ber. 10,75 gef. 10,60	Gln 1,00 Phe 1,96	$C_{23}H_{28}N_4O_5$ $\times HBr$	521,4
6	87,7	EtOH/Äther	ber. 8,27	Asp 1,00 Phe 1,94	$C_{22}H_{25}N_3O_6$ $\times HBr$	508,4
7	88,2	EtOH/Äther	ber. 8,04 gef. 7,92	Glu 1,00 Phe 1,97	$C_{23}H_{27}N_3O_6$ $\times HBr$	522,4

* Die Ausbeute ist bezogen auf die erste Aminosäure am Trägerharz.

§ Da bei der Ablösung der Peptide vom Trägerharz mit HBr/Trifluoressigsäure nur die N- α -Z-Gruppe des entstehenden Arginins quantitativ abgespalten wird, müssen die verbleibenden Z-Reste hydrogenolytisch in Äthanol/Wasser abgespalten werden. Aus diesem Grund ist nur ein Hydrobromid an diese Peptide gebunden.

myces varioti, *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*) mit Hilfe des Plattendiffusions-tests¹⁰ auf Komplexmedium (Malzextrakt¹¹) durchgeführt.

Folgende Tripeptide mit variiert Mittelposition wurden synthetisiert und getestet:

1. L-Arg-D,L-Phe-L-Phe,
2. L-Arg-D,L-Phe(4 Cl)-L-Phe,
3. L-Arg-D,L-Phe(3 F)-L-Phe,
4. L-Arg-D,L-tPse-L-Phe,
5. L-Arg-D,L-tPse(4 F)-L-Phe,
6. L-Arg-D,L-tPse(4 Cl)-L-Phe,
7. L-Arg-D,L-tPse(4 NO₂)-L-Phe.

Folgende am Carboxylende variierten Tripeptide wurden synthetisiert:

1. L-Arg-D,L-Phe-L-Ala,
2. L-Arg-D,L-Phe-L-Leu,
3. L-Arg-D,L-Phe-L-Tyr.

Am Aminoende waren folgende Tripeptide variiert:

4. L-Lys-D,L-Phe-L-Phe,
5. L-Gln-D,L-Phe-L-Phe,
6. L-Asp-D,L-Phe-L-Phe,
7. L-Glu-D,L-Phe-L-Phe.

Ergebnisse und Diskussion

Von den sieben synthetisierten Tripeptiden mit variiert Mittelposition waren drei antibiotisch aktiv. L-Arg-D,L-Phe(3 F)-L-Phe und L-Arg-D,L-Phe(4 Cl)-L-Phe waren sowohl bei Fungi (*Paecilomyces varioti* und *Mucor miehei*) als auch bei gram posi-

tiven Bakterien (*Bacillus subtilis*) wirksam, während sich die Aktivität von L-Arg-D,L-Phe-L-Phe nur auf Fungi beschränkte. Unwirksam waren alle Tripeptide, die ein D,L-threo- β -Phenylserin-Derivat als Austauschaminosäure in ihrer Mittelposition hatten.

Die nachfolgenden Testergebnisse enthalten die Werte für *Paecilomyces varioti* und *Bacillus subtilis* (die Meßergebnisse für *Mucor miehei* sind nicht sehr genau, da dieser Organismus ein starkes Luftmycel entwickelt, das die Hemmhöfe teilweise überwuchert). Für die drei aktiven Tripeptide konnten folgende minimale Hemmkonzentrationen ermittelt werden.

Peptid	<i>Paecilomyces</i> var.	<i>Bacillus subt.</i>
L-Arg-D,L-Phe-L-Phe	0,27 mg/ml	—
L-Arg-D,L-Phe(4 Cl)-L-Phe	0,4 mg/ml	1,52 mg/ml
L-Arg-D,L-Phe(3 F)-L-Phe	0,5 mg/ml	1,50 mg/ml

Die Aufhebung der antibiotischen Wirkung gelang in gut meßbarer Form nur auf *Paecilomyces varioti* und nur mit dem Peptid L-Arg-D,L-Phe-L-Phe. Im Kreuztest¹² ergab sich dabei folgendes Verhältnis:

$$L-Arg-D,L-Phe-L-Phe : L-Phe = 1 : 3.$$

Die biologischen Tests der amino- bzw. carboxylendständig variierten Peptide verliefen durchweg negativ.

Vergleicht man die Testergebnisse, die mit dem Peptid L-Arg-D,L-Phe-L-Phe erhalten wurden, mit

denen des Peptids L-Arg-D-Phe-L-Phe (minimale Hemmkonzentration = 0,12 mg/ml und Aufhebungsverhältnis von 1:6), so erkennt man deutlich, daß das Peptid mit racemischem Phenylalanin nur noch die Hälfte der Wirksamkeit von L-Arg-D-Phe-L-Phe besitzt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten überein, die Löffler *et al.*¹ bei ihren Experimenten mit racemischem *allo*-Threonin erhalten haben.

Zur Unwirksamkeit der Tripeptide mit *threo*- β -Phenylserin-Derivaten in Mittelposition kann nur die β -ständige Hydroxylgruppe beigetragen haben, denn sie ist die Gruppe, die die Phenylserinderivate von den wirksamen Phenylalaninderivaten unterscheidet.

Die negativen Ergebnisse, die mit Tripeptiden erhalten wurden, die am Amino- bzw. Carboxylende variiert waren, lassen zwei Deutungen zu:

1. Die beiden Aminosäuren sind für die antibiotische Aktivität essentiell.
2. L-Arg und L-Phe sind zwar nicht für die antibiotische Aktivität, jedoch für die Membrangängigkeit der Peptide essentiell.

Für die erste Interpretation spricht, daß keine der beiden Aminosäuren durch eine andere basische bzw. aromatische Aminosäure ersetzbar ist.

Für die zweite und gegen die erste Deutung der negativen Testergebnisse spricht, daß im Kreuztest immer nur dann die antibiotische Wirkung aufgehoben wurde, wenn man die der mittelständigen, nichtproteinogenen Aminosäure entsprechende L-Aminosäure als Gegenkomponente einsetzte, siehe oben und l.c.². Das heißt, die Wirkung der Tripeptide beruht auf einer kompetitiven Hemmung.

Bei einer kompetitiven Hemmung ist jedoch der Antimetabolit meist strukturell dem Metaboliten ähnlich¹³. Betrachtet man die Tripeptide (Antimetaboliten), so kann man keine strukturelle Ähnlichkeit mit den hemmungsaufhebenden L-Aminosäuren (Metaboliten) feststellen. Nimmt man jedoch an, daß die Tripeptide nach dem Passieren der Pilzmembran sofort gespalten werden, dann findet man in der dadurch freigesetzten, nichtproteinogenen Aminosäure (z.B. D-Aminosäure) sehr wohl einen Antimetaboliten, der der L-Aminosäure, d.h. dem Metaboliten strukturell ähnlich ist und der ein lebenswichtiges Enzym kompetitiv blockieren kann. Wenn man diesen Wirkungsmechanismus annimmt, dann kommt L-Arg und L-Phe eine Hilfsfunktion in Form von Bausteinen für ein Transportvehikel (dem Tripeptid) zu, dem sie allerdings eine solche spezifische Prägung geben, daß sie in dieser Eigenschaft unersetzlich sind. Die Möglichkeit, daß diese beiden Aminosäuren den Tripeptiden eine spezielle hydrophil-lipophil Dipoleigenschaft erteilen, die für die Membrangängigkeit der Peptide wichtig ist, ist nicht von der Hand zu weisen. Dies gilt um so mehr, als sowohl L-Arginin mit seiner stark basischen Guanidinogruppe (pk 12,48), als auch L-Phenylalanin mit dem stark lipophilen Benzolkern zwei Extreme darstellen, die am besten für die Ausbildung eines solchen Dipols geeignet sind.

Eine endgültige Klärung dieser Probleme wird einer nachfolgenden Arbeit vorbehalten sein.

Frau Dr. A. M. Fretzdorff danke ich für die Ausführung aller Analysen. Frau S. Walker danke ich für ihre wertvolle Mitarbeit.

¹ W. A. König, W. Löffler, W. H. Meyer u. R. Uhmman, Chem. Ber. **106**, 816 [1973].

² K. Eisele, *Experientia*, im Druck.

³ E. Schnabel, Ann. Chem. **702**, 188 [1967].

⁴ K. Eisele, Z. Naturforsch. **30 c**, 538 [1975].

⁵ A. Neuberger u. F. Sanger, Biochem. J. **37**, 515 [1943].

⁶ E. Wünsch, G. Fries u. A. Zwick, Chem. Ber. **91**, 542 [1958].

⁷ M. Bergmann u. L. Zervas, Chem. Ber. **65**, 1192 [1932].

⁸ L. Benoiton, Can. J. Chem. **40**, 570 [1962].

⁹ E. Wünsch u. G. Wendelberger, Chem. Ber. **100**, 160 [1967].

¹⁰ H. Zähner, Biologie der Antibiotika, Heidelberger Taschenbücher **5**, p. 22, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965.

¹¹ B. Haller u. W. Löffler, Arch. Mikrobiol. **65**, 181 [1969].

¹² H. Zähner, Biologie der Antibiotika, Heidelberger Taschenbücher **5**, p. 27, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965.

¹³ H. Zähner, Biologie der Antibiotika, Heidelberger Taschenbücher **5**, p. 57, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965.