

Darstellung, Charakterisierung und Konformationsbestimmung eines Undekapeptidhydrazids der N-terminalen Alamethicin-Sequenz

Wilfried Mayr und Günther Jung*)

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen,
Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen

Eingegangen am 28. Januar 1980, in veränderter Form am 17. Mai 1980

Der N-terminale helikale Teil **2** der Alamethicin-Sequenz (**1**) wurde am solubilisierenden Träger Polyoxyethylen aufgebaut. Das N-acetylierte Undekapeptid wurde durch Hydrazinolyse als kristallines Hydrazid **2b** (Ac-Aib-L-Pro-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-L-Gln-Aib-L-Val-Aib-Gly-NHNH₂) abgespalten. Die Ergebnisse der Elementar- und Aminosäureanalysen, sowie das Ergebnis der Gaschromatographie/Massenspektrometrie des veresterten und trifluoracetylierten Partialhydrolysats von **2b** und die Gaschromatogramme der N-Pentafluorpropionylaminosäure-isopropylester an N-Propionyl-L-valin-*tert*-butylamidopolysiloxan als chiraler Phase stimmten mit denen der synthetisierten Sequenz **2b** überein. Ferner gelang die selektive Abspaltung des N-terminalen N-Acetyl-2-methylalanins durch Trifluoracetylolyse der besonders säurelabilen Aib-Pro-Peptidbindung im Modell Ac-Aib-Pro-NH₂ (**6**), im Undekapeptid **2b** und im Alamethicin (**1**). Die helikale Konformation des N-Acetylundekapeptidhydrazids **2b** wurde mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektren über drei unterschiedliche Auswertemethoden sowie mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie bewiesen.

Synthesis, Characterisation and Conformation of an Undecapeptide Hydrazide of the N-Terminal Sequence of Alamethicin

The N-terminal, helical part **2** of the sequence of the polypeptide antibiotic alamethicin (**1**) was synthesized on polyoxyethylene as solubilizing support. The N-acylated undecapeptide was liberated by hydrazinolysis as the crystalline hydrazide **2b** (Ac-Aib-L-Pro-Aib-L-Ala-Aib-L-Ala-L-Gln-Aib-L-Val-Aib-Gly-NHNH₂). The results of elemental and amino acid analysis, gas chromatography/mass spectrometry of the esterified and trifluoroacetylated partial hydrolyzate of **2b**, and gas chromatography of the N-pentafluoropropionylamino acid isopropyl esters on N-propionyl-L-valine-*tert*-butylamidepolysiloxane as a chiral phase were in agreement with the synthesized sequence **2b**. Furthermore, selective removal of the N-terminal N-acetyl-2-methylalanine was accomplished by trifluoroacetylolyse of the particularly acid-labile Aib-Pro peptide bond in the model Ac-Aib-Pro-NH₂ (**6**), in the undecapeptide **2b** and in alamethicin (**1**). The helical conformation of the N-acetylundecapeptide hydrazide **2b** was proven by circular dichroism spectra using three different evaluation methods and by ¹³C-NMR spectroscopy.

Alamethicin (**1**) ist ein von *Trichoderma viride* produziertes amphiphiles N-acetyliertes Polypeptid-Antibiotikum mit acht α -Aminoisobuttersäure-Resten und einem C-terminalen Aminoalkohol^{1,2}. Es verursacht in Lipid-Doppelschichtmembranen eine spannungsabhängige ionische Leitfähigkeit, die sich mit einer Aggregation zu Poren variabler Größe mit diskreten Leitwerten erklären läßt³⁻⁵.

*) Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

- Ac-Aib¹-Pro²-Aib³-Ala⁴-Aib⁵-Ala⁶-Gln⁷-Aib⁸-Val⁹-Aib¹⁰-Gly¹¹-Leu¹²-Aib¹³-Pro¹⁴-
Val¹⁵-Aib¹⁶-Aib¹⁷-Glu¹⁸-Gln¹⁹-Pheol²⁰ **1**
- (Aib = α -Aminoisobuttersäure; Pheol = L-Phenylalaninol)
- Ac-Aib¹-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly¹¹-X **2**
- 2a**: X = OPOE (POE = Polyoxyethylen, Polyethylenglykol), **2b**: X = NHNH₂
- H-Leu¹²-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol²⁰ **3**
- Boc-Pro²-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly¹¹-X **4**
- 4a**: X = OPOE; **4b**: X = OH

Synthesen von Alamethicin-Sequenzen

Frühere Untersuchungen

Erste Versuche der Arbeitsgruppe *Marshall*⁶⁾, Alamethicin (**1**) mit der Merrifield-Technik herzustellen, führten zu Sequenzen ohne Aktivitäten. Spätere Versuche mit konventioneller Fragmentkondensation ergaben ein membranveränderndes chromatographisch reines Produkt, das allerdings keine antibiotische Eigenschaften wie Alamethicin (**1**) zeigte⁶⁾. Mit der Solid-Phase-Methode wurden auch von *Gisin*⁷⁾ verschiedene Fragmente synthetisiert und mit Fluorwasserstoff vom Träger abgespalten. Mit diesen Partialsequenzen wurde durch Kupplungen am Merrifield-Harz die Sequenz **1** synthetisiert. Das trotz der HF-Abspaltungen aufgrund von Elutionsprofilen interessanterweise als homogen beschriebene Produkt war mit Alamethicin (**1**) jedoch ebenfalls nicht völlig identisch⁷⁾.

Durch klassische Fragmentkondensation gelang der Aufbau eines sequenzabgewandelten Nonadekapeptids⁸⁾, das bezüglich der Aggregationseigenschaften, seiner Konformation und der lytischen Aktivität dem natürlichen Alamethicin (**1**) gleicht⁹⁾. Es bildet zwar keine so stabilen Einzelporen bei Leitfähigkeitsmessungen in künstlichen Membranen, zeigt aber eine *spannungsabhängige* Leitfähigkeit wie natives **1** und seine natürlichen Analoga⁹⁾. Für vergleichende ¹³C-NMR-Untersuchungen^{9,10)} wurden Aib-Oligopeptide synthetisiert¹¹⁾. Verschiedene Tri- und Tetrapeptide der N-terminalen Alamethicinsequenz wurden auch zu Konformationsstudien mit der Röntgen-Strukturanalyse herangezogen¹²⁻¹⁶⁾.

Synthese des N-terminalen Undekapeptidhydrazids **2b**

Die Peptidsequenz von Alamethicin (**1**) wurde von uns aus strukturellen wie synthetischen Gesichtspunkten in das N-terminale Fragment Ac-Aib¹-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly¹¹ (**2**) und das C-terminale Fragment Leu¹²-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol²⁰ (**3**) zerlegt. Die Verknüpfungsstelle wurde zwischen Gly¹¹ und Leu¹² gelegt, da mäßige Kupplungsausbeuten bei der Beteiligung von N- wie C-terminalen 2-Methylalanin-Funktionen zu erwarten waren^{8,17,18)}. Der Undekapeptidester Ac-Aib¹-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly¹¹-OPOE (**2a**; POE = Polyoxyethylen) konnte schrittweise nach der Liquid-Phase-Methode¹⁹⁾ synthetisiert werden²⁰⁻²²⁾. Dazu wurde bifunktionelles Polyoxyethylen (POE; mittlere Molmasse 10000) mit *N*-tert-Butyloxycarbonyl-glycin (Boc-Gly) verestert. Zu dem an anderer Stelle^{21,22)} beschriebenen schrittweisen Sequenzaufbau wurden Boc-Aminosäuren mit Dicyclohexylcarbo-

diimid als symmetrische Anhydride oder unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol als Aktivester gekuppelt²²⁾. Der sukzessive Aufbau unter analytischer Überprüfung der einzelnen Reaktionsschritte erlaubte eine genaue Untersuchung der Helixausbildung mittels spektroskopischer Methoden^{20–22)}.

Das Undekapeptid **2** sollte zu Fragmentkuppelungen mit C-terminalen Alamethicinsequenzen verwendet werden. Dazu wurden die im folgenden beschriebenen Abspaltungen vom Polymer-Träger durch Verseifung und durch Hydrazinolyse ausgeführt. Die Identität des durch Hydrazinolyse erhaltenen, chromatographisch gereinigten *N*-Acetylundekapeptidhydrazid **2b** wurde eindeutig bewiesen, seine Konformation mittels Circular dichroismus und ¹³C-NMR-Spektroskopie untersucht.

Vorversuche zur Verseifung eines Dekapeptidpolymeresters Boc-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OPOE (**4a**)²²⁾ zu **4b** waren wenig erfolgreich. Aufarbeitungsversuche durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder Sephadex LH-20, wie auch Extraktionsversuche oder multiplikative Gegenstromverteilung ergaben lediglich peptidhaltige Fraktionen mit Anteilen von Polyoxyethylen oder noch nicht verseiften Peptidpolymerestern²¹⁾.

Durch präparative Dünnschichtchromatographie konnte schließlich das Dekapeptidderivat **4b** weiter gereinigt werden. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse zeigte Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Allerdings wies die Elementaranalyse auf immer noch nicht völlig entfernte Polyoxyethylenanteile hin. Aufgrund der geringen Ausbeute von 7% kam eine präparative Darstellung des Dekapeptidderivats **4b** durch Verseifung jedoch nicht mehr in Frage. Es wurde daher die Hydrazinolyse zur Abspaltung angewandt. Hydrazinolysen ergaben auch bei Secretinfragmenten^{23–25)} eine befriedigende Trennung der Peptide von POE. Bei einem Vorversuch mit Boc-L-Val-Aib-Gly-OPOE konnte das Tripeptid mit Hydrazinhydrat vollständig vom Polymer abgespalten werden²¹⁾.

Die Abspaltung des Undekapeptids **2b** wurde in einer methanolischen Lösung des *N*-acetylierten Undekapeptidpolyoxyethylenesters **2a**²²⁾ mit einem 40fachen Überschuß an Hydrazinhydrat durchgeführt. In geringer Ausbeute konnte nach Verdünnung der Reaktionslösung mit kaltem Wasser eine kristalline Ausfällung erhalten werden, die einen definierten Schmelzpunkt (242–246 °C) aufwies. Mikroskopische Aufnahmen zeigten fächerförmig verwachsene Kristallnadeln.

Dieses Peptidhydrazid war frei von Polyoxyethylen und Peptidpolyoxyethylenester. Zur Isolierung der Hauptmenge an **2b** wurde das Filtrat über Sephadex LH-20 weiter gereinigt. Dabei wird zuerst eine Mischung aus freiem POE-Träger und unverändertem trägergebundenem Peptid-POE-Ester **2a** eluiert. Das darauf folgende Undekapeptidhydrazid **2b** läßt sich nur durch wiederholte Chromatographie POE-frei abtrennen. In der Hauptmenge des isolierten Produkts wurde aufgrund des ¹³C-NMR-Spektrums ein geringer Restgehalt von etwa 3% POE oder Peptid-POE-Ester gefunden. Dieser stört weder bei konformationsanalytischen Untersuchungen noch bei der Verwendung des Fragments zu weiteren Synthesen. Vergleichende chromatographische und analytische Untersuchungen der zuerst auskristallisierten Probe mit der Hauptmenge an **2b** erwiesen die Identität der beiden isolierten Fraktionen.

Eine Aminosäureanalyse der zuerst eluierten Polymerfraktion (POE mit Peptid-POE) ergab, daß ca. 60% des ursprünglichen Peptidgehalts vom Polyoxyethylen abge-

spalten worden waren. Diese Abspaltungsausbeute stimmt mit Beobachtungen anderer Autoren überein²³⁻²⁶.

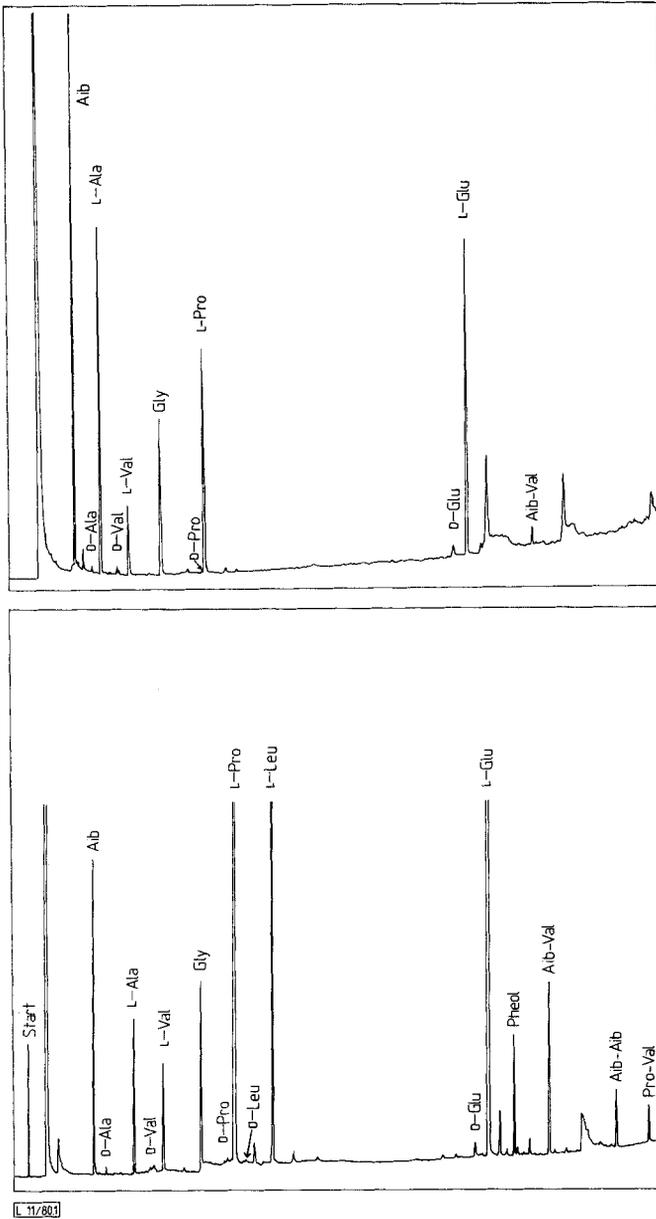


Abbildung 1. Gaschromatogramm von *N*-(Pentafluorpropionyl)aminosäure-isopropylestern eines Hydrolysats von Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NH₂ (**2b**) (oben) und Alamethicin (**1**) (unten)

Glaskapillare (20 m × 0.3 mm) belegt mit *N*-Propionyl-L-valin-*tert*-butylamid-polysiloxan²⁷⁾.

Analytische Untersuchungen

Das erhaltene Undekapeptidhydrazid **2b** wurde durch Elementaranalyse, Aminosäurenanalyse, ^{13}C -NMR-Spektren sowie durch GC/MS-Analysen von Partialhydrolysaten charakterisiert. Ferner wurde das Totalhydrolysat gaschromatographisch an chiraler Phase auf racemische Anteile überprüft. Die Elementaranalyse des abgespaltenen Peptidhydrazids ergab eine gute Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Werten.

Die Werte der Aminosäureanalysen des Undekapeptids **2** zeigten nach Abspaltung geringfügig bessere Stöchiometrie als am Polymer:

	Gly (1)	Aib (5)	Val (1)	Gln (1)	Ala (2)	Pro (1)
Ac-Peptid-POE 2a :	1.18	4.81	1.00	0.91	2.09	0.89
Ac-Peptid-NHNH ₂ 2b :	1.12	5.25	1.00	0.96	2.05	0.90

Zur Racematbestimmung wurde eine Peptidprobe mit 6 N HCl bei 110 °C hydrolysiert, wobei eine kurze Reaktionsdauer (4 h) gewählt wurde, um die hydrolysebedingten Racematanteile möglichst gering zu halten. Das Hydrolysat von **2b** wurde mit 3 N HCl/2-Propanol und Pentafluorpropionsäureanhydrid derivatisiert. Die gaschromatographische Untersuchung auf D-Aminosäureanteile wurde mit einer Glaskapillarsäule, die mit *N*-Propionyl-L-valin-*tert*-butylamid-polysiloxan als chiraler, temperaturstabiler Phase²⁷⁾ belegt war, durchgeführt. Die D-Aminosäureanteile lagen wie beim Vergleich mit dem natürlichen Polypeptidantibiotikum Alamethicin (**1**) unter 1% (Abbildung 1). Die bei höheren R_F -Werten auftretenden Peaks konnten durch GC/MS-Überprüfung als Peptidfragmente identifiziert werden.

Um die Sequenzfolge überprüfen zu können, wurde das Undekapeptidhydrazid **2b** in konz. Salzsäure bei 37 °C während 24 h partiell hydrolysiert. Die Spaltprodukte wurden in die trifluoracetylierten Peptidmethylester^{28,29)} übergeführt. Abbildung 2 zeigt ein typisches Gaschromatogramm mit einer Anzahl von Di-, Tri- und Tetrapeptiden, die anhand ihrer Massenspektren bestimmt wurden.

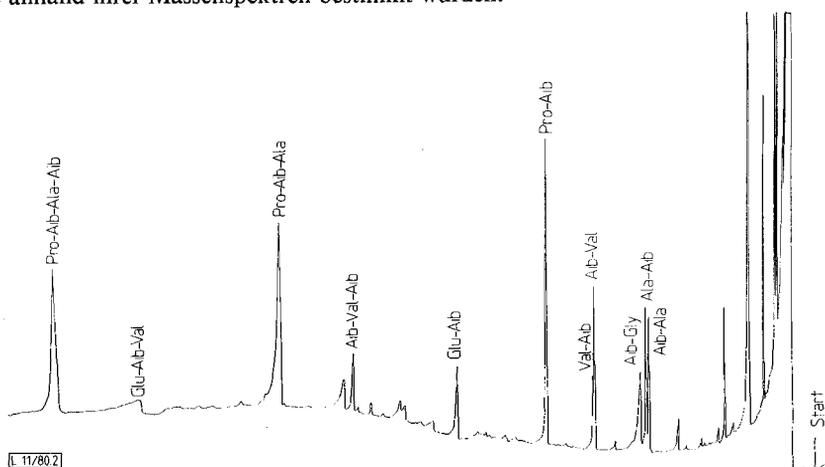


Abbildung 2. GC/MS-Analyse eines veresterten und trifluoracetylierten Partialhydrolysats von Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NHNH₂ (**2b**)

In Abbildung 3 sind am Beispiel des Tetrapeptids **5** die unter chemischer Ionisation und mit Elektronenstoß-Ionisation aufgenommenen Massenspektren wiedergegeben.

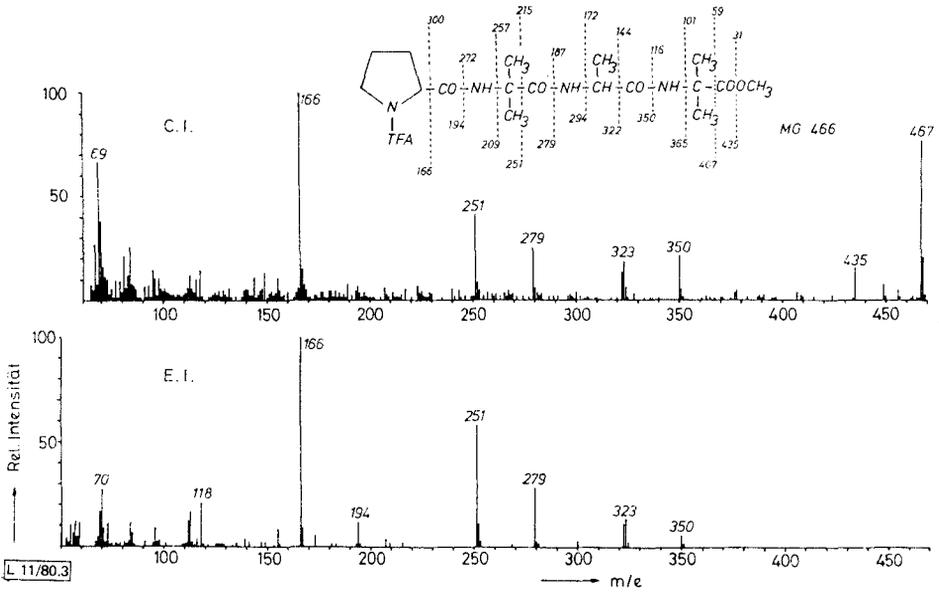


Abbildung 3. Massenspektren von Tfa-Pro-Aib-Ala-Aib-OME (**5**) aus der GC/MS-Analyse des Undekapeptidhydrazids **2b**

C. I. = chemische Ionisation, E. I. = Elektronenstoßionisation.

Aus den Ergebnissen der GC/MS-Untersuchung läßt sich anhand überlappender Fragmente die synthetisierte Sequenz **2** wieder rekonstruieren (Tabelle 1).

Tabelle 1. Peptidfragmente eines Partialhydrolysats des Undekapeptidhydrazids **2b**, bestimmt durch GC/MS-Analyse der *N*-Trifluoracetylpeptid-methylester

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NHNH ₂		(2b)
Pro-Aib-Ala-Aib	Gln-Aib-Val	
Pro-Aib-Ala	Aib-Val-Aib	
Pro-Aib	Val-Aib	
Ala-Aib	Aib-Val	
Aib-Ala	Gln-Aib	Aib-Gly

Es wurden keine Fehlsequenzen entdeckt. Wie schon bei der GC/MS-Analyse von Suzukacillin³⁰⁾ und Trichotoxin A-40^{31,32)} wird keine Überlappung zwischen Aib¹ und Pro² oder zwischen Ala⁶ und Gln⁷ gefunden. Diese besondere Hydrolyseempfindlichkeit der Aib-Pro-Peptidbindung war, wie auch beim Trichotoxin³¹⁻³³⁾, Anlaß zu den folgenden Untersuchungen.

Zur Säurestabilität der α -Aminoisobutyryl-prolin-Bindung

Um die N-Termini des synthetischen Undekapeptids **2b** und des Alamethicins (**1**) vergleichend bestimmen zu können, wurde folgende Beobachtung zunutze gemacht: Unter schwach sauren Hydrolysebedingungen konnten *Payne* und Mitarbeiter¹⁾ stets Fragmente identifizieren, die einen N-terminalen Prolinrest besaßen. Es sollte daher möglich sein, den bei früheren Alamethicin-Sequenzierungen^{1,34)} nicht entdeckten und erstmals von *Martin* und *Williams*²⁾ bei ¹H-NMR-Untersuchungen gefundenen *N*-Acetyl- α -aminoisobuttersäure-Rest gezielt abzuspalten und nachzuweisen.

Das Hydrolyseverhalten der α -Aminoisobutyryl-prolin-Bindung wurde vorwiegend an dem *Modellpeptid* *N*-Acetyl- α -aminoisobutyryl-prolinamid (**6**) untersucht. Die Peptidspaltung mit Trifluoressigsäure³¹⁻³³⁾ und Salzsäure/Eisessig läßt sich dünn-schichtchromatographisch eindeutig verfolgen. Ausgangs- und Endprodukte können durch ihre R_F -Werte und durch ihre verschiedene Anfärbbarkeit mit Sprühreagentien unterschieden werden. Das entstandene Prolinamid kann spezifisch mit Ninhydrin- oder Isatin-Reagens (für endständiges Prolin) sichtbar gemacht werden, während *N*-Acetyl- α -aminoisobutyryl-prolinamid (**6**) bzw. *N*-Acetyl- α -aminoisobuttersäure nur mit Chlor/*o*-Tolidin anfärbbar sind.

Zu quantitativen Bestimmungen wurden bei verschiedenen Zeiten während der Hydrolyse Proben entnommen und ihr Prolinamidgehalt mit Hilfe des Aminosäureanalysators bestimmt (Abbildung 4).

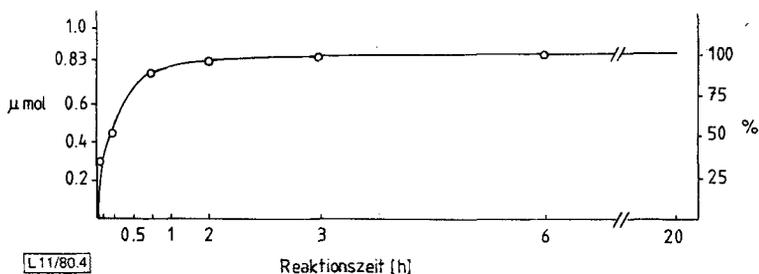


Abbildung 4. Zunahme von Prolinamid (μmol) während der Trifluoracetolyse von *N*-Acetyl- α -aminoisobutyryl-prolinamid (**6**)

Wir beobachteten, daß sich unter sauren Bedingungen der optische Drehwert ändert. In Eisessig wird für *L*-Prolinamid-hydrochlorid der molare Drehwert $[\alpha]_M = -11,2^\circ$ erhalten, für *N*-Acetyl- α -aminoisobutyryl-*L*-prolinamid (**6**) beträgt er $-11,7^\circ$ (Tabelle 2). Die Dipeptidbindung wird in Essigsäure nur langsam hydrolysiert; der Drehwert des Dipeptidamids **6** kann daher bei sofortiger Messung nach dem Auflösen hinreichend genau bestimmt werden. Der Drehwert des Spaltprodukts *L*-Prolinamid-hydrochlorid verändert sich in Salzsäure/Eisessig gegenüber dem in reinem Eisessig nur unwesentlich. Zu Beginn der Messung (3 min nachdem eine essigsäure *N*-Acetyl- α -aminoisobutyryl-*L*-prolinamid-Lösung mit der gleichen Menge 1,2 N HCl in Eisessig vermischt worden war) betrug der molare Drehwert $-6,1^\circ$. Die kontinuierlich registrierte Veränderung von $[\alpha]_M$ zeigt Abbildung 5.

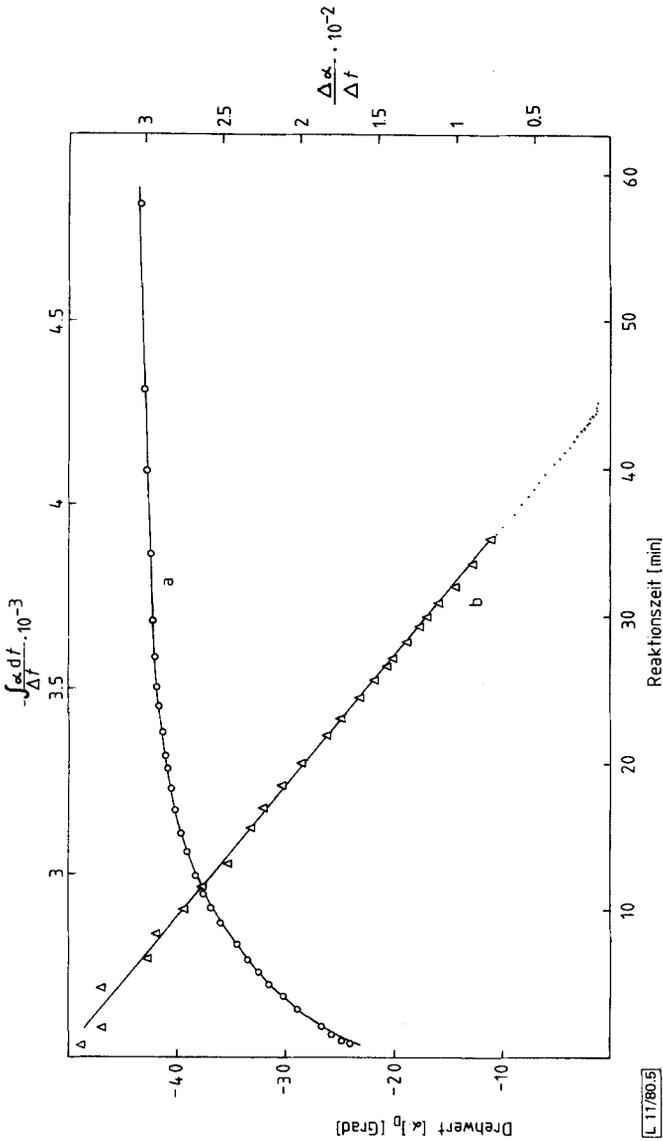


Abbildung 5. Zeitliche Veränderung des Drehwerts $[\alpha]_D$ bei der Behandlung von *N*-Acetyl- α -aminoisobutyryl-prolinamid (6) mit 0.6 N HCl in Eisessig (a). Bestimmung der Reaktionsordnung und der Geschwindigkeitskonstanten mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden (b)

Tabelle 2. Drehwerte von L-Prolinamid-hydrochlorid und N-Acetyl- α -aminoisobutyryl-L-prolinamid (**6**)

Verbindung	Lösungsmittel	$[\alpha]_D^{21}$	$[\alpha]_{D,M}^{21}$	c
Pro-NH ₂ · HCl	CH ₃ COOH (100%)	-73.9°	-11.2°	0.5
Pro-NH ₂ · HCl	1.2 N HCl in CH ₃ COOH	-72.7°	-10.8°	0.5
Ac-Aib-Pro-NH ₂	CH ₃ COOH (100%)	-49.2°	-11.7°	1.0
Ac-Aib-Pro-NH ₂	0.6 N HCl in CH ₃ COOH	-42.6° ^{a)}	-10.4° ^{a)}	1.0

^{a)} Meßwert nach 2 h.

Für N-Acetyl- α -aminoisobutyryl-prolinamid (**6**) wurde erst nach zweistündiger Einwirkung von Salzsäure/Eisessig ein mit Prolinamid vergleichbarer Drehwert ($[\alpha]_M = -10.4^\circ$) erhalten. Aus 25 Meßpunkten der Drehwerte erhielt man durch Ausgleichsrechnung eine Gerade³⁵⁾, aus der sich ableiten läßt, daß die Reaktionskinetik 1. oder pseudo 1. Ordnung sein kann. Die Geschwindigkeitskonstante hat den Wert $K = 2.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ beträgt 6 min.

Für eine noch zu findende Erklärung der leichten Bindungsspaltung sollte folgende Beobachtung berücksichtigt werden: Nach der Boc-Abspaltung von N-tert-Butyloxycarbonyl- α -aminoisobutyryl-L-prolin-(N')-benzyloxycarbonylhydrazid mit Salzsäure/Eisessig war auf der DC-Platte keine Isatin-positive Substanz. Dies deutet darauf hin, daß eine Stickstoff-Protonierung der α -Aminoisobuttersäure die Hydrolyse der α -Aminoisobutyryl-prolin-Bindung verhindert. Im Zusammenhang mit α -Aminoisobutyryl-prolin-Spaltungen ist auch der Strukturvorschlag von Martin und Williams^{2,36)} für das N-terminale Ende des Alamethicins (**1**) interessant: Aufgrund ihrer ¹H-NMR-Untersuchungen in wasserfreiem Methanol postulierten sie einen positiv geladenen Azacyclorest. Eine derartige Azacyclostruktur ist jedoch nicht nur reaktiver als ein Säurechlorid, sondern könnte auch leicht Wasser abspalten³⁷⁾. Die intermediäre Bildung dieser Struktur durch Säureeinwirkung wäre unter Umständen denkbar, wenn man die Protonierung einer Peptidbindung mit Trifluoressigsäure analog der von Klotz und Mitarbeitern beschriebenen³⁸⁾ annimmt. Über die Polarität und Zugänglichkeit der Aib-Pro-Peptidbindung lassen sich aufgrund von Röntgen-Strukturanalysendaten^{12-16,39)} keine Besonderheiten ableiten. Aib-Pro-Peptidbindungen zeigen übliche Abweichungen von 5-9° von der planaren trans-Form.

Die bei der Hydrolyse des Modellpeptids Acetyl- α -aminoisobutyryl-L-prolinamid (**6**) gemachten Erfahrungen wurden auf Alamethicin (**1**) und das synthetisierte Undekapeptid **2b** übertragen. Eine Peptidprobe wurde dazu bei 40°C mit reiner Trifluoressigsäure behandelt und anschließend mit Diazomethan umgesetzt. Das Gaschromatogramm zeigte dann nur einen einzigen Peak, der durch Vergleich Ac-Aib-OMe zugeordnet wurde. Eine zusätzlich durchgeführte GC/MS-Analyse bestätigte das Ergebnis. Dieser Ac-Aib-Nachweis³³⁾ erwies sich auch bei Suzukacillin³⁰⁾, Trichotoxin^{31,32)} und verwandten Aib-Polypeptidantibiotika als erfolgreich.

Nachweis der helikalen Konformation des Undekapeptidhydrazids **2b**

Circulardichroismus

Aufgrund von Circulardichroismus-Untersuchungen muß für Alamethicin (**1**) ein ausgeprägter helikaler Konformationsanteil angenommen werden¹⁰⁾. Das unter Verwendung von Polyoxyethylen als löslichem Träger schrittweise aufgebaute N-terminale

Alamethicinfragment Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OPOE (**2a**) ermöglichte es, Circular dichroismus-Spektren der einzelnen Polyoxyethylen-gebundenen Peptidsequenzen vom Tripeptid bis zum *N*-Acetylundekapeptid **2a** aufzunehmen^{20–22}).

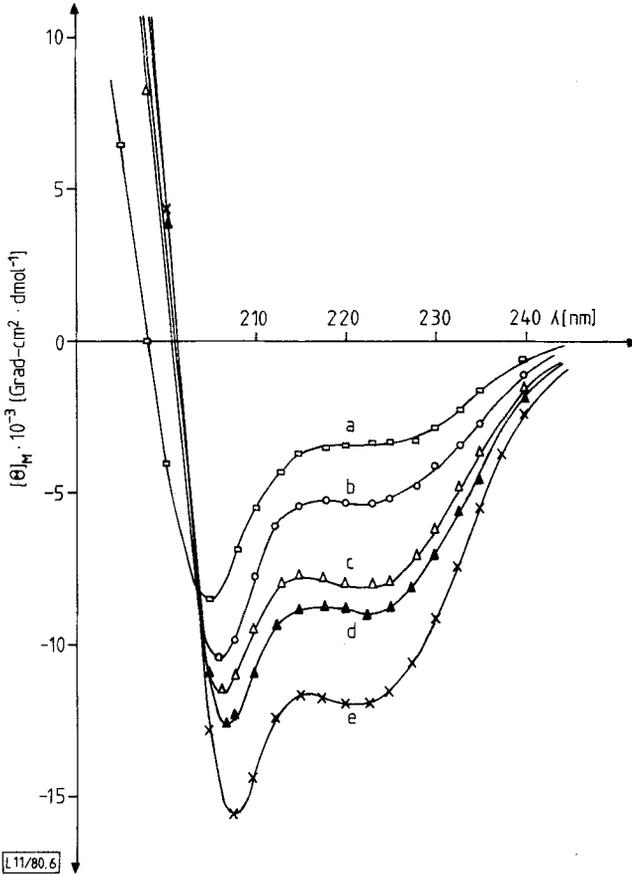


Abbildung 6. Circular dichroismus-Spektren von Boc-L-Ala⁴-Aib⁵-Ala⁶-Gln⁷-Aib⁸-Val⁹-Aib¹⁰-Gly¹¹-OPOE (**a**), Boc-L-Pro²-Aib³-Ala⁴-Aib⁵-Ala⁶-Gln⁷-Aib⁸-Val⁹-Aib¹⁰-Gly¹¹-OPOE (**4**) (**b**), Ac-Aib¹-L-Pro²-Aib³-Ala⁴-Aib⁵-Ala⁶-Gln⁷-Aib⁸-Val⁹-Aib¹⁰-Gly¹¹-OPOE **2a** (**c**), Ac-Aib¹-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly¹¹-NHNH₂ **2b** (**d**) und Alamethicin (**1**) (**e**) [*c* = 5 · 10⁻⁴ mol/l in Ethanol, (96proz. Uvasol) *T* = 22 °C]

Aus der Lage und Intensität der $[\pi-\pi^*]$ - und $[n-\pi^*]$ -Banden sowie der Aufspaltung der $[\pi-\pi^*]$ -Bande⁴⁰) konnte der Übergang von „random coil“ zu helikaler Struktur zwischen der Hepta- und Oktapeptidstufe beobachtet werden. Diese kritische Größe für eine Helixbildung wurde auch schon bei anderen stufenweise untersuchten Homologopeptiden^{41–44}) bei gleicher Kettenlänge gefunden. Nach Anbau des Boc-L-Prolin-Restes nehmen die Intensitäten der Cotton-Effekte stark zu und das CD-Spektrum

zeigt einen Kurvenverlauf, der typisch für eine helikale Struktur ist. Auch das verhältnismäßig starke Anwachsen der $[n-\pi^*]$ -Bande bei 221 nm spricht für einen entscheidenden Beitrag des *N*-Acetyl-2-methylalanin-Restes zur Sekundärstruktur der Undekapeptidsequenz (Abbildung 6).

Sowohl dem *N*-Acetyl-2-methylalanyl- als auch dem Prolyl-Rest muß eine stabilisierende Wirkung auf den N-Terminus der Alamethicin-Helix zugeschrieben werden. Wir nehmen an, daß der N-Terminus der Helix durch einen β -Turn aus Ac-Aib-Pro-Aib abgeschirmt wird. Prolinreste werden häufig in N-terminaler Stellung zu helikalen Konformationen und in β -Turns gefunden^{45,46}. Hinweise für die Bildung von β -Turns geben neuere Kristallstrukturbestimmungen verschiedener N-terminaler Alamethicinsequenzen¹²⁻¹⁶. β -Turns können sich auch aufgrund der günstigen Wechselwirkungen der Dipolmomente der Peptidbindungen mit dem Gesamtdipolmoment der α -Helix positiv auf deren Bildung bzw. Stabilisierung auswirken. Das hohe Dipolmoment des Alamethicins (65 Debye⁴⁷) wird als entscheidend angesehen für den Eintritt des Peptids in Lipid-Doppelschichtmembranen unter dem Einfluß des Membranpotentials^{3-5,48,49}. Eine Entscheidung über die Frage, ob eine aus aufeinanderfolgenden β -Turns aufgebaute 3_{10} -Helix^{50,51} oder eine α -Helix vorliegt, kann aufgrund von CD-Spektren bis jetzt nicht getroffen werden.

Verschiedene CD-Auswertemethoden⁵²⁻⁵⁴ liefern für das Undekapeptid **2b** im Mittel einen α -Konformationsanteil von 20–25% (Tabelle 3). Die Problematik der Auswahl geeigneter Standardkurven für α , β und ρ -Konformation bezüglich der Auswertung von CD-Spektren von Oligopeptiden wurde an anderen Stellen^{21,22,55} bereits diskutiert.

Tabelle 3. Molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte des Polyoxyethylen-gebundenen *N*-Acetylundekapeptids **2a**, des *N*-Acetylundekapeptidhydrazids **2b** sowie des Alamethicins **1** [$c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l; Ethanol (96proz. Uvasol) $T = 22^\circ\text{C}$] und durch quantitative Konformationsanalyse ermittelte Sekundärstrukturanteile

CD-Daten	Ac-Undekapeptid-OPOE 2a			Ac-Undekapeptid-NH ₂ 2d			Alamethicin (1)		
	$\lambda[\text{nm}] \left(\Theta_M \cdot 10^{-3} \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right)$	194 206.5 221	(17.8) (-11.4) (-8.3)		— 207 222	— (-12.6) (-9.0)		— 207 222.5	— (-15.4) (-11.9)
<i>Konformationsanteile nach</i>	α	β	ρ	α	β	ρ	α	β	ρ
<i>Rosenkranz und Scholtan</i> ⁵²⁾	14	19	58	16	23	49	34	30	36
<i>Greenfield und Fasman</i> ⁵³⁾	17	31	52	20	32	48	31	28	41
<i>Chen, Yang und Chan</i> ⁵⁴⁾	30	21	49	33	23	44	44	13	43

¹³C-NMR-Spektroskopie

Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NH₂ (**2b**) hat ein gut aufgelöstes ¹³C-NMR-Spektrum (Abbildung 7), dessen Signallagen und Intensitäten bereits große Übereinstimmung mit denen von Alamethicin (**1**)¹⁰, Trichotoxin A-40⁵⁶ und Suzukacillin³⁰ zeigen.

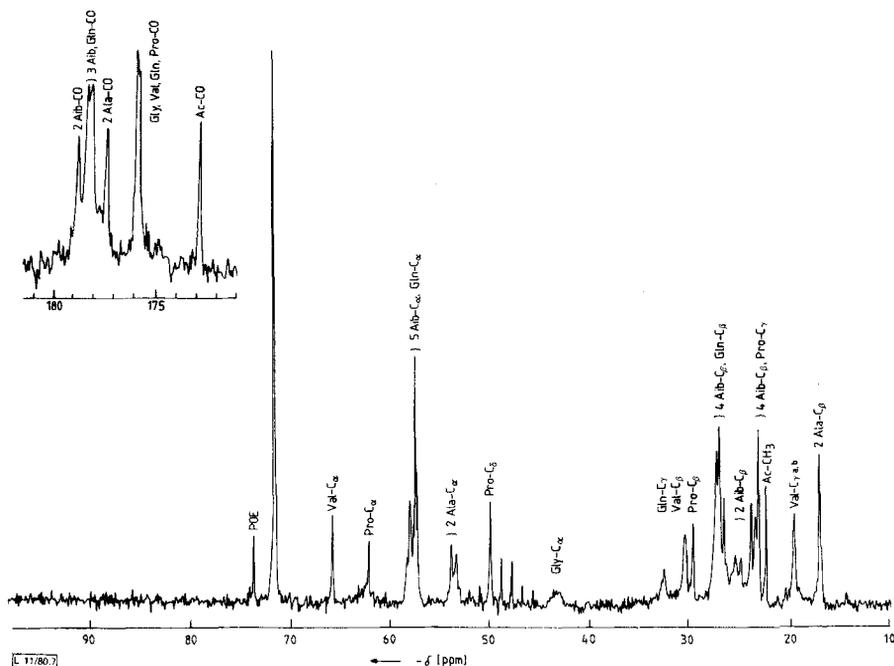


Abbildung 7. ^{13}C -NMR-Spektrum von Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NHNH₂ (**2b**): links Carbonylteil (170–180 ppm) und rechts Aliphatenbereich (15–75 ppm) mit Zuordnungen ($c = 100$ mg/ml; ^{12}C , ^2H -Methanol; $T = 30^\circ\text{C}$; $\delta[\text{ppm}]$ gegen $\delta(\text{TMS}_{\text{int}}) = 0$ ppm)

Zum Vergleich sind die chemischen Verschiebungen von Alamethicin (**1**)^{10,30} und *N*-Acetylundekapeptidhydrazid **2b** mit ihren Zuordnungen in Tabelle 4 aufgeführt. Die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund von Vergleichsdaten verschiedener Aib-Peptide^{9–11,30,56–58}. Die bereits durch CD-Untersuchungen erwiesene helikale Konformation des Alamethicins (**1**)^{10,20} und seiner natürlichen^{9,30–32,56} und synthetischen Analoga^{20–22,55} läßt sich auch am *N*-Acetylundekapeptidhydrazid **2b** eindeutig aus den dafür charakteristischen Signallagen der Aib-C _{β} und Ala-C _{α} -Kohlenstoffatome nachweisen. Aufgrund der Helix-Konformation von **2b** spalten die Aib-C _{β} -Signale von Aib-3, Aib-5 und Aib-8 wie auch beim **1**¹⁰ um 3.5 ppm auf (Tabelle 4, Abbildung 7). Dies ist auf die stark unterschiedliche Umgebung der beiden Aib-C _{β} zurückzuführen: Eine CH₃-Gruppe liegt jeweils in der Nähe einer NH-Gruppe, und die andere wird von einer CO-Gruppe des helikalen Peptid-Rückgrates beeinflusst. Aus der Integration läßt sich bestimmen, daß sich drei der fünf 2-Methylalanin-Reste in helikaler Umgebung befinden müssen. Die Resonanzen bei $\delta = 25.1$ und 25.8 können aufgrund von ausführlichen Untersuchungen an vielen Aib-Peptiden^{9–11,30,56–58} Methylgruppen von 2-Methylalanin-Resten zugeordnet werden, die in nicht helikaler Konformation vorliegen (Aib-1 und Aib-10).

Tabelle 4. Vergleich der ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen ($-\delta$ [ppm], $\text{TMS}_{\text{int.}} = 0$ ppm) von Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NH NH_2 (**2b**) und Alamethicin (**1**)³⁰⁾ in Methanol [$^{12}\text{C}, ^2\text{H}$]

Alamethicin 1		Acetylundekapeptid 2b				
17.0	2Ala-C $_{\beta}$	17.1	Ala-C $_{\beta}$			
19.6	Val-C $_{\gamma^a}$	19.7	Val-C $_{\gamma^a}$			
20.3	Val-C $_{\gamma^b}$	19.8	Val-C $_{\gamma^b}$			
21.4	Leu-C $_{\delta^a}$					
22.5	Leu-C $_{\delta^b}$, Ac-CH $_3$	22.5	Ac-CH $_3$			
23.2}	6Aib-C $_{\beta}$	23.2}	4Aib-C $_{\beta}$			
23.5}		23.5}				
23.9		23.9				
23.9	2Pro-C $_{\gamma}$	23.9	Pro-C $_{\gamma}$			
25.6	Leu-C $_{\gamma}$	25.1}	2Aib-C $_{\beta}$			
		25.8}				
26.7}	8Aib-C $_{\beta}$	26.7}	4Aib-C $_{\beta}$			
27.1}		27.2}				
27.4}	3Glx-C $_{\beta}$	27.4	Gln-C $_{\beta}$			
27.9}		27.9}				
29.7	2Pro-C $_{\beta}$	29.8	Pro-C $_{\beta}$			
30.4	2Val-C $_{\beta}$	30.5	Val-C $_{\beta}$			
31.8	Glx-C $_{\gamma}$					
32.5}	2Glx-C $_{\gamma}$	32.7	Gln-C $_{\gamma}$			
32.9}		32.9}				
37.9	C $_6$ H $_5$ -CH $_2$					
41.1	Leu-C $_{\beta}$					
44.8	Gly-C $_{\alpha}$	43.4	Gly-C $_{\alpha}$			
49.9}	2Pro-C $_{\delta}$	50.1	Pro-C $_{\delta}$			
50.7}		50.7}				
53.9	2Ala-C $_{\alpha}$	53.5}	2Ala-C $_{\alpha}$			
		54.0}				
54.4	Leu-C $_{\alpha}$					
55.5	Glx-C $_{\alpha}$	57.3	Gln-C $_{\alpha}$			
56.8}	2Glx-C $_{\alpha}$	57.3	Gln-C $_{\alpha}$			
57.2}		57.3}				
57.4}	7Aib-C $_{\alpha}$	57.5}	5Aib-C $_{\alpha}$			
57.6}		57.6}				
58.0}		57.7}				
		58.1}				
		58.4}				
63.2}	2Val-C $_{\alpha}$	62.3}	Pro-C $_{\alpha}$			
63.9}	2Pro-C $_{\alpha}$	65.8}				
64.9}	Pheol-CH $_2$ OH	71.6}				
		73.7}				
172.4	Ac-CO	172.6	Ac-CO			
172.9	Val,Gly					
174.0	Glu- α -CO					
175.0}	Val-CO	175.7	Gly-CO			
175.2}		Gln- α -CO + 1CO		Val-CO		
175.5}		Gln- α -CO + 1CO			Gln- α -CO	
175.7}		4Aib-CO				Pro-CO
176.3}		2Pro-CO				
177.0}	177.0}					

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Alamethicin 1		Acetylundeka-peptid 2b	
177.2	2 Ala-CO	177.2	2 Ala-CO
177.6 } 177.8 } 177.9 }	Aib-Co 2 Glx-γ-CO		
178.1	Glx-γ-CO	178.2	Gln-γ-CO
178.4	1 CO	178.4	3 Aib-CO
178.8 } 178.9 }	2 Aib-CO	178.6	2 Aib-CO

Die Signale der beiden Ala-C_α liegen bei $\delta = 53.5$ bzw. 54.0 und zeigen gegenüber kürzeren Alanin-haltigen Peptiden die gleiche Tieffeldverschiebung wie die von **1**. Dies beweist, daß die beiden Alaninreste Ala-4 und Ala-6 im helikalen Bereich des Undeka-peptids liegen. Die weniger durch unterschiedliche Konformationen beeinflussbaren Aib-C_α- und Ala-C_β-Signale haben ebenfalls mit denen von Alamethicin (**1**) übereinstimmende Lagen. Die Verschiebung der C_α-Resonanz des Glutaminrestes in Position 7 zu tieferem Feld läßt wie beim **1** den Schluß zu, daß auch dieser Aminosäurerest in die Helix eingebaut ist. Die C-terminale Hexapeptidsequenz dürfte somit in **1** relativ geringen Einfluß auf die Umgebung helikaler Aminosäurereste ausüben^{9,11,55}). Das Acetyl-CH₃-Signal von Ac-Aib-Pro-NH₂ (**6**) liegt bei $\delta = 22.5$. Diese Signallage wird auch für die N-Acetylmethyl-Gruppe des Undeka-peptids **2b** beobachtet (Tabelle 4). Die starke Absorption bei $\delta = 71.6$ sowie das etwas schwächere Signal bei $\delta = 73.7$ stammen eindeutig vom Polyoxyethylen^{57,58}). Die zu diesen ¹H-NMR-Messungen verwendete Peptidprobe war, wie bereits erwähnt, nicht völlig frei von POE oder Polymergebundenem Peptid **2a**. Aus dem Verhältnis der Integrale von Polyoxyethylen und einzelnen Peptid-C-Atomen läßt sich diese Verunreinigung auf kleiner als 3 Gewichtsprozent abschätzen.

Der Carbonylbereich des Undeka-peptids **2** zeigt ähnliche Signalgruppen wie der von Alamethicin (**1**) [Abbildung 7]. Eine Zuordnung der Carbonylsignale wurde ebenfalls anhand des Alamethicin-Spektrums¹⁰) sowie unter Berücksichtigung neuerer ¹³C-NMR-Daten von Aib-Ala-Oligopeptiden^{9,11,58}) getroffen. Bei Ac-Aib-Pro-NH₂ (**6**) wurde die Acetyl-CO-Resonanz bei $\delta = 172.9$ beobachtet, dies ist im Undeka-peptid-Spektrum das bei höchstem Feld liegende Carbonylsignal. Bei dieser Frequenz absorbiert auch die Glycin-Carbonylgruppe. Eine sichere Zuordnung im Carbonylbereich kann ohne ¹³C-Markierung und ohne Zuhilfenahme von Verschiebungsreagentien nicht erfolgen. Sicher ist jedoch, daß alle Aib-Carbonylgruppen bei tiefem und die Ala-CO-Gruppen bei höherem Feld absorbieren.

Herrn Professor Dr. W. A. König danken wir für die GC/MS-Untersuchung. Für die Berechnung der Ausgleichsgeraden danken wir Frau Dr. G. Lachmann. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für die Sach- und Personalmittel (SFB 76, Projekt R, Jung) zu danken.

Experimenteller Teil

Abkürzungen: Aib = α -Aminoisobuttersäure oder 2-Methylalanin; DMF = *N,N*-Dimethylformamid; POE = Polyoxyethylen; Phenol = *L*-Phenylalaninol [(*S*)-2-Amino-3-phenylpropanol]; TMS = Tetramethylsilan. Aminosäuren und Schutzgruppen sind nach Empfehlung der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatur abgekürzt [Eur. J. Biochem. **27**, 201 (1972)]. – Alle *Lösungsmittel* wurden, sofern nicht p. a. von der Fa. Merck bezogen, nach üblichen Methoden gereinigt und getrocknet. α -Aminoisobuttersäure stammte von der Fa. Cyclo Chemical; die übrigen *Aminosäuren* waren von der Fa. Merck. – Die *Schmelzpunkte* wurden nach Tottoli ermittelt und sind nicht korrigiert. – *Dünnschichtchromatographie:* Kieselgelfertigplatten 60 F₂₅₄ der Fa. Merck; Fließmittelsystem: 1-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1); Sprühreagentien: 0.3proz. Ninhydrin-Lösung und Chlor/*o*-Tolidin-Reagens; die lipophilen Peptide wurden auch durch Ansprühen mit Wasser indiziert, Peptide mit N-terminalem Prolin wurden durch Besprühen mit Isatin-Lösung nachgewiesen. – *Säulenchromatographie:* Kieselgel 60 (70–230 mesh; Säule 30 × 1 cm), Sephadex LH-20 (Säule 1 m × 1 cm); Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 der Fa. ISCO. – Zur *Aminosäurenanalyse* wurden ca. 250 μ mol Peptid mit 1 ml 6 N HCl 24 h bei 110°C hydrolysiert; der getrocknete Rückstand wurde in Natriumcitrat-Puffer (pH 2.2) aufgenommen. Die Aminosäuren wurden mit einem Beckman-Multichrom-Analysator oder mit einem automatischen Chromatographie-System LC 6000 E der Fa. Biotronik bestimmt. – *Gaschromatographie:* Fraktovap 2101 der Fa. Carlo Erba mit Integrator Spectra Physics System I. – *Gaschromatographie-Massenspektrometrie:* Fraktovap 2101 der Fa. Carlo Erba und Massenspektrometer MAT 711 sowie MAT 311 A der Fa. Varian. – *C,H,N-Elementaranalysen:* Einfachbestimmungen mit dem Elementar-Analyser Modell 240 der Fa. Perkin-Elmer. – *Optische Drehwerte:* Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer. *Circulardichroismus:* Jasco-J-20A-Spektrograph; Standardlösungen von Epiandrosteron und D(-)-2-Hydroxy-3,3-dimethylbutyrolacton dienten zur Eichung des CD-Geräts. – *IR-Spektroskopie:* 1.5 mg in 300 mg KBr; Spektrometer 021-IR der Fa. Perkin-Elmer. – ¹³C-FT-NMR-Spektroskopie: Kernresonanzspektrometer WH-80 der Fa. Bruker-Physik (20.115 MHz für ¹³C).

Alkalische Esterspaltung von Boc-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OPOE (4a): 5 g (0.45 mmol) **4a** werden in 50 ml 0.5 N KOH in Wasser/Methanol (1:1) gerührt. Nach 14 h wird unter Kühlung mit 1 N HCl neutralisiert, das Methanol i. Vak. abdestilliert und die wäßrige Lösung lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 20-mg-Portionen auf Dünnschichtplatten (10 × 20 cm) mit Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) chromatographiert. Die lipophilen Peptidflecken werden auf der DC-Platte durch Besprühen mit Wasser sichtbar gemacht und ausgekratzt. Mit Methanol/Chloroform (1:1) wird das Peptid vom Kieselgel eluiert. Ausb. 30 mg (7%) Boc-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Gly-OH (**4b**); $R_F = 0.6$. Aminosäurenanalyse: Gly 1.00 (1), Aib 3.69 (4), Val 1.08 (1), Gln 1.08 (1), Ala 2.05 (2), Pro 0.92 (1).

Hydrazinolyse von Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OPOE (2a): 5 g (0.45 mmol) **2a** in 20 ml Methanol werden mit 0.5 ml (10 mmol) Hydrazin-hydrat bei Raumtemp. gerührt. Nach 18 h werden nochmals 0.1 ml Hydrazin-hydrat zugegeben. Nach insgesamt 24 h wird das Polymer durch Zugabe von Ether ausgefällt und abfiltriert. Die Methanol/Ether-Phase wird eingedampft und i. Vak. über konz. H₂SO₄ solange getrocknet, bis bei der Überprüfung des Rückstands auf der DC-Platte kein Hydrazin mehr anfärbbar ist. Dann wird mit wenig Methanol gelöst und viel Wasser zugegeben. In der Kälte fällt nach einigen Tagen etwas Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-NHNH₂ (**2b**) als kristalliner Niederschlag (6 mg) aus. Die Hauptmenge **2b** wird wie folgt isoliert: Aus dem Filtrat wird das Polyoxyethylen nach Einengen i. Vak. durch dreimaliges Umfällen aus Methanol mit Ether entfernt. Die Methanol/Ether-Phasen mit **2b** werden eingedampft und i. Vak. über konz. H₂SO₄ getrocknet. Der Rückstand wird dann über eine Sephadex-LH-20-Säule (1 m × 1 cm) mit Methanol chromatographiert. Da

sich die Elutionszeit für **2b** von der des zuerst eluierten Peptidpolymers nur wenig unterscheidet, müssen die **2b** enthaltenden Fraktionen (UV-Detektion, 254 nm) mehrmals chromatographiert werden. Ausb. 108 mg (25%); Schmp. 242–246°C, $R_F = 0.4$.

$C_{45}H_{78}N_{14}O_{13}$ (1023.2) Ber. C 52.82 H 7.68 N 19.16 Gef. C 50.85 H 7.65 N 18.02

N-Acetyl- α -aminoisobutyryl-*L*-prolinamid (*Ac-Aib-L-Pro-NH*₂; **6**): 3 g (20 mmol) $\oplus H_2$ -Pro-NH₂ Cl^{⊖59} werden in 50 ml warmem DMF gelöst und mit 2.2 ml (20 mmol) *N*-Methylmorpholin bei 0°C versetzt. 2.9 g (20 mmol) *Ac-Aib-OH*¹⁷ werden in 20 ml DMF gelöst und mit 2.7 g (20 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol⁵⁹ versetzt. Beide Lösungen werden vereinigt und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 4.1 g (20 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml Dichlormethan wird 20 min bei 0°C und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, die Lösung stark eingeeengt und in Methanol/Essigester aufgenommen. Nach Zugabe von Petrolether (30–50°C) kristallisiert **6** in der Kälte aus. Ausb. 2.9 g (61%); Schmp. 250°C (Zers.), $R_F = 0.37$, $[\alpha]_D^{21} = -5.2^\circ$ (Ethanol, $c = 1$). – IR (KBr): 3370, 3300 und 3160 cm^{-1} (freies und assoziiertes N-H), 1690, 1655 und 1620 cm^{-1} (Amid-I), 1545 cm^{-1} (Amid-II). – ¹³C-NMR (²H-Methanol): $\delta = 177.9$ (Aib-CO), 174.7 (Pro-CO), 172.9 (Ac-CO), 63.7 (Pro-C _{ω}), 49.6 (Pro-C _{δ}), 30.0 (Pro-C _{β}), 24.65 (Pro-C _{γ}), 57.7 (Aib-C _{α}), 26.7 und 26.2 (2 Aib-C _{β}), 22.4 (Ac-CH₃).

$C_{11}H_{19}N_3O_3$ (241.3) Ber. C 54.76 H 7.94 N 17.41 Gef. C 54.53 H 8.04 N 17.16

Acidolyse der α -Aminoisobutyryl-*L*-prolin-Peptidbindung

a) 5 mg **6** werden mit 1 ml 1 N HCl/Eisessig 4 h bei 37°C umgesetzt. Nach 3, 5, 10, 20, 40, 90 und 140 min werden 50- μ l-Proben dieser Lösung zu jeweils 0.5 ml einer 3proz. ammoniakalischen Methanollösung gegeben. Nach wiederholtem Eindampfen dieser Probenlösungen werden die Rückstände in 50 μ l Methanol aufgenommen und davon 5 μ l auf DC-Platten aufgetragen. Die DC-Platten werden mit Eisessig/Wasser (3:1:1) chromatographiert. Die Substanzflecken werden zuerst mit Ninhydrin, dann mit Chlor/*o*-Tolidin sichtbar gemacht; eine separate Platte wird mit Isatin-Lösung besprüht.

b) 2 mg **6** werden in 1 ml Trifluoressigsäure bei 37°C hydrolysiert^{31–33}. Nach 5, 15, 45 und 90 min sowie nach 3, 6 und 20 h werden jeweils 100 μ l der Reaktionslösung zu einer ammoniakalischen 3proz. Methanollösung gegeben. Nach dem Eindampfen der Proben wird deren Rückstand in jeweils 5 ml Citrat-Puffer (pH 2.2) aufgenommen und davon je 0.5 ml auf die Säule eines Aminosäureanalysators gegeben. Als Standard dient Pro-NH₂, das bei der verwendeten Säule (90 \times 1 cm; Citrat-Puffer mit pH 3.2; Beckman-Multichrom-Analysator) eine Retentionszeit von 101 min hat.

c) 10 mg **6** werden in 0.5 ml Essigsäure gelöst und mit 0.5 ml 1.2 N HCl/Eisessig versetzt. Nach kräftigem Schütteln wird die Lösung rasch in die thermostatisierte Meßküvette (24°C) des Polarimeters übergeführt und die Zeitabhängigkeit des Drehwerts $[\alpha]_D$ gemessen.

Selektive Trifluoressigsäurehydrolyse und Nachweis von N-terminalem N-Acetyl-2-methylalanin: 4 mg Alamethicin (**1**) werden bei 40°C 10 h mit 1 ml wasserfreier Trifluoressigsäure behandelt^{31–33}. Nach Abblasen der Säure mit trockenem Stickstoff wird der Rückstand in Methanol aufgenommen, im Eisbad gekühlt und bis zur Gelbfärbung Diazomethan zugegeben. Dann wird zur Trockene eingedampft, in wenig Dichlormethan aufgenommen und der *N*-Acetyl-2-methylalaninmethylester gaschromatographisch sowie mittels GC-MS untersucht³³. – Analog wird auch *Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-OPOE* (**2a**) untersucht. als Referenzsubstanzen werden *For-Aib-OME* und *Ac-Aib-OME* eingesetzt. Zur GC-Untersuchung wird eine Glaskapillare (25 m \times 0.3 mm) verwendet, die mit SE 52 belegt ist; Temperaturprogramm: 3°C/min zwischen 60–260°C, Trägergas: Wasserstoff.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie des Partialhydrolysats von 2b: 2–3 mg **2b** werden mit 1 ml konz. HCl bei 37° 24 h hydrolysiert. Der Rückstand wird in 2 ml 1.5 N HCl/Methanol 1 h bei 110°C behandelt, eingedampft und dann mit Trifluoressigsäureanhydrid umgesetzt. Zur GC-MS-Analyse werden 0.1 bis 0.5 µl auf eine 25-m-Glaskapillarsäule mit SE 30 aufgegeben; Trägergas: Helium, Temperaturprogramm ab 120°C 3°C/min.

Gaschromatographischer Racemisierungstest: Je 0.2 µmol **1** und **2b** werden 4 h bei 110°C in 1 ml 6 N HCl partiell hydrolysiert. Das Hydrolysat wird eingedampft und der Rückstand in 0.5 ml 3 N HCl/Isopropylalkohol aufgenommen und bei 110°C verestert. Nach 1 h wird mit trockenem Stickstoff abgeblasen. Die Aminogruppe wird mit 100 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid in 200 µl Dichlormethan innerhalb 1 h bei Raumtemp. acyliert. Nach Abblasen bis zur Trockene wird wieder in 200 µl Dichlormethan aufgenommen. Proben von 0.1–0.5 µl werden in den Gaschromatographen eingespritzt; Trägergas: Wasserstoff. Auf einer Glaskapillarsäule (25 m × 0.3 mm) mit der chiralen Phase *N*-Propionyl-L-valin-*tert*-butylamid-polysiloxan²⁷⁾ werden mit dem Temperaturprogramm 3°C/min zwischen 60 und 260°C die enantiomeren *N*-(Pentafluorpropionyl)-aminosäure-isopropylester aufgetrennt. Die Peakflächenverhältnisse von *D*- und *L*-Enantiomeren werden durch automatische Integration bestimmt.

- 1) J. W. Payne, R. Hartley und B. S. Jakes, *Biochem. J.* **117**, 757 (1970).
- 2) D. R. Martin und R. J. P. Williams, *Biochem. J.* **153**, 181 (1976).
- 3) P. Mueller und D. O. Rudin, *Nature* (London) **217**, 713 (1968).
- 4) L. G. M. Gordon und D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 1014 (1972).
- 5) B. Sakmann und G. Boheim, *Nature* (London) **282**, 336 (1979) und dort zitierte Lit.
- 6) G. R. Marshall und T. M. Balasubramanian in *Peptides*, Proc. of the 6th Amer. Pept. Symp. 1979 (E. Gross und J. Meienhofer), S. 639, Pierce Chemical Comp., Rockford Ill. (USA) 1979.
- 7) B. F. Gisin, S. Kobayashi, D. G. Davis und J. E. Hall in *Peptides*, Proc. of the 5th Amer. Pept. Symp. 1977 (M. Goodman und J. Meienhofer), S. 215, Wiley, New York 1978.
- 8) R. Oekonomopulos und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 1151.
- 9) G. Jung, H. Brückner, R. Oekonomopulos, G. Boheim, E. Breitmaier und W. A. König in *Peptides*, Proc. of the 6th Amer. Pept. Symp. 1979 (E. Gross und J. Meienhofer), S. 647, Pierce Chemical Comp., Rockford Ill. (USA) 1979.
- 10) G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz, *Eur. J. Biochem.* **54**, 395 (1975).
- 11) D. Leibfritz, N. Dubischar, R. Oekonomopulos, H. Lachmann und G. Jung, Manuskript eingereicht.
- 12) G. D. Smith, W. L. Duax, E. W. Czerwinski, N. E. Kendrick, G. R. Marshall und F. S. Mathews in *Peptides*, Proc. of the 5th Amer. Pept. Symp. 1977 (M. Goodman und J. Meienhofer), S. 277, Wiley, New York 1978.
- 13) N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balaram, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 292 (1977).
- 14) N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balaram, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 996.
- 15) R. Nagaraj, N. Shamala und P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 16 (1979).
- 16) B. V. Venkataram Prasad, N. Shamala, R. Nagaraj, R. Chandrasekaran und P. Balaram, *Biopolymers*, **18**, 1635 (1979).
- 17) M. T. Leplawy, D. S. Jones, G. W. Kenner und R. C. Sheppard, *Tetrahedron*, **11**, 39 (1960).
- 18) D. S. Jones, G. W. Kenner, J. Preston und R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6227.
- 19) M. Mutter, R. Uhmman und E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 901.
- 20) G. Jung, N. Dubischar, G. Irmscher, W. Mayr und R. Oekonomopulos, *Chem.-Ztg.* **101**, 196 (1977).
- 21) W. Mayr, Dissertation Univ. Tübingen 1979.
- 22) W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, *Biopolymers*, **18**, 425 (1979).
- 23) W. Göhring und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 1765.
- 24) W. Göhring und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 1776.
- 25) W. Göhring und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 1781.
- 26) E. Bayer und M. Mutter, *Chem. Ber.* **107**, 1344 (1974).
- 27) H. Frank, G. J. Nicholson und E. Bayer, *J. Chromatogr.* **167**, 187 (1978).
- 28) F. Weygand, A. Prox, H. H Fessel und K. Kun Sun, *Z. Naturforsch., Teil B*, **20**, 1169 (1965).

- 29) E. Bayer, W. A. König und G. Jung, Z. Naturforsch., Teil B, **22**, 924 (1967).
- 30) G. Jung, W. A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta, **433**, 164 (1975).
- 31) H. Brückner, W. A. König, M. Greiner und G. Jung, Angew. Chem. **91**, 508 (1979); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **18**, 476 (1979).
- 32) H. Brückner, G. Jung, W. A. König und E. Wachter in Peptides, Proc. 6th Amer. Pept. Symp. 1979 (E. Gross und J. Meienhofer), S. 723, Pierce Chemical Comp., Rockford Ill. (USA) 1979.
- 33) H. Brückner und G. Jung, Chromatographia, **13**, 170 (1980).
- 34) Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin und J. V. Kozhernikova, Zh. Obshch. Khim. **41**, 2085 (1971).
- 35) H. Mauser, Formale Kinetik, Bertelsmann Universitäts-Verlag, Düsseldorf 1974.
- 36) D. R. Martin und R. J. P. Williams, Biochem. Soc. Trans. Proc. 533 rd Meeting, Vol. 3, 166 (1975).
- 37) M. Rothe, persönliche Mitteilung.
- 38) I. M. Klotz, S. F. Russo, S. Hanlon und M. A. Stake, J. Am. Chem. Soc. **86**, 4774 (1964).
- 39) W. Mayr, G. Jung und J. Strähle, Liebigs Ann. Chem. **1980**, 715.
- 40) R. Woody, J. Polym. Sci., Macromol. Rev. **12**, 181 (1977) und dort zitierte Lit.
- 41) M. Goodman, F. Naider und C. Toniolo, Biopolymers, **10**, 1719 (1971).
- 42) C. Toniolo und G. M. Bonora, Macromol. Chem. **175**, 1665, 2203 (1974).
- 43) C. Toniolo, G. M. Bonora und A. Fontana, Int. J. Pept. Protein Res. **6**, 371 (1974).
- 44) M. Mutter, H. Mutter, R. Uhmann und E. Bayer, Biopolymers, **15**, 917 (1976).
- 45) J. L. Crawford, W. N. Lipscomb und C. G. Schellmann, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 538 (1973).
- 46) P. Y. Chou und G. D. Fasman, Biochemistry, **13**, 211, 222 (1974).
- 47) R. E. Yantorno, S. Takashima und P. Müller, Abstr. 21th Meeting Biophys. Soc., New Orleans (1977).
- 48) G. Boheim, K. Janko, D. Leibfritz, T. Ooka, W. A. König und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta, **433**, 182 (1975).
- 49) G. Boheim, G. Irmscher und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta, **507**, 485 (1978).
- 50) M. L. Huggins, J. Am. Chem. Soc. **74**, 3963 (1952).
- 51) B. R. Malcolm, Biopolymers, **16**, 2591 (1977).
- 52) H. Rosenkranz und W. Scholtan, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 896 (1971).
- 53) N. Greenfield und G. D. Fasman, Biochem. **8**, 4108 (1969).
- 54) Y. Chen, J. T. Yang und K. H. Chan, Biochem. **13**, 3350 (1974).
- 55) R. Oekonomopulos und G. Jung, Biopolymers, **19**, 203 (1980).
- 56) G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta, **507**, 470 (1978).
- 57) D. Leibfritz, W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, Tetrahedron, **34**, 2045 (1978).
- 58) G. Jung, R. Oekonomopulos, W. Mayr, G. Bovermann und D. Leibfritz, Proc. European Conference on NMR of Macromolecules, (1978), Sassari, Italien, im Druck.
- 59) D. Hamer und J. P. Greenstein, J. Biol. Chem. **193**, 81 (1951).
- 60) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).