

## Die Sequenzen des membranmodifizierenden Peptid-Antibiotikums Trichotoxin A-40

Von Hans Brückner, Wilfried A. König, Michael Greiner und Günther Jung<sup>[\*]</sup>

Die amphiphilen Polypeptid-Antibiotica Alamethicin<sup>[1]</sup>, Suzukacillin<sup>[2]</sup> und Trichotoxin<sup>[3]</sup> können in Lipid-Membranen einen fluktuierenden, spannungsabhängigen Ionenfluß mit Aktionspotentialen erzeugen und interessieren deswegen als Modellsysteme für die Nervenleitung. Die durch Aggregation dieser Peptide gebildeten Poren, die verschiedene Leitfähigkeitszustände annehmen können, sind zum Studium der Mechanismen von Durchtrittsphänomenen besonders geeignet.

Sequenzierungsversuche an Alamethicin<sup>[4]</sup> und Suzukacillin<sup>[5]</sup> waren durch den hohen Gehalt an  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib), durch die Acetylierung der N-Termini und das Vorliegen von Aminoalkoholen an den C-Termini besonders erschwert.

Sehr reines Trichotoxin erhielten wir durch Extraktion des lyophilisierten Pilzmycels von *Trichoderma viride* NRRL 5242 mit Dichlormethan, Chromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol sowie Trennung von Trichotoxin A-40<sup>[6]</sup> und A-50 durch multiplikative Gegenstromverteilung mit 2-Butanol/0.015 M Ammoniumacetatlösung (pH = 8.9) (siehe Abb. 1)<sup>[7]</sup>. Als zusätzliche, früher nicht beschriebene Komponenten fanden wir in Trichotoxin A-40 und A-50 Isovalin (Ival) und Valinol. Die L-Konfiguration der Aminosäuren sowie des Aminoalkohols wurde durch Gaschromatographie

an chiraler Phase und durch Diastereomerentrennung<sup>[8a]</sup> ermittelt (Ival als (–)-Enantiomer, d. h. D-Ival<sup>[8b]</sup>).

Frühere Sequenzierungen an Alamethicin sowie eigene Beobachtungen an Suzukacillin deuteten auf eine bemerkenswerte Labilität der durch die Carboxygruppe von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure geknüpften Peptidbindung gegenüber wäßriger Salzsäure. Bei systematischen Versuchen erwies sich wasserfreie Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur als selektives und schonendes Spaltungsreagens. Auch in Antiamoebin und Alamethicin wurde die Aib-Pro-Bindung durch Trifluoressigsäure zerlegt<sup>[4c]</sup>.

Mit Trifluoressigsäure konnten wir Trichotoxin A-40 in nur 3 h bei 37°C bevorzugt in ein N-acetyliertes Dodecapeptid (Peptide I, II, III mit Gly/Ala- und Ala/Aib-Austausch) sowie ein C-terminales, mit Prolin beginnendes und den Aminoalkohol Valinol enthaltendes Hexapeptid (Peptide IV + V mit Aib/Ival-Austausch) zerlegen (Abb. 1). Weitergehende Acidolyse des Dodecapeptids ergab Ac-Aib-OH und ein Undecapeptid mit freier Aminogruppe. Bei 19 h Einwirkung von Trifluoressigsäure wurde aus dem Undecapeptid C-terminal das Tripeptid Ala-Aib-Aib freigesetzt. Diese Acidolyse konnte an Modellpeptiden nachvollzogen werden. So wurden z. B. Ac-Aib-Pro-NH<sub>2</sub> in 15 min, Ac-Aib-Gly-OH und Ac-Aib-Ala-OH in 3 h zu etwa 50% gespalten; im Gegensatz dazu wird Ac-Ala-Aib-OME selbst in 6 h nur spurenweise angegriffen.

Das verwendete Trichotoxin A-40 schien in zehn DC-Systemen völlig einheitlich zu sein; ferner zeigte es weitgehend ganzzahlige Aminosäureverhältnisse. Aus dem dünn-schichtchromatographischen Verhalten seiner Spaltprodukte ergab sich jedoch, daß insgesamt drei sequenzanalogue, N-acetylierte Dodecapeptide (I, II, III) und zwei jeweils mit Prolin beginnende Hexapeptide (IV, V) vorliegen. Diese fünf Peptide konnten durch Kieselgel-Säulenchromatographie sowie multiplikative Gegenstromverteilung angereichert bzw. getrennt werden.

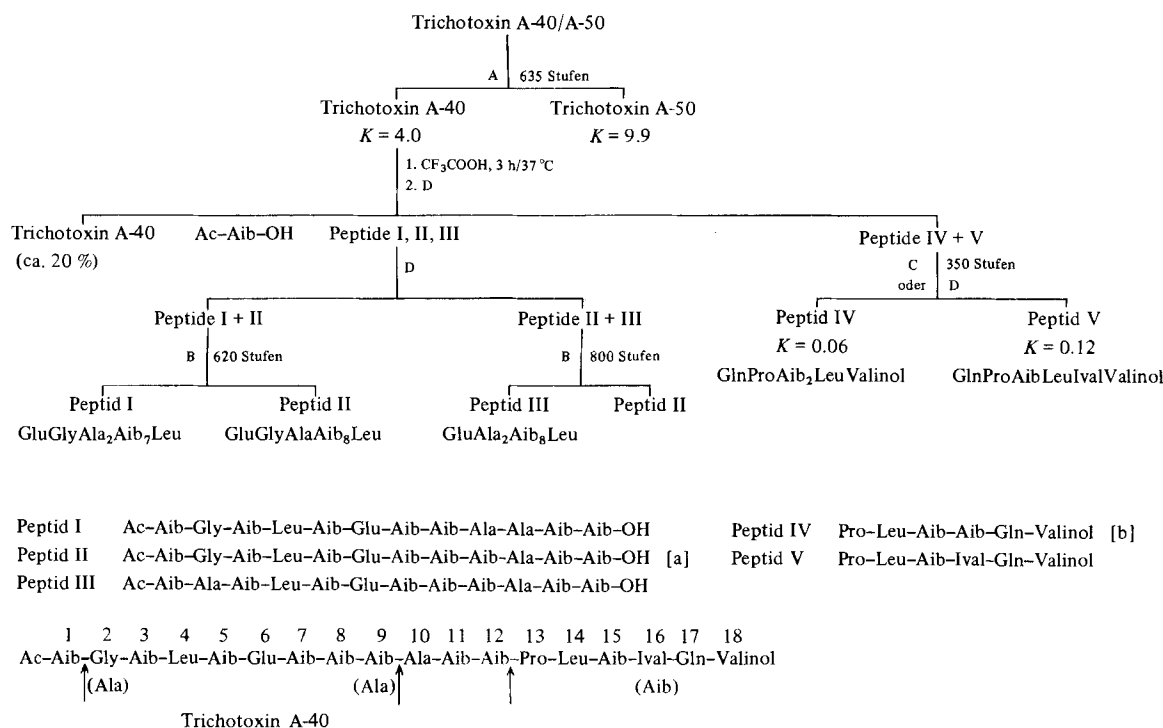


Abb. 1. Spaltung und Sequenzierung von Trichotoxin A-40. A, B, C: Multiplikative Gegenstromverteilung. A: in 2-Butanol/0.015 M Ammoniumacetat (pH = 8.9) 1:1 (v/v); B: in 2-Butanol/Essigester/Methanol/0.3% Ammoniumacetat 3:5:2:3; C: in *n*-Butanol/Essigester/Ammoniumacetat (pH = 4.6) 2:4.5:5; K = Verteilungskoeffizient. D: Kieselgel-Säulenchromatographie in Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig 65:25:4:3. – [a] Sequenz nach Abspaltung von Ac-Aib-OH mit Trifluoressigsäure durch Edman-Abbau an fester Phase (E. Wachter et al.) bestätigt; [b] Sequenz nach selektiver Abspaltung von Valinol mit Dioxan/6 N HCl (43 h/37°C) durch Edman-Abbau an fester Phase bestätigt. Reihenfolge der Spaltung (Pfeile): 12–13 > 1–2 > 9–10.

[\*] Prof. Dr. G. Jung [†], Dipl.-Chem. H. Brückner  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen 1

Prof. Dr. W. A. König, Dipl.-Chem. M. Greiner  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Martin-Luther-King-Platz, D-2000 Hamburg 13

[†] Korrespondenzautor.

matographischen Verhalten seiner Spaltprodukte ergab sich jedoch, daß insgesamt drei sequenzanalogue, N-acetylierte Dodecapeptide (I, II, III) und zwei jeweils mit Prolin beginnende Hexapeptide (IV, V) vorliegen. Diese fünf Peptide konnten durch Kieselgel-Säulenchromatographie sowie multiplikative Gegenstromverteilung angereichert bzw. getrennt werden.

Die Sequenzen der Peptide (Abb. 1) wurden durch GC/MS-Analysen der trifluoracetylierten und veresterten Partialhydrolysate bestimmt. Das Molekulargewicht der Hexapeptide wurde auch durch Felddesorptions-Massenspektrometrie ermittelt. Die  $\alpha$ -Verknüpfung des Valinols konnte durch Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster mit denjenigen von synthetischem L-Gln-Valinol und L-Glu(Valinol)NH<sub>2</sub> gezeigt werden, wobei eine außergewöhnliche, quantitativ verlaufende  $\alpha/\gamma$ -Transpeptidierung beobachtet wurde.

Mit den verwendeten Methoden gelang es auch, ausreichende Mengen definierter Partialsequenzen für <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen und Aktivitätsstudien zu gewinnen. Nach CD-Messungen befindet sich der helicale Anteil des Trichotoxins, ähnlich wie bei Alamethicin<sup>[9]</sup>, im N-terminalen Dodecapeptid. – Die Reinigungs-, Spaltungs- und Sequenzierungsmethoden sind auf alle Aib-haltigen Peptid-Antibiotica (Alamethicine, Suzukacilline u. a.) anwendbar.

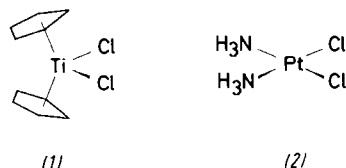
Eingegangen am 12. März 1979 [Z 226]

- [1] A. I. Mueller, D. O. Rudin, *Nature* 217, 713 (1968).
- [2] G. Boheim, K. Janko, D. Leibfritz, T. Ooka, W. A. König, G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta* 433, 182 (1976).
- [3] G. Boheim, G. Irmscher, G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta* 507, 485 (1978), zit. Lit.
- [4] a) J. W. Payne, R. Jakes, B. S. Hartley, *Biochem. J.* 117, 757 (1970); b) Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, I. V. Kozhevnikova, *Zh. Obsheh. Khim.* 41, 2085 (1971); c) R. C. Pandey, J. C. Cook, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8469 (1977); d) D. R. Martin, R. J. P. Williams, *Biochem. J.* 153, 181 (1976).
- [5] G. Jung, W. A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko, G. Boheim, *Biochim. Biophys. Acta* 433, 164 (1975).
- [6] G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim, G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta* 507, 470 (1978).
- [7] G. Jung, H. Brückner, B. Oertel, *Abstr. Symp. on Chemistry of Peptides and Proteins*, Grainau 1978, S. 165.
- [8] a) K. Kruse, W. Francke, W. A. König, *J. Chromatogr.* 170, 423 (1979); W. A. König, W. Rahn, J. Eyem, *ibid.* 133, 141 (1977); b) S. Yamada, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.* 12, 1525 (1964).
- [9] G. Jung, N. Dubischar, D. Leibfritz, *Eur. J. Biochem.* 54, 395 (1975).

## Titanocen-dichlorid – das erste Metallocen mit cancerostatischer Wirksamkeit<sup>[\*\*]</sup>

Von Hartmut Köpf und Petra Köpf-Maier<sup>[\*]</sup>

Dichlorobis( $\eta^5$ -cyclopentadienyl)titan(IV) (Titanocen-dichlorid) (1), seit 25 Jahren bekannt<sup>[1]</sup>, blieb hinsichtlich seiner cytostatischen Wirksamkeit unerforscht. Eine solche hielten wir für möglich, da (1) wie das prominente Antitumor-Agens<sup>[2]</sup> cis-Diammindichloroplatin(II) (2) eine cis-Dichlorometall-Gruppierung im Neutralkomplex enthält.



Weitere chemische Analogien zwischen (1) und (2) bestehen z. B. in der Fähigkeit zur hydrolytischen Dimerisierung über Oxo-<sup>[3]</sup> oder Hydroxo-Brücken<sup>[4]</sup> und in der selektiv zu den

[\*] Prof. Dr. H. Köpf  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie  
der Technischen Universität  
Straße des 17. Juni 135, D-1000 Berlin 12  
Dr. P. Köpf-Maier  
Anatomisches Institut der Freien Universität  
Königin-Luise-Straße 15, D-1000 Berlin 33

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Pentasulfid-Chelaten (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>TiS<sub>5</sub><sup>[5]</sup> bzw. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Pt(S<sub>5</sub>)<sub>3</sub>]<sup>[6]</sup> führenden Reaktion mit wäßrigem Ammoniumpolysulfid.

Zur Prüfung der Antitumor-Aktivität von (1) implantierten wir in bisher fünf Versuchsreihen weiblichen CF<sub>1</sub>-Mäusen je etwa 6 · 10<sup>6</sup> Ehrlich-Ascites-Tumorzellen<sup>[7]</sup> durch intraperitoneale (i.p.) Injektion und applizierten gleichfalls i.p. 24 h post transplantationem (p.t.) verschiedene Mengen (1) oder (2) in 0.4 ml Flüssigkeit (Dimethylsulfoxid und physiologische Kochsalz-Lösung 1:9 (v/v)).

In einem repräsentativen Versuch wurden 84 Mäuse in Gruppen zu sechs Tieren zusammengefaßt und mit (1) in Dosen zwischen 10 und 140 mg/kg behandelt. Abbildung 1 zeigt die Zahl der Tumortodesfälle und der Toxizitätstodesfälle sowie den Anteil an überlebenden, offensichtlich geheilten Tieren bis zum 30. Tag p.t. Zwölf Tiere dienten als unbehandelte Kontrollen (0.4 ml DMSO-NaCl-Lösung; Exitus infolge Tumorentwicklung im Mittel 14.25 Tage p.t.). Als Positivkontrolle führten wir weitere sechs Tiere mit (10 mg/kg (2); keine makroskopisch erkennbare Tumorentwicklung bis zum 30. Tag p.t.).

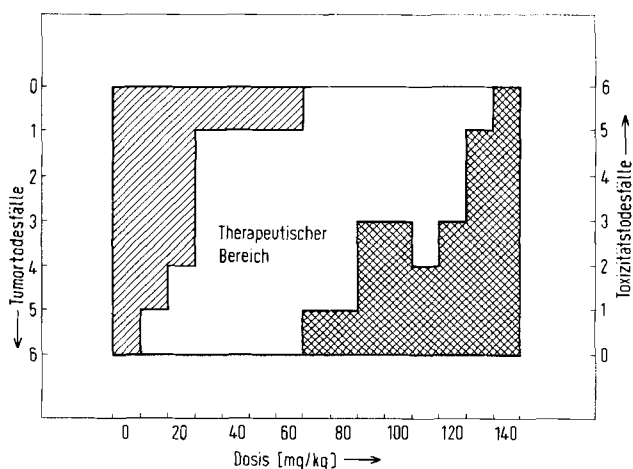


Abb. 1. Überlebensquote von Mäusen am 30. Tag nach Tumortransplantation und 29. Tag nach Behandlung mit den auf der Abszisse angegebenen Dosen von (1). ▨ Tumortodesfälle ohne Anzeichen von Substanztoxizität. ▩ Toxizitätstodesfälle (Todesfälle innerhalb von 8 Tagen p.t. ohne makroskopisch sichtbare Tumorentwicklung). □ Überlebende Tiere am 30. Tag p.t. (therapeutischer Bereich).

Aus anderen Versuchsreihen sind mit (1) behandelte Mäuse inzwischen zehn Wochen ohne Anzeichen einer Tumorentwicklung am Leben.

Nach diesen Ergebnissen ist (1) ein wirksames Antitumor-Agens mit einer Heilungsquote im therapeutischen Bereich von über 80%. (1) ist zugleich der erste Titan-Komplex und das erste Metallocen-Derivat mit cytostatischen Eigenschaften – voraussichtlich ohne die bei (2) beobachtete Schwermetalltoxizität.

Eingegangen am 14. Februar 1979 [Z 227]

CAS-Registry-Nummern:  
(1): 1271-19-8 / (2): 15663-27-1.

- [1] G. Wilkinson, J. M. Birmingham, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4281 (1954).
- [2] B. Rosenberg, L. VanCamp, T. Krigas, *Nature* 205, 698 (1965); Übersicht: F. K. V. Leh, W. Wolf, *J. Pharm. Sci.* 65, 315 (1976).
- [3] U. Thewalt, G. Schleußner, *Angew. Chem.* 90, 559 (1978); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17, 531 (1978).
- [4] R. Faggiani, B. Lippert, C. J. L. Lock, B. Rosenberg, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 777 (1977).
- [5] H. Köpf, B. Block, *Chem. Ber.* 102, 1504 (1969).
- [6] H. Köpf, I. Sasmita-Wiramihardja, R. Goldmann, unveröffentlicht; vgl. R. Goldmann, Dissertation, Technische Universität Berlin 1978.
- [7] Für den Tumorstamm danken wir Prof. Dr. E. Liß, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.