

crystallization was 156, 162, 171 and 183 respectively). The radioactivity corresponding to testosterone could not be recrystallized to constant specific activity. This was probably due to the presence of 17α -hydroxyprogesterone, which also migrated to the same place in the two thin-layer chromatographic systems employed in this study. The proportions of the individual oxidation products varied from one incubation to the next and differed somewhat from those reported by MENON et al.¹³ for the oxidation products of cholesterol.

It is possible that the differences in the proportions of the products were due to the presence of variable amounts of extramitochondrial steroid dehydrogenases and isomerases in the mitochondrial preparations¹⁵.

Previous workers had demonstrated an absolute requirement for pyridine nucleotide, preferably NADPH, for the oxidation of cholesterol by the mitochondria of rat testes¹¹ and adrenals¹⁶. Table II compares the yields of oxidation products obtained for β -sitosterol and cholesterol in response to the addition of increasing amounts of NADPH to the incubation medium. There is sufficient similarity in the extent of oxidation of cholesterol and β -sitosterol to conclude that the two sterols are affected by the same enzyme systems.

Although no attempt was made to recover the cleaved-off portion in this study, on the basis of the reported characteristics of the enzyme system¹⁵, it may be assumed that the fragment was released in one piece. Furthermore, radio-gas chromatography failed to reveal the conversion of β -sitosterol-4-¹⁴C into cholesterol or any other C₂₇ sterol⁷.

The above demonstrated mechanism of plant sterol oxidation would be expected to operate also in the adrenal tissue, as it is known to convert cholesterol to progester-

one via a comparable pathway¹⁵. Hence the observed conversion of ³H-sitosterol into cortisol in the guinea-pig¹⁰ may also have taken place without the formation of cholesterol as an intermediate. Because of the limited mass of the tissue in the gonads and in the adrenals, these organs would not be expected to contribute much to the balance of the plant sterol in the animal body¹⁷.

Résumé. Les mitochondries des cellules testiculaires de rat convertissent le β -sitostérol-4-C¹⁴ en prégnénolone et progestérone. Comme celle du cholestérol, l'oxydation du β -sitostérol en composés stéroïdiens est stimulée par le NADPH. La radio-chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes n'indique aucune conversion du β -sitostérol en cholestérol ou en stéroïdes à 27 carbones dans les conditions étudiées.

M. T. R. SUBBIAH¹⁸ and A. KUKSIS

Department of Biochemistry and Banting and
Best Department of Medical Research, University of
Toronto, 112, College Street,
Toronto (Ontario, Canada M5G 1L6), 19 November 1974.

¹⁵ L. T. SAMUELS and K. B. EIK-NES, in *Metabolic Pathways* (Ed. D. M. GREENBERG; Academic Press, New York 1968), vol. 2, p. 169.

¹⁶ I. D. K. HALKERSTON, I. EICHORN and O. HECTER, *J. biol. Chem.* 236, 374 (1961).

¹⁷ These studies were supported by grants from the Ontario Heart Foundation, Toronto, Ontario and the Medical Research Council of Canada.

¹⁸ Present address: Cardio Vascular Research Unit, Mayo Clinic and Mayo Foundation, Rochester, Minnesota, USA.

Antibiotisch wirksame Tripeptide der Sequenz L-Arg-D-X-L-Phe

Antibiotically Active Tripeptides of the Sequence L-Arg-D-X-L-Phe

Nachdem LÖFFLER et al.¹ ein antibiotisch aktives Tripeptid der Sequenz L-Arg-D-allo-Thr-L-Phe aus dem Kulturmedium des Dermatophyten *Keratinophyton terreum* isoliert hatten, stellte sich die Frage nach dem Wirkungsmechanismus dieses Antibiotikums. Als Hilfsmittel zur Klärung dieser Frage wurde eine Sequenzvariation durchgeführt. Dabei wurde das D-allo-Threonin unter Beibehaltung der Restsequenz durch andere D-Aminosäuren ersetzt.

Material und Methoden. 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.

Alle t-Boc-Aminosäuren wurden nach SCHNABEL² und Z₃-L-Arginin nach WÜNSCH et al.³ hergestellt. Die Aktivitätsmessungen wurden an den von LÖFFLER et al.¹ verwendeten Testorganismen mit Hilfe des Plattendiffusionstests⁴ durchgeführt. Folgende Tripeptide wurden synthetisiert und getestet:

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1. L-Arg-D-Ala-L-Phe; | 5. L-Arg-D-Phe-L-Phe; |
| 2. L-Arg-D-Asn-L-Phe; | 6. L-Arg-D-Ser-L-Phe; |
| 3. L-Arg-D-Glu-L-Phe; | 7. L-Arg-D-Tyr-L-Phe; |
| 4. L-Arg-D-Leu-L-Phe; | 8. L-Arg-D-Val-L-Phe. |

Ergebnisse und Diskussion. Von den 8 synthetisierten Tripeptiden mit variiertem Mittelposition waren 5 antibiotisch aktiv. Ihre Aktivität erstreckte sich jedoch nur auf Fungi und einige pathogene Pilze. Sowohl grampositive als auch gram-negative Bakterien wurden von diesen Peptiden nicht angegriffen. Dieses Verhalten der synthetischen Peptide stimmt mit dem des von LÖFFLER et al.¹ isolierten Peptids überein.

Die nachfolgenden Testergebnisse enthalten die Werte für den Pilz *Paecilomyces varioti*. Die Tests wurden durchweg auf Komplexmedium (Malzextrakt⁵) durchgeführt. Für die 5 aktiven Tripeptide konnte bei *Paecilomyces varioti* die folgenden minimalen Hemmkonzentrationen ermittelt werden:

L-Arg-D-Ala-L-Phe	1,7 mg/ml;
L-Arg-D-Tyr-L-Phe	0,9 mg/ml;
L-Arg-D-Val-L-Phe	1,5 mg/ml;
L-Arg-D-Phe-L-Phe	0,12 mg/ml;
L-Arg-D-Leu-L-Phe	1,2 mg/ml.

Die Tripeptide 2, 3 und 6 zeigten keinerlei antibiotische Aktivität.

Im Kreuztest⁶ zeigte sich, dass die Hemmwirkung der Peptide nur dann aufgehoben wird, wenn man die der im Peptid in Mittelposition befindlichen D-Aminosäure ent-

sprechende L-Aminosäure als Gegenkomponente anbietet. Die Messungen im Kreuztest erbrachten folgende Daten:

Peptid:L-Aminosäure	Verhältnis
L-Arg-D-Ala-L-Phe:L-Ala	= 1:1
L-Arg-D-Val-L-Phe:L-Val	= 1:1
L-Arg-D-Leu-L-Phe:L-Leu	= 1:2
L-Arg-D-Tyr-L-Phe:L-Tyr	= 1:2
L-Arg-D-Phe-L-Phe:L-Phe	= 1:6

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine deutliche Übereinstimmung mit den Resultaten, die LÖFFLER et al.¹ bei Experimenten mit dem von ihnen isolierten Peptid erhalten haben. Darüber hinaus wird aus der vorliegenden Arbeit deutlich, dass D-allo-Thr auch durch andere D-Aminosäuren in der obigen Sequenz ersetzt werden kann. Weiter wird augenfällig, dass die antibiotische Aktivität der Peptide desto grösser wird je hydrophober die eingesetzten D-Aminosäuren sind. Trifunktionelle, aliphatische D-Aminosäuren sind unwirksam, obwohl das natürliche Peptid (mit D-allo-Thr) antibiotisch aktiv ist. Die Kreuztestergebnisse lassen darauf schliessen, dass die mittelständige D-Aminosäure ein wirksames Prinzip der Tripeptide darstellt.

Die antibiotische Aktivität der 5 wirksamen, synthetischen Peptide erstreckt sich auf folgende Mikroorganis-

men: *Paecilomyces varioti*, *Mucor miehei*, *Candida albicans*, *Candida pseudotropicalis*, *Geotrichum candidum*, *Nematospora corylii* und *Torulopsis glabrata*.

Summary. Five tripeptides with the sequence L-Arg-D-X-L-Phe showed antibiotic activity on fungi and on some pathogenic moulds. The action of the peptides could be neutralized in the cross-strip test by the L-amino acid corresponding to the D-amino acid in the middle position.

K. EISELE⁷

Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Hoppe-Seyler Strasse 1, D-74 Tübingen (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 12. Februar 1975.

- ¹ W. A. KÖNIG, W. LÖFFLER, W. H. MEYER und R. UHMANN, Chem. Ber. 106, 816 (1973).
- ² E. SCHNABEL, Justus Liebig's Annln. Chem. 702, 188 (1967).
- ³ E. WÜNSCH und G. WENDELBERGER, Chem. Ber. 100, 160 (1967).
- ⁴ H. ZÄHNER, in *Biologie der Antibiotika* (Heidelberger Taschenbücher, Springer Verlag 1965), vol. 5, p. 22.
- ⁵ B. HALLER und W. LÖFFLER, Arch. Mikrobiol. 65, 181 (1969).
- ⁶ H. ZÄHNER, in *Biologie der Antibiotika* (Heidelberger Taschenbücher, Springer Verlag 1965) vol. 5, p. 27.
- ⁷ Frau Dr. A. M. FRETZDORFF danke ich für die Ausführung aller Analysen, Frau S. WALKER für die technische Assistenz.

Inflamed Gingivae Contain more free Lysosomal Enzyme

Evidence that lysosomes could play a role in chronic inflammatory processes comes especially from studies on joint rheumatoid diseases¹⁻³ and from in vitro experiments⁴⁻⁸. High levels of acid phosphatase and cathepsin D, apparently independent of increased cellularity, were found in rheumatoid synovial membranes when compared with normal synovial tissue²⁻³. Furthermore, in model experiments, cathepsin D has been shown to be largely responsible for the degradation of articular cartilage⁴.

We now present evidence that a very common inflammatory process, periodontal inflammation (gingivitis and periodontitis), is accompanied by a significant increase in free lysosomal hydrolases.

Periodontal inflammation is responsible for the loss of about one half of the total number of teeth extracted throughout the world⁹. The inflammation starts at the gingival margin (gingivitis) and is caused by excessive amounts of bacteria colonizing on the tooth surface close to the gingiva, the bacterial 'plaque'¹⁰. Probably in association with immunological mechanisms¹¹, the disease leads to a progressive destruction of the tissues supporting the teeth. The severity of the disease can be assessed clinically by various types of indices. Among these, the gingival index of inflammation¹², and the amount of crevicular exudate^{13,14}, are measures of the degree of inflammation of the gingiva itself, while the depth of the pockets is a criterion for the destruction of the deeper periodontal structures (connective and bone tissues).

The release of lysosomal enzymes has been studied in vitro using cultures of leucocytes^{5,6} and macrophages^{7,8}. In vivo, however, with the exception of what has been observed in experimentally induced inflammatory lesions^{15,16}, a clear demonstration of an extra-lysosomal liberation of enzymes in a naturally occurring pathological situation is still lacking.

Material and methods. Samples of marginal gingiva were obtained during tooth extraction and periodontal surgery from 35 patients after measuring in the biopsy area the degree of gingival inflammation, the flow of gingival exudate and the depth of the periodontal pockets (average of 3 measurements). The biopsies were chilled in ice-cold 0.25 M sucrose and washed in the same solution to remove blood. After weighing, the gingiva was finely minced with scissors and homogenized with a motor-driven, loose-clearance, all-glass homogenizer. The homoge-

- ¹ G. WEISSMANN, New Engl. J. Med. 286, 141 (1972).
- ² M. LUSCOMBE, Nature Lond., 197, 1010 (1963).
- ³ K. D. MURDEN, Ann. rheum. Dis. 31, 265 (1972).
- ⁴ P. D. WESTON, A. J. BARRETT and J. T. DINGLE, Nature, Lond. 222, 285 (1969).
- ⁵ L. J. IGNARRO and C. COLOMBO, Nature New Biol. 239, 155 (1972).
- ⁶ R. B. ZURIER, S. HOFFSTEIN and G. WEISSMANN, J. cell. Biol. 58, 27 (1973).
- ⁷ R. PAGE, P. DAVIES and A. C. ALLISON, Archs oral Biol. 18, 1481 (1973).
- ⁸ C. J. CARDELLA, P. DAVIES and A. C. ALLISON, Nature, Lond. 247, 46 (1974).
- ⁹ J. WAERHAUG, in *World Workshop in Periodontics* (The University of Michigan, Michigan 1966).
- ¹⁰ D. F. G. POOLE and H. N. NEWMAN, Nature, Lond. 234, 329 (1971).
- ¹¹ J. J. OPPENHEIM and J. E. HORTON, in *Comparative Immunology of the Oral Cavity* (Eds. S. MERGENHAGEN and H. SHERP; U.S. Department of Health, Bethesda 1973).
- ¹² H. LÖE and J. SILNESS, Acta odont. scand. 21, 535 (1963).
- ¹³ A. VALAZZA, J. MATTER, A. OGILVIE and G. CIMASONI, Rev. mens. Suisse Odonto-stomat. 82, 824 (1972).
- ¹⁴ G. CIMASONI, *The Crevicular Fluid in Monographs in Oral Science* (Karger Press, Basel 1974), p. 92.
- ¹⁵ E. ARRIGONI-MARTELLI and A. RESTELLI, Eur. J. Pharmac. 19, 191 (1972).
- ¹⁶ J. T. DINGLE, J. Bone Joint Surg. 55B, 87 (1973).