

Topochemische Untersuchungen an Peptidsystemen^[**]

Von M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov und V. T. Ivanov^[*]

Für topochemische Untersuchungen wurden Analoga natürlich vorkommender Peptide synthetisiert, an denen sich zeigen ließ, bis zu welchem Grad das biologisch aktive Peptid-System und der entsprechende Rezeptor stereoelektronisch komplementär sein müssen. Für die Depsipeptid-Antibiotika und ihre topochemischen Analoga wird die Brauchbarkeit derartiger Verbindungen bei Untersuchungen über die physikalisch-chemischen Grundlagen der Wirkungsweise biologischer Membranen demonstriert. Topochemische Prinzipien lassen sich auch anwenden, um spezifische kompetitive Inhibitoren für proteolytische Enzyme zu gewinnen.

1. Einleitung

Die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung biologisch aktiver Verbindungen ist ein Hauptproblem der modernen Chemie und Biologie. Die genaue Kenntnis dieser Beziehung ist nicht nur für die rationelle Suche nach Verbindungen mit wertvollen physiologischen Eigenschaften wichtig, sondern auch für die Aufklärung des Mechanismus der Wechselwirkung zwischen einer biologisch aktiven Substanz und ihrem zugehörigen Rezeptor.

Voraussetzung für eine derartige Wechselwirkung ist einerseits, daß sich die Moleküle in ihren sterischen Eigenschaften entsprechen und andererseits, daß sie „passende“ Elektronendichteverteilungen haben. Wird die zweite Bedingung nicht erfüllt, dann verringert sich die Wechselwirkung um einige Größenordnungen oder tritt gar nicht mehr auf. Man muß also sowohl bei der rationellen Suche nach Verbindungen mit ähnlichen, modifizierten oder entgegengesetzten biologischen Eigenschaften als auch beim Versuch, ihre Wirkungsweise zu verstehen, die stereo-elektronischen Anforderungen kennen, die die an einem biologischen Prozeß teilnehmenden Moleküle aneinander stellen.

Um diese Anforderungen zu ermitteln, variiert man im allgemeinen das biologisch aktive Molekül schrittweise und stellt anschließend fest, wie sich die Strukturänderungen auf die biologische Wirksamkeit auswirken. Dieses weitgehend empirische Verfahren, das allerdings im Anfangsstadium dieser Untersuchungen das einzig sinnvolle war, erwies sich natürlich als nicht sehr wirkungsvoll. Nur gelegentlich erhielt man greifbare Resultate und noch seltener ergaben sich Vorstellungen, die es gestattet hätten, Voraussagen zu treffen.

Peptidsysteme bilden in dieser Hinsicht keine Ausnahme, und die empirischen Methoden sind noch immer weit verbrei-

tet. In biologisch aktiven Peptiden, hauptsächlich Hormonen und Antibiotika^[1-3], wird häufig eine Aminosäure durch eine andere ersetzt. Während des vergangenen Jahrzehnts wurden hunderte derartiger Verbindungen synthetisiert, doch erwiesen sich die meisten als völlig inaktiv. Einige aktive Verbindungen, von denen manche sogar die Ausgangsverbindung an Aktivität übertrafen, sind zwar auf diese Weise gefunden worden – und einige werden auch praktisch verwendet –, aber rationelle Methoden konnten sich aus einem derartigen Verfahren nicht entwickeln. Zur Klärung der Prinzipien, die das Verhalten biologisch aktiver Verbindungen bestimmen, war dieses Verfahren noch weitaus weniger geeignet; bestenfalls ließen sich einige begrenzte Zusammenhänge erkennen (vgl. z. B.^[4]).

Auch unsere Arbeiten über die Beziehung zwischen Struktur und antibakteriellem Verhalten der Enniatin-Antibiotika^[5-7] trugen zunächst empirischen Charakter. Es gelang jedoch, erste topochemische Gesetzmäßigkeiten zu erkennen. Weitere Versuche zeigten, daß sich die Prinzipien auf zahlreiche cyclische und lineare Peptidsysteme anwenden lassen.

2. Enniatin-Antibiotika und ihre Analoga

Die Untersuchungen begannen mit der Synthese linearer und cyclischer Analoga der Enniatin-Antibiotika, die sich in der Größe der Kette oder des Rings sowie in der Art und Konfiguration der Amino- und Hydroxysäurereste unterschieden.

Wie Tabelle 1 zeigt, hängt die antibakterielle Aktivität dieser Cyclodepsipeptide stark von der Ringgröße ab. Cyclohexadepsipeptide [die natürlich vorkommenden Antibiotika (2) und (6) und ihre Analoga (3), (7) und (8)] haben die höchsten Aktivitäten und die brei-

[1] J. Meienhofer, Chimia (Zürich) 16, 385 (1962).

[2] H. C. Beyerman, A. van de Linde u. W. Maassen van den Brink: Peptides. Proceedings of the Eighth European Peptide Symposium. North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1967, S. 197ff.

[3] E. Schröder u. K. Lübke: Peptides. Academic Press, New York 1965.

[4] R. Walter, J. Rudinger u. I. S. Schwartz, Amer. J. Med. 42, 653 (1967).

[5] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin u. V. T. Ivanov, Tetrahedron Letters 1962, 301.

[6] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin u. V. T. Ivanov, Tetrahedron Letters 1963, 885.

[7] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin u. V. T. Ivanov, Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. chim. 1965, 1623.

[*] Prof. M. M. Shemyakin, Prof. Yu. A. Ovchinnikov,
Dr. V. T. Ivanov
Institute for Chemistry of Natural Products
Academy of Sciences of USSR
Moskau/UdSSR, Ul. Vavilova, 32

[**] Erweiterte Fassung von Vorträgen während des VIII. Europäischen Symposiums über Peptidchemie (Nordwijk 1966), der I. und II. Bürgerstockkonferenz (1966 und 1967) sowie des I. All-Union-Symposiums in Riga (1967).

Tabelle 1 [a]. Antibakterielle Aktivität der Enniatine und einiger ihrer Analoga [b].

Nr.	Verbindung	Minimale wuchs hemmende Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)				
		Staph. aureus	Sarcina lutea	Bac. mycoides	Mycob. phlei	Cand. albicans
(1)	(L-MeVal-D-HyIv) ₂	>100	>100	>100	>100	>100
(2)	(L-Melle-D-HyIv) ₃ Enniatin A	1.5	2.5	4.5	1.5–2.5	6.0
(3)	L-Melle \rightarrow L-MeVal	2.0	4.5	9.0	1.5–2.0	9.0
(4)	(D-Melle-L-HyIv) ₃ Enantio-enniatin A	1.5	2.5	4.5	1.5–2.5	6.0
(5)	(D-MeVal-L-HyMev) ₃ „falsches“ Enniatin A	75–100	37	75	37	>100
(6)	(L-MeVal-D-HyIv) ₃ Enniatin B	9.0	18	25–37	9–12	9–12
(7)	L-MeVal \rightarrow L-MeLeu	9.0	12	25	9.0	18
(8)	L-MeVal \rightarrow L-Val	25	37–50	50–75	25–37	75
(9)	D-HyIv \rightarrow D-HyIc	>100	50–75	>100	>100	>100
(10)	L-MeVal \rightarrow D-MeVal	>50	>50	>50	>50	>50
(11)	D-HyIv \rightarrow L-HyIv	>50	>50	>50	>50	>50
(12)	(D-MeVal-L-HyIv) ₃ Enantio-enniatin B	9.0	18	25–37	9–12	9–12
(13)	(L-MeLeu-D-HyIv) ₃ Enniatin C	>50	>50	>50	>50	>50
(14)	(L-MeVal-D-HyIv) ₄	3.0	4.5	>100	18–25	>100

[a] Für die Aminosäuren werden die Standardsymbole und -abkürzungen verwendet; Me = Methyl; die Symbole HyIV, HyMev und HyIc stehen für α -Hydroxy-isovaleriansäure, α -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure bzw. α -Hydroxisocapronsäure. Die Pfeile zeigen Substitution einer Amino- oder Hydroxysäure durch eine andere an: Verbindung (7) ist z. B. ein Analogon des Enniatins B, in dem ein *N*-Methyl-L-alanin-Rest durch einen *N*-Methyl-L-leucin-Rest ersetzt ist.

[b] Allen linearen Analoga der hier aufgeführten Verbindungen fehlt die antibakterielle Aktivität völlig.

testen Wirkungsspektren; die Cyclotetra- [(1)] und -oktadepsipeptide [(14)] zeigen entgegengesetztes Verhalten. Weiterhin ist ersichtlich, daß die Struktur der Aminosäurereste innerhalb eines begrenzten Teils der Kette beträchtlich modifiziert werden kann, ohne daß die Aktivität stark abnimmt [Verbindungen (3) und (7)]. Andererseits verursacht eine Änderung der Hydroxysäurereste [vgl. z.B. Verbindung (9)] einen starken Aktivitätsverlust. Schließlich führen Änderungen der Konfiguration von nur einem Amino- oder Hydroxysäurerest [Verbindungen (10) und (11)] zu völligem Verlust der Aktivität [8,9].

Analoge Ergebnisse wurden für das Cyclododekapeptid Valinomycin erhalten [10].

2.1. Topochemie der Enniatine

Diese Resultate zeigen die wichtige Rolle sterischer Faktoren für die biologische Aktivität. Offensichtlich beruht die Wirkung der Enniatin- und Valinomycin-

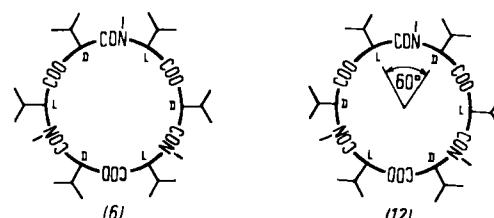
[8] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. A. Kiryushkin, G. L. Zhdanov u. I. D. Ryabova, Experientia 19, 566 (1963).

[9] I. I. Mikhaleva, I. D. Ryabova, T. A. Romanova, T. I. Tarasova, V. T. Ivanov, Yu. A. Ovchinnikov u. M. M. Shemyakin, *Z. obšč. Chim.* 38, im Druck.

[10] M. M. Shemyakin, E. I. Vinogradova, M. Yu. Feigina, N. A. Aldanova, N. F. Loginova, I. D. Ryabova u. I. A. Pavlenko, Experientia 21, 548 (1965).

Antibiotika darauf, daß während des biologischen Prozesses das Peptidmolekül als Einheit einer bestimmten Stelle des Rezeptors entsprechen muß. Wesentlich weitergehende Schlußfolgerungen erlauben die vorliegenden Versuchsergebnisse jedoch nicht. Bei der Suche nach zusätzlichen Informationen wurde gefunden, daß man nicht nur Teile, sondern das gesamte Molekül verändern kann, solange nur die allgemeinen Kennzeichen der räumlichen Struktur, d.h. der Topologie des neuen und des ursprünglichen Moleküls, ähnlich bleiben. Die Elektronendichteverteilungen in den funktionellen Gruppen unterscheiden sich jetzt jedoch mehr oder weniger stark voneinander. Diese „topochemische“ Betrachtungsweise der Beziehung zwischen Struktur und Aktivität ist nicht nur auf Depsipeptide, sondern auch auf Peptide anwendbar (s. Abschnitte 3. und 4.).

Zu den ersten unter topochemischen Gesichtspunkten synthetisierten Verbindungen gehörte das Enantiomere des Enniatins B (6), das Enantio-enniatin B (12), in welchem alle Amino- und Hydroxysäurereste Kon-



figurationen haben, die denjenigen des natürlichen Antibiotikums entgegengesetzt sind.

Da Enantio-enniatin B das Spiegelbild der natürlich vorkommenden Verbindung ist, sollte man erwarten, daß ein stereoselektiver Rezeptor sich den beiden stereochemisch nicht äquivalenten Molekülen gegenüber verschieden verhält. Vorausgesetzt, daß kein grundsätzlich andersartiger Mechanismus für die biologische Wirkung vorliegt (vgl. z.B. das L-Isomere des Antibiotikums Cycloserin^[11]), wäre anzunehmen, daß Enantio-enniatin B biologisch inaktiv ist. Gleiches gilt für die Antipoden natürlich vorkommender Peptide wie Bradykinin^[12, 13], Angiotensin^[14], Oxytocin^[15], Actinomycin C₁^[16] usw.

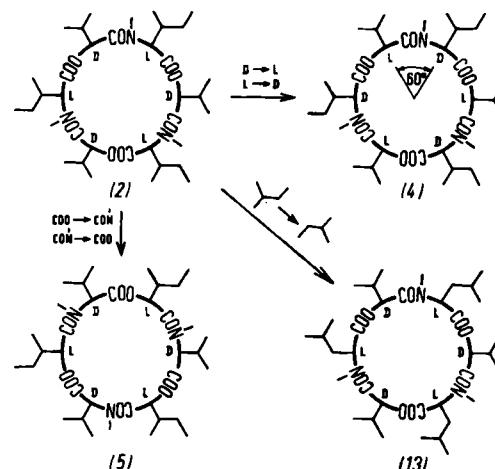
Trotzdem kann aber Enantio-enniatin B eine biologische Aktivität besitzen, die der von Enniatin B gleicht oder nahekommt. Dreht man nämlich eine der Formeln (6) oder (12) in der Zeichenebene um einen Winkel von 60°, dann kommen alle Zentren gleicher Chiralität zur Deckung; jede Estergruppe nimmt den Platz einer N-Methylamidgruppe ein und umgekehrt. Dem Rezeptor gegenüber unterscheiden sich die Antipoden also nicht von der Gestalt, sondern nur von der Struktur her. Die Estergruppe ist jedoch nicht nur räumlich, sondern auch elektronisch ein ziemlich gutes Modell der Amidgruppe^[17, 18]. Die beiden topochemisch ähnlichen Antipoden sollten sich also demselben stereoselektiven Rezeptor gegenüber in gleicher Weise komplementär verhalten, und infolgedessen sollten sie vergleichbare Aktivitäten haben. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestärkt, daß man bei mehreren natürlich vorkommenden Peptiden die Amid- durch die Estergruppen ersetzen kann (und umgekehrt), ohne ihre biologische Aktivität wesentlich zu beeinflussen^[19–23]. Enantio-enniatin B (12) wurde nach den gleichen Methoden wie Enniatin B (6) dargestellt^[6]. Verbindung (12) war in allen physikalisch-chemischen Eigenschaften identisch mit dem Naturprodukt (mit Ausnahme der Rotationsdispersionskurven, die zwar gleichen Verlauf, jedoch entgegengesetzte Vorzeichen

- [11] J. Ciak u. F. E. Hahn, *Antibiotics and Chemotherapy* 9, 47 (1959).
- [12] J. M. Stewart u. D. W. Woolley, *Nature (London)* 206, 619 (1965).
- [13] K. Vogler, P. Lanz, W. Lergier u. W. Haefely, *Helv. chim. Acta* 49, 390 (1966).
- [14] K. Vogler u. R. O. Studer, *Helv. chim. Acta* 48, 1407 (1965).
- [15] G. Flouret u. V. du Vigneaud, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 3775 (1965).
- [16] H. Brockman u. W. Schramm, *Tetrahedron Letters* 1966, 2331.
- [17] R. Huisgen, H. Brade, H. Walz u. I. Glogger, *Chem. Ber.* 90, 1437 (1957).
- [18] R. Huisgen u. H. Ott, *Tetrahedron* 6, 253 (1959).
- [19] L. A. Shchukina, G. A. Ravdel, M. P. Filatova u. A. L. Zhuze, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* 44, 205 (1965).
- [20] L. A. Shchukina, G. A. Ravdel u. M. P. Filatova, *Chim. prirodných Soedinenij* 1966, 265.
- [21] M. M. Shemyakin, L. A. Shchukina, G. A. Ravdel, E. I. Vinogradova u. Yu. A. Ovchinnikov, *Experientia* 22, 535 (1966).
- [22] G. A. Ravdel, M. P. Filatova, L. A. Shchukina, T. S. Pskhina, M. S. Surovikina, S. S. Trapesnikova u. T. P. Egorova, *J. med. Chem.* 10, 242 (1967).
- [23] L. A. Shchukina u. A. L. Zhuze, *Z. obšč. Chim.* 37, 1980 (1967).

hatten). Wie erwartet, zeigten bakterielle Untersuchungen, daß Enantio-enniatin B sowohl qualitativ als auch quantitativ gegenüber allen untersuchten Mikroorganismen dieselbe Aktivität wie Enniatin B besitzt^[24] (s. Tabelle 1).

Dies ist das erste Beispiel für einen polyasymmetrischen Naturstoff, dessen beide Antipoden im gesamten bakteriellen Bereich dieselbe Aktivität haben. Das Ergebnis beweist, daß es in der Wirkungsweise der beiden Verbindungen keine Unterschiede gibt.

Bei Enniatin B und seinem Antipoden handelt es sich allerdings um einen Sonderfall, da die Moleküle sowohl topologisch als auch in der Art ihrer funktionellen Gruppen sehr ähnlich sind. Wenn man – unter Beibehaltung der funktionellen Gruppen – die effektive Größe der Substituenten des Depsipeptidmoleküls variiert, kann man feststellen, bis zu welchem Grad sich die biologisch aktive Verbindung und der Rezeptor topologisch entsprechen müssen. So zeigt z.B. Enantio-enniatin A (4)^[25], der Antipode von Enniatin A (2), dieselbe antibakterielle Aktivität wie die Ausgangsverbindung (s. Tabelle 1).



Dieses Ergebnis überrascht nicht, wenn man die topologische Ähnlichkeit der Valin- und Isoleucin-Seitenketten (bei Enniatin B bzw. A) bedenkt (Verzweigung am β-Kohlenstoffatom in beiden Verbindungen). In der Tat sind die Rotationsdispersionsspektren von Enniatin A (2) und B (6) ähnlich und fast unabhängig vom Lösungsmittel (s. Abb. 1). Dieser Befund zeigt, daß die von den Verbindungen in den verschiedenen Lösungsmitteln bevorzugten Konformationen ähnlich sein müssen^[26].

Ersetzt man aber die N-Methyl-valin-Reste im Enniatin B (oder die N-Methylisoleucin-Reste im Enniatin A) durch N-Methyl-leucin-Reste, dann entsteht das praktisch inaktive Enniatin C (13)^[27] (s. Tabelle 1).

- [24] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov u. A. V. Evstratov, *Nature (London)* 213, 413 (1967).
- [25] Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. V. Evstratov, I. I. Mikhaleva, L. V. Sumskaya u. E. E. Meshcheryakova, noch unveröffentlicht.
- [26] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. K. Antonov, A. M. Shkrob, I. I. Mikhaleva, A. V. Evstratov u. G. G. Malenkov, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 29, 779 (1967).
- [27] Pl. A. Plattner u. U. Nager, *Helv. chim. Acta* 31, 2203 (1948).

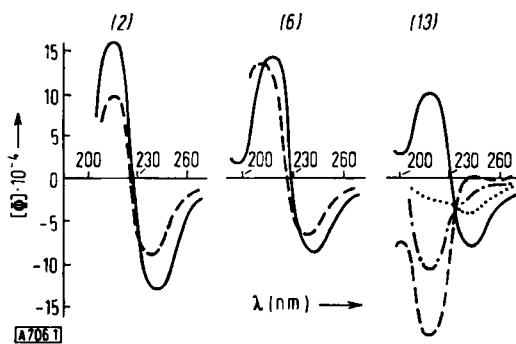


Abb. 1. Rotationsdispersionsspektren von Enniatin A (2), Enniatin B (6) und Enniatin C (13). Lösungsmittel: — Heptan; ····· Hep- tan/Äthanol (94:6); - - - Heptan/Äthanol (92:8); - - - Heptan/ Äthanol (50:50).

Dieser Befund wird anscheinend durch die stereochemische Spezifität der Valin- und Isoleucin-Reste verursacht, deren β -verzweigte Ketten, im Gegensatz zu den γ -verzweigten Ketten des Leucins, einen starken sterischen Abschirmungseffekt ausüben^[28]. Man konnte deshalb erwarten, daß die Seitenketten von Enniatin A und B die relativen Orientierungen der Ringglieder fixieren, so daß eine hinreichend starre Konformation entsteht. Andererseits sollte Enniatin C flexibler sein und damit seine Konformation leichter ändern. Die Rotationsdispersionsspektren von Enniatin A, B und C^[26] bestätigen diese Vermutungen. Wie Abb. 1 zeigt, haben alle drei Enniatine in einem nicht-polaren Lösungsmittel (Heptan) ähnliche Konformationen. Lösungsmittel größerer Polarität (Hep- tan mit steigenden Zusätzen an Äthanol) beeinflussen die Konformationen von Enniatin A und B nur sehr wenig, verändern jedoch die Konformation von Enniatin C erheblich. Offensichtlich nimmt Enniatin C unter biologischen Bedingungen eine Konformation ein, die für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor für Enniatin A und B ungeeignet ist.

In diesem Zusammenhang muß betont werden, daß man bei derartigen topochemischen Analoga natürlich vorkommender Peptide eine biologische Aktivität nur dann erwarten kann, wenn diese Modifikationen keine Änderung der biologisch aktiven Konformation des Peptids zur Folge haben. Da sehr kleine strukturelle Änderungen starke konformative Änderungen hervorrufen können, ist es möglich, daß lediglich auf formalen Strukturprinzipien beruhende Änderungen des Molekülbaus zu einem schlagartigen Wechsel oder zum Verschwinden der biologischen Aktivität führen.

Außer durch Enniatin C wird dieses Verhalten sehr eindrucksvoll durch das Cyclohexadepsipeptid (5)^[25] illustriert. Dieses Depsipeptid entspricht einem Enniatin A, in dem alle Estergruppen durch *N*-Methylamidgruppen ersetzt sind und umgekehrt.

Formal scheinen fast alle Bedingungen für topochemische Korrespondenz erfüllt zu sein, aber die kleinen strukturellen Abweichungen zwischen Verbindung (5) und Enantio-enniatin A (4) oder Enantio-enniatin B (12) reichen aus, um äußerst unterschiedliche Konformationen zu erzeugen (vgl. hierzu die in Abb. 2 gezeigten Rotationsdispersionsspektren).

Die Verbindungen unterscheiden sich deshalb sehr stark in ihren antibakteriellen Eigenschaften. Verbin-

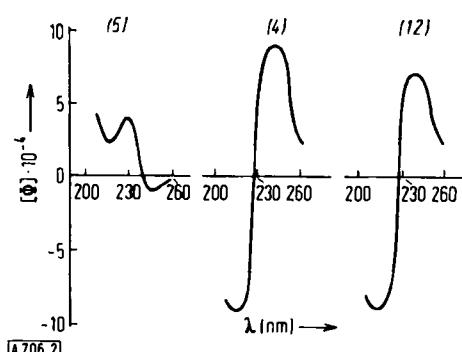
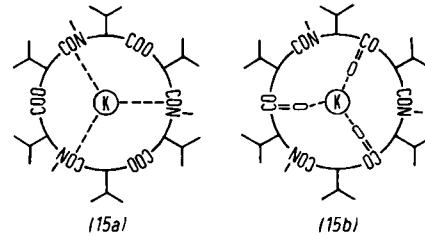


Abb. 2. Rotationsdispersionsspektren von „falschem“ Enniatin A (5), Enantio-enniatin A (4) und Enantio-enniatin B (12). Lösungsmittel: Heptan/Äthanol (50:50).

dung (5) zeigt im Gegensatz zu Enniatin A und B und ihren Enantiomeren eine niedrige Aktivität gegenüber allen untersuchten Mikroorganismen (s. Tabelle 1). Aus diesem Grund wird sie auch als „falsches“ Enniatin A bezeichnet.

2.2. Zur Wirkungsweise der Enniatine

Außer bei den bisher beschriebenen allgemeinen Untersuchungen über Enniatin-Antibiotika erwiesen sich die topochemischen Prinzipien auch beim Studium der Wirkungsweise der Enniatine und anderer Depsipeptid-Antibiotika als nützlich. Nach Pressman können Depsipeptid-Antibiotika selektiv den aktiven Transport einiger einwertiger Ionen in Mitochondrien induzieren^[29, 30]. Pressman und wir fanden bei einer gemeinsamen Untersuchung über einige Valinomycin- und Enniatin-Analoga, daß eine Parallelität zwischen der antibakteriellen Aktivität der Depsipeptide und ihrer Eigenschaft, den aktiven Kationentransport auszulösen (aktiver Transport von Kalium-, nicht jedoch von Natriumionen), besteht. Beide Erscheinungen verlaufen zudem nicht nur qualitativ, sondern bis zu einem gewissen Grade auch quantitativ parallel. Zwischen den antibiotischen Eigenschaften der Depsipeptide und der Wechselwirkung zwischen ihnen und den Rezeptoren (Lipoproteinen) der biologischen Membranen, welche den aktiven Kationentransport kontrollieren, scheint es also einen Zusammenhang zu geben^[8, 10, 31]. Die Depsipeptid-Antibiotika beeinflussen den Ionentransport dabei nicht nur durch stereospezifische Wechselwirkung mit dem Rezeptor der Membran, sondern auch durch Wechselwirkung mit dem entsprechenden Kation. Cyclodepsipeptide scheinen Komplexe mit einwertigen Ionen zu bilden, in denen die Ionen im Inneren des cyclischen Moleküls durch Ionen-Dipol-Wechselwirkung mit den Amid- bzw. Estergruppen festgehalten werden [schematisch wiedergegeben in den Formeln (15a) bzw. (15b)].



[29] C. Moore u. B. C. Pressman, Biochem. biophysic. Res. Commun. 15, 562 (1964).

[30] B. C. Pressman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 1076 (1965).

[31] B. C. Pressman, persönliche Mitteilung.

[28] E. R. Blout, C. de Loze, S. M. Bloom u. C. D. Fasman, J. Amer. chem. Soc. 82, 3787 (1960).

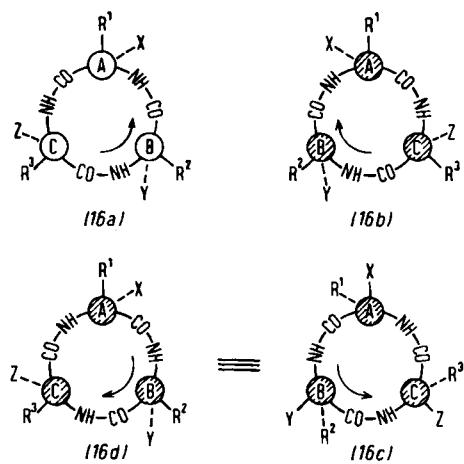
Daß diese Annahmen richtig sind, konnte experimentell gezeigt werden [26, 32, 33]. Es ergab sich nicht nur, daß es in Lösung zur Komplexbildung kommt und daß Estergruppen dabei eine Rolle spielen [*], sondern auch ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der Enniatin-cyclodepsipeptide, Komplexe zu bilden, ihren Konformationen in Lösung und ihrer antibiotischen Aktivität. (Die Komplexe wurden entweder kristallin isoliert oder ihre Bildung in Lösung wurde durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit und der optischen Rotationsdispersion nachgewiesen.)

Die zu einer topochemischen Gruppe gehörenden Verbindungen Enniatin A und B sowie deren Enantiomere bilden leicht Komplexe mit Kaliumionen, während das Cyclohexapeptid (5) im allgemeinen nicht in der Lage ist, Komplexe mit Alkalimetallionen zu bilden. Diese Beobachtung ist mit den Rotationsdispersionspektren und den biologischen Eigenschaften der genannten Verbindungen im Einklang (vgl. Abb. 1 und 2).

Diese Resultate können als Ausgangspunkt für Untersuchungen des Verhaltens von Membranen dienen. Zu den ersten Ergebnissen gehörte die Entdeckung, daß sich die Komplexe zwischen Enniatinen oder Valinomycin und Kationen nur in einem lipophilen Medium bilden [26]. Die Komplexe entstehen also erst an der Membran, nachdem das Depsipeptidmolekül an diese gebunden ist.

3. Topochemische Untersuchungen an weiteren cyclischen Peptiden

Die topochemische Methode ist nicht nur auf derartig hochsymmetrische Systeme wie die Enniatin-Antibiotika anwendbar, sondern eignet sich im Prinzip auch für andere Cyclopeptide, gleichgültig welcher Symmetrie. Dieses wird im folgenden für die Transformationen des hypothetischen Cyclopeptids (16a)



[32] P. Mueller u. D. O. Rudin, Biochem. biophys. Res. Commun. 26, 398 (1967).

[33] H. K. Wipf, L. A. Piota, Z. Stefanac u. W. Simon, Helv. chim. Acta 51, 377 (1968).

[*] Diese Tatsache zeigt, weshalb die biologischen Eigenschaften der Enniatine und des Valinomycins so stark von der Natur der Hydroxysäurereste, nicht aber der Natur der Aminosäurereste beeinflußt werden.

gezeigt. (Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier ein Tripeptid gewählt. Die Schlußfolgerungen gelten jedoch für Ringe jeder Größe und für sämtliche Konfigurationen der Aminosäurereste.)

Die Verbindungen (16a) und (16b) sind Antipoden, und die [mit (16d) identische] Verbindung (16c) ist die Retroform von (16b) mit umgekehrter Richtung der Acylierung. [Nach Prelog bezeichnet man (16b) und (16c) als Cyclodiastereomere [34, 35].] Man sieht sofort, daß die Cyclopeptide (16a) und (16d) topologisch sehr ähnlich sind. Sie unterscheiden sich nur in der Anordnung der Atome der Amidgruppen ($-\text{CO}-\text{NH}-$ und $-\text{NH}-\text{CO}-$); die Verbindungen sind also topochemisch analog. Die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Cyclopeptid (16a) und seinem Retro-enantiomeren (16d) sind besonders gut in Abbildung 3 erkennbar. Verbindung (16d) ist hier als „Schatten“ von Verbindung (16a) gekennzeichnet; man sieht leicht, warum (16d) die Rolle eines „Doubles“ von (16a) in biologischen Prozessen spielen und biologische Eigenschaften haben kann, die denen der Ausgangsverbindung ähneln.

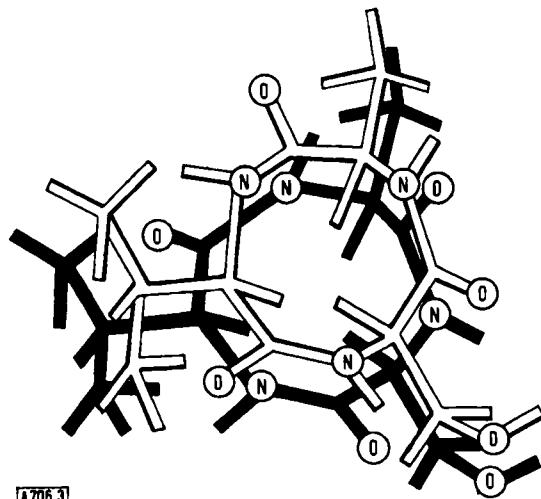


Abb. 3. Strukturelle und räumliche Beziehungen zwischen einem Cyclotripeptid und seinem Retro-enantiomeren.

Einen weiteren Beweis für die Richtigkeit dieser Annahmen [36] liefern das biologisch sehr aktive Gly⁵-Gly¹⁰-Gramicidin S (17) [37, 38] und sein Retro-enantiomeres (18).

Gly⁵-Gly¹⁰-Gramicidin S wurde statt des natürlich vorkommenden Gramicidins S verwendet, da der Verbindung die Prolin-Reste, die bei den topochemischen Transformationen zusätzliche Komplikationen verursachen würden, fehlen. Ein Prolin-Reste enthaltendes Retro-enantiomeres würde sich topochemisch wesentlich stärker von der Ausgangsverbin-

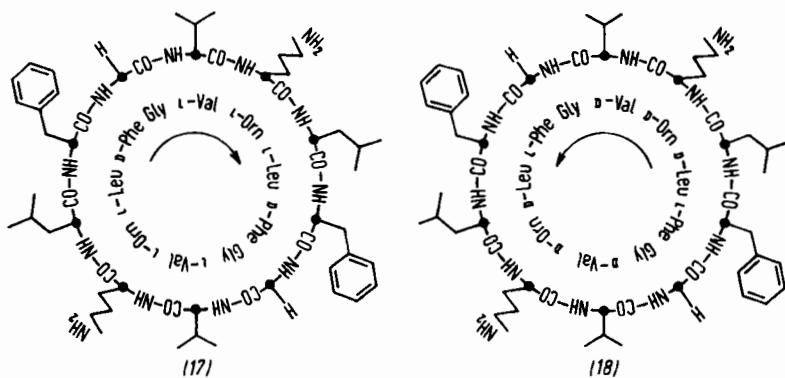
[34] V. Prelog u. H. Gerlach, Helv. chim. Acta 47, 2288 (1964).

[35] H. Gerlach, J. A. Owtschinnikov u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 47, 2294 (1964).

[36] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov u. I. D. Ryabova, Experientia 23, 326 (1967).

[37] H. Aoyagi, T. Kato, M. Ohno, M. Kondo u. N. Izumiya, J. Amer. chem. Soc. 86, 5700 (1964).

[38] H. Aoyagi, T. Kato, M. Ohno, M. Kondo, M. Waki, S. Makisumi u. N. Izumiya, Bull. chem. Soc. Japan 38, 2139 (1965).



dung unterscheiden. Dies sieht man an einem prolinhaltigen Cyclotripeptid; wie Abbildung 4 zeigt, kommen beim Übereinanderlegen der beiden Moleküle die Prolinringe nicht zur Deckung.

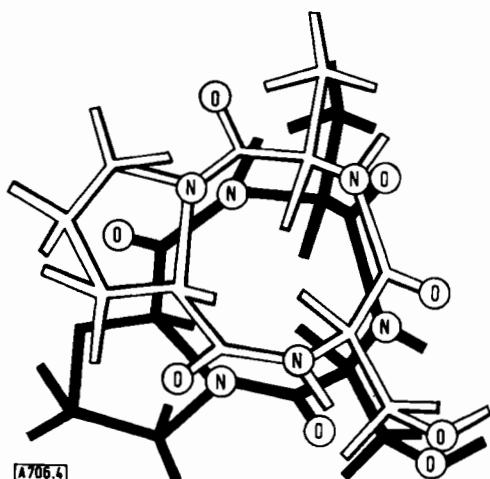


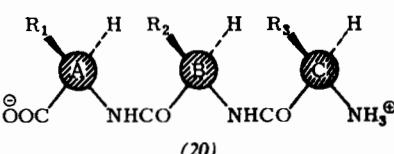
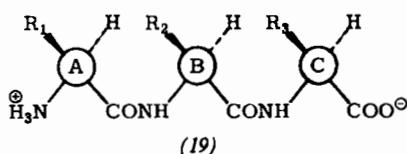
Abb. 4. Topologischer Unterschied zwischen einem prolinhaltigen Cyclotripeptid und seinem Retro-enantiomeren.

Retro-enantio-Gly⁵-Gly¹⁰-Gramicidin S (18) wurde durch stufenweisen Aufbau der Peptidkette bis zum linearen Pentapeptid und anschließendes Cyclisieren durch eine Dimerisierungsreaktion dargestellt. Wie vorhergesagt, hatte die entstandene Verbindung hohe, mit der des Gramicidins S vergleichbare antibakterielle Aktivität.

4. Topochemische Untersuchungen an linearen Peptiden

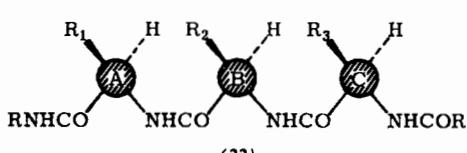
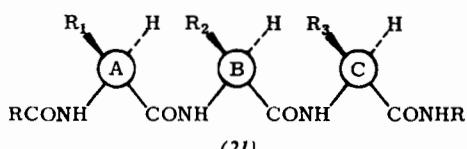
Von besonderem Interesse ist die Ausdehnung der hier diskutierten Prinzipien auf lineare Peptide, da sich dadurch vielleicht neue Möglichkeiten für die Untersuchung zahlreicher wichtiger Peptid-Bioregulatoren ergeben können. Zunächst müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein, wenn die topochemischen Prinzipien auch im Bereich der linearen Peptide anwendbar sein sollen. Beispielsweise lassen sich die Prinzipien nicht auf Peptide mit freien, endständigen Carboxy- und Aminogruppen anwenden. Es bleibt zwar eine gewisse topologische Übereinstimmung bestehen, wenn man das hypothetische lineare Peptid (19) und sein Retro-enantiomeres (20) antiparallel übereinanderlegt, aber die beiden Peptidketten unter-

scheiden sich durch die vertauschten Positionen ihrer geladenen Endgruppen. (Bei Cyclopeptiden können solche Effekte nicht auftreten.) Dieser Unterschied zwischen Verbindungen vom Typ (19) und (20) sollte zu einem unterschiedlichen Verhalten gegenüber dem



Rezeptor führen. Es ist also nicht zu erwarten, daß das Retro-enantiomere (20) die biologische Aktivität des linearen Peptids (19) aufweist. Aus diesem Grund hat wahrscheinlich das von Vogler et al.^[13] und Stewart et al.^[39] synthetisierte Retro-enantio-bradykinin keine wesentliche biologische Aktivität (vgl. auch^[40]). Wahrscheinlich könnte man derartige Schwierigkeiten durch Blockierung der Endgruppen überwinden. Damit würden sich die Moleküle topochemisch genauso entsprechen wie dies bei den Cyclopeptiden beobachtet wurde. Bei den substituierten Amiden der Acylpeptide unterscheiden sich die topochemisch analogen Verbindungen (21) und (22) nur durch die vertauschten Amidgruppen (Endgruppen eingeschlossen).

Man kann also die Suche nach Analoga der biologisch aktiven linearen Peptide ebenfalls nach ratio-



[39] J. M. Stewart u. D. W. Woolley u. E. Erdös, N. Back u. F. Sicuteri: Hypotensive Peptides. Springer-Verlag, New York 1966, S. 23.

[40] D. Chung u. C. H. Li, Biochim. biophys. Actaa 135, 570 (1967).

nellen Gesichtspunkten vornehmen. (Dies gilt besonders für einige Peptidhormone und Antibiotika, z. B. für das α -Melanophoren-stimulierende Hormon, für Gastrin und seine hochaktiven Bruchstücke mit endständigem Kohlenstoffatom sowie für Gramicidin A). Da die Retro-enantiomeren derartiger Peptide nur aus D-Aminosäure-Resten aufgebaut sind, sollten sie der Inaktivierung durch die proteolytischen Enzyme des Organismus widerstehen und infolgedessen eine länger anhaltende biologische Wirkung haben.

Besonders interessant ist die Anwendung der topochemischen Gesichtspunkte auf die Synthese linearer Peptide, die als spezifische Substrate oder Inhibitoren für proteolytische Enzyme geeignet sind. Mit diesen Verbindungen sollte es möglich sein, weitere wertvolle Informationen über die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym zu erhalten.

Dient z. B. das geschützte Peptid (23) als spezifisches Substrat, dann ist die topochemisch analoge Verbindung (24) in ihren hydrophoben Eigenschaften sowie ihren funktionellen Gruppen praktisch gleich; beide Verbindungen (s. Tabelle 2) unterscheiden sich nur durch die vertauschten Atome in den Amidgruppen. Ein Analogon dieser Art [(24)] sollte daher wahrscheinlich mit gleicher Wirksamkeit wie Verbindung (23) am gleichen Ort des Enzyms gebunden werden

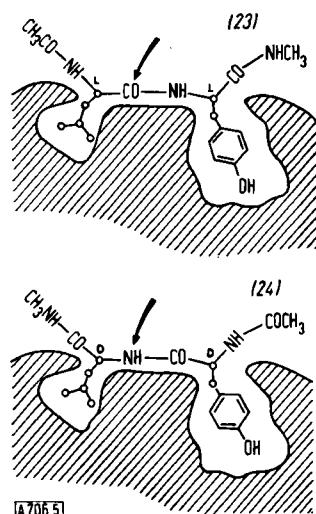


Abb. 5. Schematische Darstellung der Anlagerung eines spezifischen Substrats [Peptid (23)] und seines Retro-enantiomeren [(24)] an ein proteolytisches Enzym.
[A 705]

(s. Abb. 5). Diese Annahme gilt um so mehr, als zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß die hydrophoben Wechselwirkungen die Hauptrolle im Bindungsvorgang spielen. Das aus D-Aminosäuren aufgebaute Retro-enantiomere (24) sollte aber der mit hoher konfigurativer Spezifität verlaufenden enzymatischen Hydrolyse (s. Pfeil) nicht unterliegen (vgl. jedoch^[41]). Eine derartige Verbindung müßte sich also als kompetitiver Inhibitor erweisen. Die Inhibitionskonstante K_I des Inhibitors sollte der Michaelis-Konstanten K_M des entsprechenden Substrats gleichen ($K_I \approx K_M$).

Um diese Überlegungen experimentell zu prüfen, wurden einige an den endständigen Kohlenstoff- und

[41] G. E. Hein u. C. Niemann, J. Amer. chem. Soc. 84, 4487 (1960).

Stickstoffatomen geschützte, Leucin und Tyrosin enthaltende Dipeptide dargestellt [s. Verbindungen (23) bis (29) in Tabelle 2] und eine kinetische Untersuchung ihrer Wechselwirkung mit Pepsin^[42] und Chymotrypsin^[43] durchgeführt. Die nach Lineweaver und Burk ausgewerteten Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2. Kinetische Konstanten der Wechselwirkung zwischen Peptid und Enzym.

Nr.	Peptid	Pepsin (K_M oder K_I , mol/l)	Chymo- trypsin (K_I , mol/l)	
(23)	Ac-Leu-Tyr-NHCH ₃	LL	$K_M = 2.7 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-2}$
(24)	Ac-Tyr-Leu-NHCH ₃	DD	$K_I [a] = 5.8 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$
(25)	Ac-Leu-Tyr-NHCH ₃	LD	$K_I [b] = 1.2 \cdot 10^{-2}$	—
(26)	Ac-Tyr-Leu-NHCH ₃	LD	$K_I [b] = 1.3 \cdot 10^{-2}$	$4.3 \cdot 10^{-2}$
(27)	Ac-Leu-Tyr-NHCH ₃	DL	$K_I [b] = 1.5 \cdot 10^{-2}$	—
(28)	Ac-Tyr-Leu-NHCH ₃	DL	$K_I [b] = 1.8 \cdot 10^{-2}$	—
(29)	Ac-Leu-Tyr-NHCH ₃	DD	$K_I [b] = 7.5 \cdot 10^{-3}$	$> 10^{-1}$

[a] Kompetitive Inhibition. [b] Gemischte Inhibition.

Wie vorhergesagt, erwies sich das Dipeptid (24), das Retro-enantiomere der Verbindung (23), als wirksamer kompetitiver Inhibitor von Pepsin. Die Inhibitionskonstante ist ungefähr so groß wie die Michaelis-Konstante des Substrats.

Ein ähnliches Verhalten wurde für die beiden Peptidpaare (25) und (26) sowie (27) und (28) beobachtet, die in einer Retro-enantiomeren-Beziehung zueinander stehen; ihre K_I -Werte sind praktisch identisch. Diese Resultate sind besonders bedeutsam im Hinblick auf das Verhalten aller Dipeptide (25) bis (29), die keine topochemischen Analoga der Verbindung (23) sind. Ihre Wechselwirkung mit Pepsin kann man nicht durch Gleichungen für kompetitive Inhibition beschreiben. Diese Peptide zeigen „gemischte“ Inhibition, in der die Komponente der nicht-kompetitiven Inhibition stark überwiegt ($\alpha = 1.8-3.2$).

Noch eindeutigere Resultate ergaben sich aus Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen den geschützten Dipeptiden (23), (24), (26) und (29) mit Chymotrypsin. Hier wurde die Inhibitionswirkung der Dipeptide auf die chymotrypsin-katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl-pivalat untersucht. Die Inhibitionskonstanten K_I der Dipeptide können hier direkt verglichen werden; auf die Bestimmung der Michaelis-Konstanten, die nur einen ungefähren Eindruck von der Bindung zwischen Substrat und Enzym gibt, wird hier verzichtet. Wie Tabelle 2 zeigt, stimmen die K_I -Werte für die Retro-enantiomeren (23) und (24) innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen überein. Das Dipeptid (26) wird schwächer an das Chymotrypsin gebunden, und Verbindung (29) [ein Antipode des Dipeptids (23)], die meistens als Inhibitor angesehen wird, hat unter den Versuchsbedingungen keinen Inhibitionseffekt.

Eingegangen am 8. Juli 1968 [A 706]
Übersetzt von Dr. H. Hopf, Karlsruhe

[42] V. I. Tsetlin, E. N. Shepel, V. T. Ivanov u. Yu. A. Ovchinnikov, noch unveröffentlicht.

[43] E. M. Bogomolnaya, N. F. Kazanskaya, I. V. Beresin, V. I. Tsetlin, E. N. Shepel, V. T. Ivanov u. Yu. A. Ovchinnikov, noch unveröffentlicht.