

4. Strukturspezifische Abbau-Reaktionen von Polypeptid-Metall-Komplexen

II. Abbau des Cu^{II} -Polymyxin-B-Komplexes durch H_2O_2 ¹⁾

von H. Erlenmeyer, H. Sigel, H. Ch. Curtius und P. Anders

(4. IX. 65)

Am Beispiel des Polymyxin B haben wir gezeigt, dass die Reaktivität von Polypeptiden gegenüber Wasserstoffperoxid oder ultravioletten Strahlen durch Komplexbildung mit Metallionen wie Cu^{2+} oder Ni^{2+} geändert wird: Während freies Polymyxin B in wässriger Lösung durch die Einwirkung von H_2O_2 oder UV.-Strahlen keine chromatographisch nachweisbare Veränderung erleidet, wird dessen 1:1-Komplex mit Cu^{2+} oder Ni^{2+} unter diesen Bedingungen in chromatographisch gut differenzierbare Bruchstücke gespalten [1].

Diese Wirkung von komplex gebundenen Metallionen kann auf einer Beschleunigung und Lokalisierung der durch H_2O_2 bzw. seine Derivate möglichen Abbau-Reaktionen beruhen. Solche Reaktionen sind von Interesse als Modelle für biologisch relevante Abbauvorgänge an Proteinen (vgl. auch [2]), vor allem aber als neuartige Methodik zur Untersuchung von Proteinstrukturen: Einmal wird der metallkatalysierte H_2O_2 -Abbau ein Polypeptid in andersartige Bruchstücke zerlegen als z. B. ein hydrolytischer Abbau, und damit der Aminosäure-Sequenzanalyse durch den Vergleich «überlappender» Bruchstück-Strukturen neue Möglichkeiten eröffnen. Darüber hinaus könnten sich – aus der Art der Bruchstücke – Aufschlüsse über Nachbarschaftsbeziehungen und Tertiärstruktur des Proteins bzw. seines Metallkomplexes in wässriger Lösung ergeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die bei der Einwirkung von H_2O_2 auf den Cu^{II} -Polymyxin-B-Komplex entstehenden Bruchstücke näher charakterisiert.

Ergebnisse und Diskussion. – In den durch Dünnschicht-Chromatographie (DC; Tab.1) bzw. durch Ionenaustauscher-Chromatographie (IA; Tab. 2) getrennten Abbau-Peptiden finden sich die vier verschiedenen am Aufbau des Dekapeptides Polymyxin B beteiligten Aminosäuren in wechselndem Verhältnis wieder. Die Tabellen enthalten die Fraktionen nach der bei der Trennung auftretenden Folge sowie deren Charakterisierung durch die STEIN & MOORE-Analyse als Oligopeptide (Dekabis Tetrapeptide A bis F).

Die DC-Fractionen 7, 8 und 9 sind offenbar identisch und stellen somit eine einzige Fraktion dar. Sie besteht aus einem Hexapeptid (D), in dem alle vier Aminosäuren des Polymyxins vorkommen. DC-Fraktion 10 enthält neben EDTA (vgl. Exp. Teil) noch wenig α, γ -Diaminobuttersäure, die wahrscheinlich von der DC-Nachbarfraktion 9 herrührt.

DC-Fraktion 1 muss, wie der Vergleich ihres R_f -Wertes mit dem von α, γ -Diaminobuttersäure zeigt, ausser dieser noch weitere Bestandteile enthalten; das Vorhandensein des Isopelargonsäure-Restes in diesem Bruchstück könnte den hohen R_f -Wert im verwendeten Fließmittel erklären.

¹⁾ 3. Mitteilung über Metallionen und H_2O_2 ; vorangegangene Mitteilungen s. [1] und [5].

Tabelle 1. *Dünnschicht-Chromatographie: Gehalt der DC-Fractionen 1 bis 10 an Aminosäuren in μMol ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betr. Peptid.*

| Fraktion _{DC} Nr. | Thr ^{a)} | Leu ^{a)} | D-Phe ^{a)} | Dab ^{a)} | Gesamtzahl der Amino- säuren | Peptid |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|------------------------------------|--------|
| 1 | — | — | — | 0,0380 (1 ?) | 1 | (G) |
| 2 ^{b)} | 0,0155 (1) | 0,0135 (1) | — | 0,0462 (3) | 5 | E |
| 3 | 0,0740 (2) | 0,0337 (1) | 0,0245 (1) | 0,2023 (6) | 10 | A |
| 4 | 0,0612 (2) | 0,0372 (1) | 0,0325 (1) | 0,1795 (5-6) | 9-10 | B |
| 5 | 0,0435 (2) | 0,0255 (1) | 0,0200 (1) | 0,0895 (4) | 8 | C |
| 6 | 0,0210 (1) | 0,0028 (0) | 0,0023 (0) | 0,0625 (3) | 4 | F |
| 7 | 0,0150 (1) | 0,0142 (1) | 0,0120 (1) | 0,0452 (3) | 6 | D |
| 8 ^{b)} | 0,0152 (1) | 0,0152 (1) | 0,0087 (1) | 0,0462 (3) | 6 | |
| 9 ^{b)} | 0,0132 (1) | 0,0117 (1) | 0,0085 (1) | 0,0310 (3) | 6 | |
| 10 | — | — | — | 0,0033 | — | — |

a) Thr = L-Threonin; Leu = L-Leucin; D-Phe = D-Phenylalanin; Dab = L- α,γ -Diaminobuttersäure.

b) Zur Kontrolle aus einem weiteren Ansatz mit dem selben Ergebnis analysiert.

Tabelle 2. *Ionenaustauscher-Chromatographie: Gehalt der IA-Fractionen 3-6 an Aminosäuren in μMol ; in Klammern die berechnete Zahl der jeweiligen Aminosäuremolekeln im betr. Peptid.*

| Fraktion _{IA} Nr. ^{a)} | Thr | Leu | D-Phe | Dab | Gesamtzahl der Amino- säuren | Peptid |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------------|--------|
| 3 | 0,1086 (2) | 0,0724 (1) | 0,0449 (1) | 0,2198 (4) | 8 | C |
| 4 | 0,1269 (2) | 0,0829 (1) | 0,0479 (1) | 0,3978 (6) | 10 | A |
| 5 ^{b)} | 0,0209 (2) | 0,0122 (1) | 0,0193 (1) | 0,0782 (6) | 10 | (A ?) |
| 6 | 0,1077 (2) | 0,0701 (1) | 0,0317 (1) | 0,2327 (5) | 9 | B |

a) Die nicht untersuchten Fraktionen waren dünn-schichtchromatographisch uneinheitlich.

b) Besteht aus offenkettigem «Polymyxin» oder aus «Polymyxin» ohne Fettsäurekomponente.

Es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass die in den einzelnen Fraktionen aufgefundenen Aminosäure-Reste Teile einer zusammenhängenden Kette sind. Das Zustandekommen der verschiedenen Bruchstücke lässt sich alsdann durch die in Fig. 1 dar-

gestellte Reaktionsfolge formulieren, wobei angenommen wird, dass die Oligopeptide mit einer kleineren Gesamtzahl von Bausteinen aus solchen mit einer höheren Gesamtzahl von Bausteinen entstanden sind²⁾.

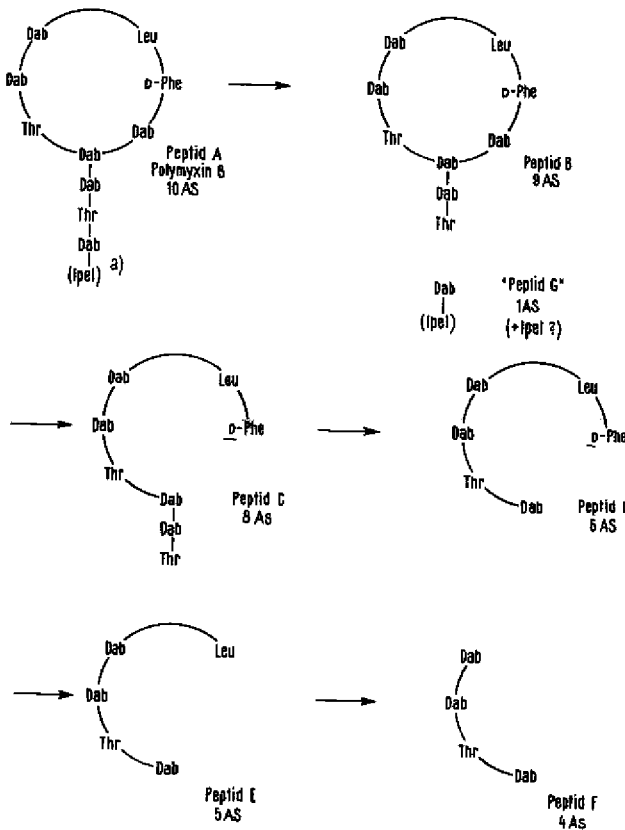


Fig. 1. Überblick über die mögliche Reaktionsfolge bei der Polymyxin-B-Degradation mittels H_2O_2
 a) Ipel = Isopelargonsäure = (+)-6-Methyloctansäure; das verwendete Polymyxin war ein Gemisch aus B_1 (Fettsäure: Ipel) und B_2 (Fettsäure: 6-Methylheptansäure).

Bei der sauren Hydrolyse zerfällt Polymyxin B nach BIHARI-VARGA & NYILASI [4] zunächst in zwei Teile (vgl. Fig. 2); diese beiden Peptide zerfallen dann beim Fortschreiten der Hydrolyse weiter.

Eine saure partiellhydrolyse von Polymyxin B liefert also andere Bruchstücke (Fig. 2) als der Abbau mittels H_2O_2 .

Über die Frage, wie Cu^{2+} im Polymyxin B gebunden wird, lassen sich nur Vermutungen anstellen. Wie wir kürzlich fanden [5], katalysieren offenbar nur solche Cu^{II} -Komplexe den H_2O_2 -Zerfall, bei denen der Ligand höchstens drei Koordinationsstellen des Cu^{2+} besetzt, so dass sich ein ternärer Komplex ausbilden kann. Da

²⁾ Die andere Möglichkeit, dass ein Bruch an verschiedenen Stellen in einem Schritt erfolgt, erscheint auf Grund des vorliegenden Materials unwahrscheinlich. - Zur Struktur und Synthese von Polymyxin B vgl. [3].

der Cu^{II} -Polymyxin-Komplex den H_2O_2 -Zerfall katalysiert, ist anzunehmen, dass Polymyxin nur über drei Koordinationsstellen des Cu^{2+} gebunden ist, bzw. dass die vierte so labil besetzt ist, dass HOO^- dort zu koordinieren vermag³⁾. Wahrscheinlich ist Cu^{2+} über drei Aminosäuren des kleinsten gefundenen Peptid-Bruchstückes F im Polymyxin B fixiert.

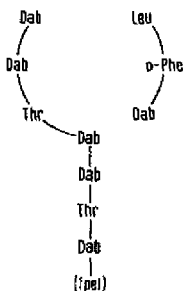


Fig. 2. Primärer Zerfall von Polymyxin bei der sauren Hydrolyse nach BIHARI-VARGA & NYILASI [4]

Mit Kalottenmodellen lässt sich dartun, dass zur Besetzung von drei Koordinationsstellen des Cu^{2+} drei Aminosäuren des Polymyxins notwendig sind⁴⁾, da gleichzeitig Koordination an Amid- und γ -Amino-Gruppe derselben Diaminobuttersäuremolekel bei der tetragonal-planaren Anordnung sterisch nicht möglich ist. Die vierte Koordinationsstelle könnte nur durch Ausbildung eines Makrochelatrings besetzt werden. Die schematische Fig. 3 zeigt – unter der Annahme, dass Cu^{2+} über Aminosäuren des kleinsten gefundenen Peptides F gebunden ist – eine mögliche Konfiguration des Cu^{II} -Polymyxin-Komplexes.

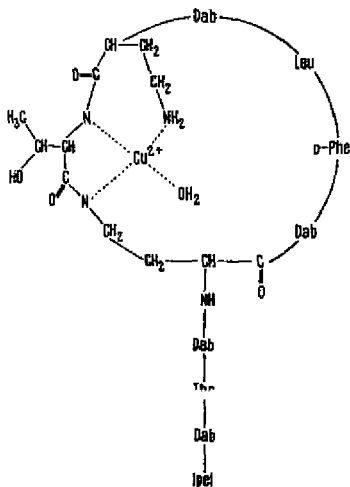


Fig. 3 Mögliche Konfiguration des Cu^{II} -Polymyxin-Komplexes

³⁾ Dass die Reaktion über einen ternären Komplex verläuft, ist anzunehmen (vgl. z. B. [5] [6]); beim Polymyxin ist ein solcher wahrscheinlich, wie spektrophotometrische Untersuchungen zeigen, über die später berichtet werden soll.

⁴⁾ Dass an der Koordination zwei Amidgruppen beteiligt sind, ist sehr wahrscheinlich [7].

Es ist zu vermuten, dass die Spaltung durch den H_2O_2 -Komplex möglicherweise über eine oxydative Desaminierung erfolgt⁵⁾.

Über den Reaktionsmechanismus – besonders über die Frage, ob Radikale frei auftreten oder ob die Reaktion in der Koordinationssphäre des Metallions erfolgt – wird sich erst auf Grund von Modellversuchen eine Vorstellung gewinnen lassen.

Experimenteller Teil

I. Polymyxin B-Degradation: – Eine Lösung von je 10^{-2} mMol Polymyxin B + 5HCl und $CuCl_2$ in 11 ml Wasser wurde nach Einstellen von pH 8,5 mit 2N NaOH – meist tritt ein geringer Niederschlag auf – mit einem 6fachen Überschuss an H_2O_2 ($6 \cdot 10^{-2}$ mMol) versetzt und 2,5 Std. stehengelassen⁶⁾. Mit einem 3fachen Überschuss an Komplexon III (EDTA) wurde sodann die Reaktion durch Zerstörung des Cu^{II} -Polymyxin-Komplexes gestoppt, der vorhandene Niederschlag⁷⁾ abzentrifugiert und die Reaktionslösung im Wasserstrahlvakuum (Rotationsverdampfer) bei 40° auf ca. 1 ml eingengt. Das Reaktionsprodukt wurde anschliessend mit Hilfe von DC bzw. IA untersucht.

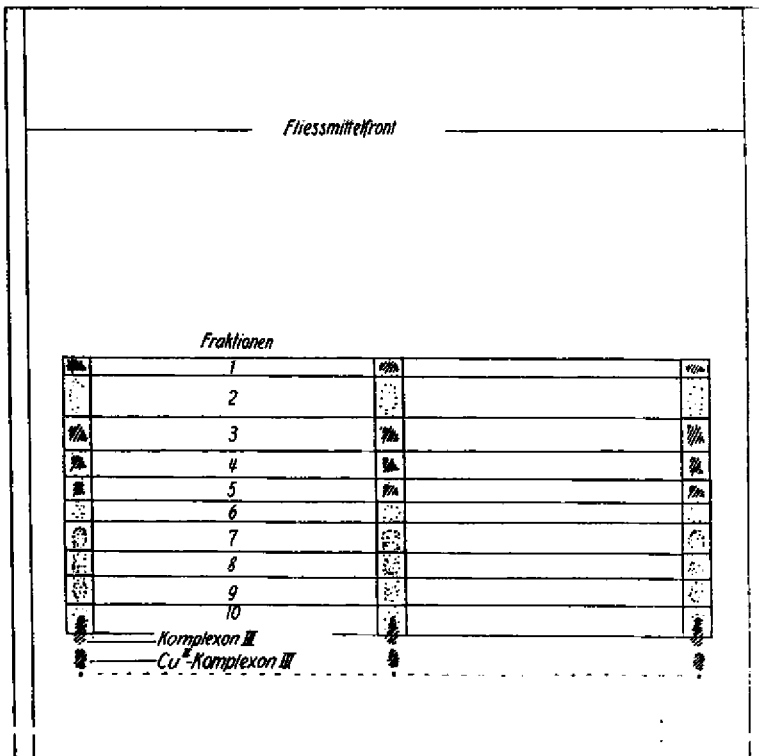


Fig. 4. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Polymyxin-B-Spaltprodukte und ihre Einteilung in Peptid-Fractionen

- ⁵⁾ Zur oxydativen Desaminierung von Aminosäuren mittels H_2O_2 vgl. [8].
- ⁶⁾ Lässt man den Cu^{II} -Polymyxin-Komplex ohne H_2O_2 stehen, so beobachtet man einen sehr langsamen Zerfall, der ähnliche Dünnschicht-Chromatogramme ergibt wie der Zerfall in Gegenwart von H_2O_2 ; möglicherweise findet durch den im Wasser gelösten Luftsauerstoff eine oxydative Desaminierung des Polymyxins statt, wie sie von BIHARI-VARGA & NYILASI [4] beobachtet wurde (vgl. auch [9]).
- ⁷⁾ Wohl auf Grund dieses Niederschlages war die Peptid-Ausbeute relativ gering.

II. Dünnschicht-Chromatographie: – a) *Platten für die DC* wurden mit Kieselgel S-HR der Firma MACHEREY & NAGEL, Düren, hergestellt. Als Fließmittel diente Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (50:20:6:24), es wurde bei Kammerfüllung (vgl. [10]) gearbeitet. Damit eine gerade Substanzfront erhalten wird, müssen die (über Nacht bei 125°) aktivierten Platten in einem geschlossenen Gefäß über CaCl_2 aufbewahrt werden; sie sollten bei der Verwendung mindestens vier Tage alt sein. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit Ninhydrin-Reagens [10].

b) *Trennung der Spaltprodukte von I:* Mit einer Probeplatte wurde die richtige Auftragemenge des Reaktionsgemisches ermittelt (meist ca. 2,5 μl). Anschliessend wurde auf vier Platten (20 × 20 cm) diese Menge je 24mal aufgetragen. Nach der Trennung wurden auf jeder Platte drei Streifen mit Ninhydrin besprüht bzw. entwickelt und nach Markierung der Punkte die unbehandelten Felder in total 10 Fraktionen abgekratzt (vgl. Fig. 4).

Die Fraktionen wurden je nach Kieselgel-Menge mit 1 bis 1,5 ml Wasser durch ca. einstündiges Schütteln eluiert^{*)}, das Kieselgel abzentrifugiert, die Lösung zur Trockne eingedampft, aus jeder Fraktion eine Probe entnommen und durch nochmaliges Chromatographieren die Auftrennung kontrolliert; die meisten Fraktionen enthielten kleine Peptid-Mengen der jeweiligen Nachbar-Fraktionen. Die Peptide der einzelnen Fraktionen wurden hydrolysiert und nach STEIN & MOORE (vgl. IV) Art und Menge der Aminosäuren bestimmt (vgl. Tab. 1)^{b)}.

III. Ionenaustauscher-Chromatographie: – a) *Die dünn-schichtchromatographischen Ergebnisse* wurden durch Ionenaustauscher-Chromatographie nach V. RUDLOFF & G. BRAUNITZER [11] bestätigt bzw. ergänzt (vgl. Tab. 2). Dowex 1X2, 200–400 mesh, wurde in die Acetat-Form umgeladen und in eine mit einem auf 30° thermostatisierten Mantel versehene Säule von 60 × 2 cm – mit einer G2-Fritte am Ausfluss – eingefüllt.

Die Säule wurde dann in einzelnen Portionen mit der Harz-Wasser-Aufschlammung (1:1) bis knapp unter das Niveau des Wassers im Mantel aufgefüllt. Um das Harz zu equilibrieren, liess man solange Kollidin-Pyridin-Puffer (80–120 ml/Std.) durchlaufen, bis das pH der auslaufenden gleich dem der einlaufenden Flüssigkeit war.

b) *Trennung der Spaltprodukte von I:* Das Peptidgemisch wurde im Rotationsverdampfer auf 4–5 ml eingengt und vom Unlöslichen abzentrifugiert (vgl. I). Der Überstand wurde, wie bei RUDLOFF & BRAUNITZER [11] beschrieben, auf einen pH-Wert gebracht, der um 0,5–0,7 Einheit höher war als der verwendete Puffer und anschliessend auf die Säule aufgetragen. Die Durchflusgeschwindigkeit des Elutionsmittels betrug 30–40 ml/Std. Das Eluat wurde in Fraktionen von 8,4 ml in einem Fraktionensammler aufgefangen.

Bei der Elution wurde folgendermassen vorgegangen: Es wurde eine 1-proz. Kollidin- + 1-proz. Pyridin-Lösung in Wasser bereitet und mit ca. 1,5 ml Eisessig pro 4 l Puffer auf pH 8 gebracht. Nach 70 Fraktionen zu 8,4 ml wurde ein Gradient angesetzt (geschlossenes Gradienten-Verfahren), indem man 0,1 N Essigsäure in ein magnetisch gerührtes Vorratsgefäss kontinuierlich zugab. Nach der 120. Fraktion wurde ein zweiter Gradient mit Zugabe von 2 N Essigsäure gestartet. Sämtliche Puffer wurden vor Gebrauch kurz unter Vakuum entlüftet.

Um den Peptidgehalt der einzelnen Fraktionen zu bestimmen, pipettierten wir zu 0,5 ml jeder Fraktion 0,5 ml Ninhydrin-Reagens [12] und erhitzen die Probe 20 Min. auf 100°. Nach dem Abkühlen wurde mit 4 ml Äthanol-Wasser (1:1) verdünnt und im Photometer bei 578 nm die Extinktion gemessen. Die zu einem «Gipfel» gehörenden Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 3 ml H_2O aufgenommen. Zur Prüfung auf Einheitlichkeit wurden die einzelnen Fraktionen dünn-schichtchromatographiert (vgl. II. a)). Die Gesamtfaktionen («Gipfel») Nr. 3, 4, 5 und 6 waren dünn-schichtchromatographisch rein. Nach der Hydrolyse wurden die einheitlichen Proben mit einer STEIN & MOORE-Apparatur auf ihren Aminosäuren-Gehalt untersucht (vgl. Tab. 2).

^{*)} Mit 0,1 N HCl geht die Elution etwas besser.

^{b)} Neben den vier in Polymyxin B enthaltenen Aminosäuren finden sich in den Hydrolysaten der einzelnen Fraktionen noch wechselnde Mengen anderer Aminosäuren, wie z. B. Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Serin, Alanin und Isoleucin. Polymyxin B selbst enthält diese Aminosäuren in Spuren als Verunreinigung; wahrscheinlich findet durch die Dünnschicht-Chromatographie eine Anreicherung der Verunreinigungen statt, da bei der Elution diese Aminosäuren wohl leichter in Lösung gehen als die Oligopeptid-Bruchstücke.

IV. Aminosäure-Analysen nach STEIN & MOORE [12]: – Zur Hydrolyse wurden die Proben zunächst in ein Bombenrohr übergeführt, mit halbkonzentrierter Salzsäure versetzt, das Glasrohr unter Stickstoff abgeschmolzen und im Autoklaven 24 Std. auf 110° erhitzt. Nach der Hydrolyse wurde die Salzsäure im Exsikkator über KOH entfernt, das getrocknete Hydrolysat in Natriumcitrat-Puffer (pH 2,2) aufgenommen und ein aliquoter Teil auf die Kolonne aufgetragen. Zur Analyse stand ein BECKMANN-SPINCO-Aminosäuren-Analysator, Typ 120 B mit Mikroküvetten-Zusatz zur Verfügung.

Für die Überlassung von Polymyxin B sowie für wertvolle Anregungen sind wir den Herren Dr. K. VOGLER, Dr. R. O. STUDER und W. LERGIER (HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel) dankbar. Den Herren Dr. B. PRIJS, PD Dr. H. BRINTZINGER und PD Dr. H. SEILER sind wir für ihr Interesse an der vorliegenden Arbeit zu Dank verpflichtet.

SUMMARY

The Cu^{II} complex of polymyxin B is decomposed by H_2O_2 . The peptide fragments were separated by thin layer, respectively ion exchange chromatography and analysed by the method of STEIN & MOORE. A possible reaction scheme of the decomposition is given.

Institut für anorganische Chemie
der Universität Basel und
Chemisches Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik,
Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. ERLIENMEYER, H. BRINTZINGER, H. SIGEL & H. C. CURTIUS, *Experientia* 21, 371 (1965).
- [2] R. A. PHELPS, K. E. NEET, L. T. LYNN & F. W. PUTNAM, *J. biol. Chemistry* 236, 96 (1961).
- [3] T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA & K. TSUKAMOTO, *J. Biochem. (Japan)* 54, 555 (1963); 56, 335 (1964); K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & E. BÖHNI, *Experientia* 20, 365 (1964); *Helv.* 48, 1161 (1965).
- [4] M. BIHARI-VARGA & J. NYILASI, *Acta chim. Hung.* 37, 117 (1963).
- [5] H. BRINTZINGER & H. ERLIENMEYER, *Helv.* 48, 826 (1965).
- [6] S. FALLAB, *Chimia* 15, 576 (1961).
- [7] H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 744 (1961).
- [8] A. N. RADHAKRISHNAN & A. MEISTER, *J. biol. Chemistry* 226, 559 (1957); L. MACHOLÁN, *Naturwissensch.* 46, 357 (1959).
- [9] J. NYILASI & P. ORSÓS, *Acta chim. Hung.* 43, 45 (1965).
- [10] E. STARL, «Dünnschicht-Chromatographie», Springer-Verlag, Berlin 1962.
- [11] V. RUDLOFF & G. BRAUNITZER, *Z. physiol. Chem.* 323, 129 (1961).
- [12] S. MOORE & W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* 176, 367 (1948); 217, 907 (1954); S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analytic. Chemistry* 30, 1185 (1958).