Institut für Ernährungswissenschaft
Professur für Lebensmittelwissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

Sequenzierung von Peptaibol-Antibiotika mittels Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich 09
Agrarwissenschaften und Umweltsicherung,
Ernährungs- und Haushaltswissenschaften

vorgelegt von
Dipl. oec. troph.
Andreas Jaworski
aus Solms

November 1999

Liste der Original-Publikationen

Die Dissertation beruht auf folgenden Original-Publikationen:

[A] Jaworski A, Kirschbaum J, Brückner H (1999) Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243. *J. Peptide Sci.* **5**: 341-351.

[B] Jaworski A, Brückner H (1999) Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **862**: 179-189.

[C] Jaworski A, Brückner H (1999/2000) New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. *J. Peptide Sci.* **im Druck.**

In den folgenden Ausführungen wird auf diese Original-Publikationen anhand ihrer Bezeichnung [A - C] verwiesen.

Die Arbeiten sind, mit freundlicher Genehmigung der entsprechenden Verlage, im Anhang als Originale dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

Liste der Original-Publikationen I

Inhaltsverzeichnis II

Abbildungsverzeichnis IV

Tabellenverzeichnis VI

Verzeichnis der Abkürzungen VII

1 Einleitung 1

1.1 Peptaibiotika 1

1.1.1 Biologische Aktivitäten von Peptaibiotika 4

1.2 Sequenzierung der Peptaibiotika 7

1.2.1 Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie 9

1.2.1.1 Aufbau und Funktion des Elekrosprayionisierungs-Interface 10

1.3 Fragmentierungsverhalten von Peptiden 12

1.3.1 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus mit $(M+H)^+$ als Precursor-Ion 12

1.3.1.1 Differenzierung isobarer/isomerer Aminosäuren 19

1.3.2 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus mit $(M+Na)^+$ als Precursor-Ion 21

1.3.3 Sequenzierung im negativen Ionisierungsmodus 23

1.4 Aufgabenstellung 26

2 Material und Methoden 27

2.1 Instrumentelle Anordnung und Parameter 27

2.1.1 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie 27

2.1.2 Elektrosprayionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie 27

2.1.3 Gaschromatographie 28

2.1.3.1 Herstellung von Lösungen und Reagenzien für die Gaschromatographie 28

2.1.3.2 Chirale Aminosäurenanalyse mittels GC-SIM-MS 28

2.1.3.3 Achirale Aminosäurenanalyse mittels GC-SIM-MS 31

2.1.3.4 Dipeptidanalyse mittels GC-MS 32

2.2 Mikrobiologische Arbeiten 33

2.2.1 Herkunft der verwendeten Pilzstämme 33

2.2.2 Fermentationsmedien 33

2.2.3 Anzucht der Schimmelpilze in Submerskultur 34

2.2.4 Aufreinigung und Isolierung der Peptaibole 34

2.2.5 Biologische Aktivitätsprüfung der isolierten Peptaibole 34

3 Ergebnisse und Diskussion 35

3.1 Sequenzierung von Trichovirin II, Peptaibol-Antibiotika aus *Trichoderma viride* NRRL 5243 35

3.1.1 Dipeptidanalyse mittels GC-MS 37

3.2 Sequenzierung der Peptaibol-Antibiotika Trichotoxin A-40 mittels on-line HPLC-ESI-MS 40

3.2.1 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus 41

3.2.2 Sequenzierung im negativen Ionisierungsmodus 43

3.3 Neue Sequenzen und neue Produzenten des Peptaibol-AntibiotikumsAntiamoebin 46

3.3.1 Sequenzierung von Antiamoebin 48

3.3.1.1 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus 48

3.3.1.2 Sequenzierung im negativen Ionisierungsmodus 51

3.4 Schlußbetrachtung und Ausblick 53

4 Zusammenfassung 55

5 Literatur 58

6 Anhang 72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Primärstruktur der Peptaibole Boletusin, Hypomurocin B-1 und Peptaibolin. 1

Abbildung 1.2 Primärstruktur des Lipopeptaibols Trichogin A IV 2

Abbildung 1.3 Primärstruktur des Aminolipopeptids Helioferin A. 2

Abbildung 1.4 Gruppierungen der Peptaibiotika. 3

Abbildung 1.5 Schematischer Aufbau eines HPLC-gekoppelten Massenspektrometers. 8

Abbildung 1.6 Prozeß der Bildung von Ionen im positiven Ionisierungsmodus im ESI-Interface. 10

Abbildung 1.7 Nomenklatur für die Bezeichnung von Peptidfragmenten in der Massenspektrometrie 13

Abbildung 1.8 Vorgeschlagene Struktur der aus protonierten Peptiden generierten Fragment-Ionen 14

Abbildung 1.9 Strukturvorschläge von b_2 Fragmenten 15

Abbildung 1.10 Mechanismus der Entstehung von b_n Ionen aus $(M+H)^+$ am Beispiel des Tetrapeptides H-$(Gly)_4$-OH 16

Abbildung 1.11 Bildungsmechanismus von Iminium-Ionen der a_n Serie aus b_n Fragmenten 17

Abbildung 1.12 Bildungsmechanismus von Fragmenten der *C*-terminalen y_n Serie durch Abspaltung eines neutralen Aziridinons aus y_{n+1}. 18

Abbildung 1.13 Bildung des y_n - 2 Da Iminium-Ions aus dem y_n Fragment bei *N*-terminalen Prolylpeptiden unter FAB-MS Bedingungen 19

Abbildung 1.14 Unterscheidung von isobaren Aminosäuren durch Seitenkettenfragmentierung. 20

Abbildung 1.15 Struktur der $(a_n + Na - H)^+$ und $(b_n + Na - H)^+$ Fragmente, $(M+Na)^+$ als Precursor 22

Abbildung 1.16 Bildung des $(b_2 + 17\ Da + Na)^+$ Fragments am Beispiel des Tripeptides H-GGF-OH 23

Abbildung 1.17 Mechanismus der Entstehung von c Fragment-Ionen im negativen Ionisierungsmodus bei *N*-terminal acetylierten Peptiden 25

Abbildung 3.1 Massenspektrum und Fragmentierungsschema von TFA-Glu-Iva-OMe. 37
Abbildung 3.2 Massenspektrum und Fragmentierungsschema von TFA-Leu-Leu-OMe..... 38
Abbildung 3.3 Bildung des *C*-terminalen y_6 Fragmentes und der daraus entstehenden Tochterfragmente..... 42
Abbildung 3.4 Mögliche Oxazolon-Struktur des internen Prolyl-Fragmentes (Pro-Leu)‘..... 43
Abbildung 3.5 ZoomScan Spektren von Paracelsin A 44
Abbildung 3.6 ZoomScan MS-MS von PC A und Mechanismus der Bildung von $(a_{12} - H + Na)^+$ 49
Abbildung 3.7 ZoomScan MS-MS von PC A und Bildung von $(a_{13} - H + Na)^+$ 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Bestimmung der Aminosäure durch die Abgangsgruppen. 21
Tabelle 2.1 Retentionszeiten [min] und charakteristische Massenfragmente [*m/z*] der in den untersuchten Peptiden detektierten Aminosäuren und Amino-alkohole; chirale Analyse der PFP-2-Propylester..... 30
Tabelle 2.2 Retentionszeiten [min] und charakteristische Massenfragmente [*m/z*] der in den untersuchten Peptiden detektierten Aminosäuren und Amino-alkohole; nicht-chirale Analyse der TFA-*n*-Butylester. 32

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AS	Aminosäure(n)
APLC	Atmosphärendruck- Flüssigkeitschromatographie
ATCC	American Type Culture Collection
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CID	Collision Induced Dissociation
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
EI	Electron Impact
ESI	Electrosprayionisierung
eV	Electronen Volt
FAB-MS	Fast-Atom-Bombardment Massenspektrometrie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
i.D.	innerer Durchmesser
Kap.	Kapitel
LG	Lösungsmittel
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MM	molekulare Masse
MPLC	Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS^n	Multi-Stage Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ODS	Octadecylsilyl-
OAc	Acetat
OMe	Methylester
PFP-	Pentafluorpropionyl-

RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
SIM	Selected Ion Monitoring
Tab.	Tabelle
TDM	4,4‘-Tetramethyldiamino-diphenylmethan
TFA	Trifluoressigsäure
TFA-	Trifluoracetyl-

Peptaibole

AAM	Antiamoebin
PC	Paracelsin
TT	Trichotoxin

Aminosäuren

Aib	α-Aminoisobuttersäure, U
Iva	Isovalin
Vxx	Valin oder Isovalin

Die proteinogenen Aminosäuren wurden nach 3- bzw. 1-Buchstaben IUPAC Nomenklatur abgekürzt.

Aminoalkohole

Leuol	Leucinol
Pheol	Phenylalaninol
Valol	Valinol

1 Einleitung

1.1 Peptaibiotika

Peptaibiotika sind kurzkettige lipophile Peptidantibiotika des Sekundärstoffwechsels von Mikroorganismen. Sie sind definiert als Peptide, welche die nicht-proteinogene Aminosäure (AS) α-Aminoisobuttersäure (2-Methyl-2-amino-propansäure, Aib) enthalten und biologische, z.B. antibiotische, Aktivitäten aufweisen. Die enthaltenen AS liegen in L-Konfiguration vor. Lediglich die oft beinhaltete α,α-Alkyl-AS Isovalin (2-Methyl-2-amino-butansäure, Iva) tritt meist in der D =(*R*) Konfiguration auf (Brückner et al. 1980; Bosch et al. 1982), kann aber auch in L-Konfiguration vorliegen (Gupta et al. 1991; Berg et al. 1996). Mischungen beider Iva-Antipoden wurden in Clonostachin detektiert (Chikanishi et al. 1996).

Zu den meist untersuchten Peptaibiotika zählt die Gruppe der Peptaibole (Pandey et al. 1977a), welche eine oder mehrere säurelabile Aib-Pro Bindungen in der Sequenz aufweisen (Przybylski et al. 1984; Brückner et al. 1985). Die Peptaibole sind amphiphile Biomoleküle: Der *N*-Terminus ist acetyliert, der *C*-Terminus weist durch die formal zum Alkohol reduzierte Carboxylgruppe der terminalen AS einen hydrophilen Charakter auf. Bei Peptaibolen, deren *C*-Termini aus Phenylalaninol bestehen, wird der Begriff der Peptaibophole verwendet (Pandey et al. 1977b, 1978).
In Abb. 1.1 sind einige Sequenzen der in letzter Zeit publizierten Peptaibole dargestellt.

Boletusin
Ac-Phe-Aib-Ala-Aib-D-Iva-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Aib-Aib-Aib-Gln-Trpol
Hypomurocin B-1
Ac-Aib-Ser-Ala-Leu-Aib-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Valol
Peptaibolin
Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Pheol

Abbildung 1.1 Primärstruktur der Peptaibole Boletusin (Lee et al. 1999), Hypomurocin B-1 (Becker et al. 1997) und Peptaibolin (Hülsmann et al. 1998); Trpol= Tryphtophanol, Valol= Valinol, Pheol= Phenylalaninol.

Allgemein werden kurzkettige (11-16 AS) von langkettigen (18-20 AS) Peptaibolen unterschieden (Rebuffat et al. 1993). Neuere Forschungsergebnisse zeigen auch das Vorkommen von kürzeren Peptaibolen (5 AS) auf (Hülsmann et al. 1998).

Zu den Peptaibiotika gehören neben den Peptaibolen die Lipopeptaibole (Auvin-Guette et al. 1992) und die Aminolipopeptide (Gräfe et al. 1995).
Die Lipopeptaibole zeichnen sich durch eine Kettenlänge von 7 oder 11 AS aus, die für Peptaibole charakteristische Aib-Pro (Aib-Hyp) Bindung fehlt. Ihr *N*-Terminus ist mit längerkettigen Acylresten (Octanoyl oder Decanoyl) verestert (Auvin-Guette et al. 1992, Fujita et al. 1994).
In Abb. 1.2 ist die Sequenz des Lipopeptaibols Trichogin A IV dargestellt.

Trichogin A IV
Oc-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leuol

Abbildung 1.2 Primärstruktur des Lipopeptaibols Trichogin A IV (Auvin-Guette et al. 1992); Oc= Octyl, Leuol= Leucinol.

Aminolipopeptide werden in der Literatur zwar nicht den Peptaibiotika zugerechnet, besitzen aber ähnliche Charakteristika. Neben den oben genannten AS können noch weitere wie Hydroxy-lysin, ß-Alanin, α-Ethyl-norvalin oder Pipecolinsäure enthalten sein (Tsantrizos et al. 1996; Bullogh et al. 1982a, b). *C*- und *N*-Termini der 7 bis 9 AS langen Peptide sind durch ungewöhnliche, meist zyklische Verbindungen geschützt (Fujita et al. 1981; Fukushima et al. 1983b). Vertreter der Gruppe der Aminolipopeptide sind Leucinostatin, Trichopolyn und die Helioferine (Gräfe et al. 1995; Fujita et al. 1981; Arai et al. 1973; Fukushima et al 1983b). In Abb. 1.3 ist die Sequenz von Helioferin A dargestellt.

Helioferin A MOA-Pro-AHMOD-Ala-Aib-Ile-Ile-Aib-Aib-AAE

Abbildung 1.3 Primärstruktur des Aminolipopeptids Helioferin A (Gräfe et a. 1995); MOA = 2-Methyl-octanoyl, AHMOD = 2-Amino-4-methyl-6-hydroxyl-8-oxodecansäure; AAE = 2-(2‘-Aminopropyl)-aminoethanol.

Abbildung 1.4 zeigt zusammenfassend einen schematischen Überblick der Untergruppierung der Peptaibiotika.

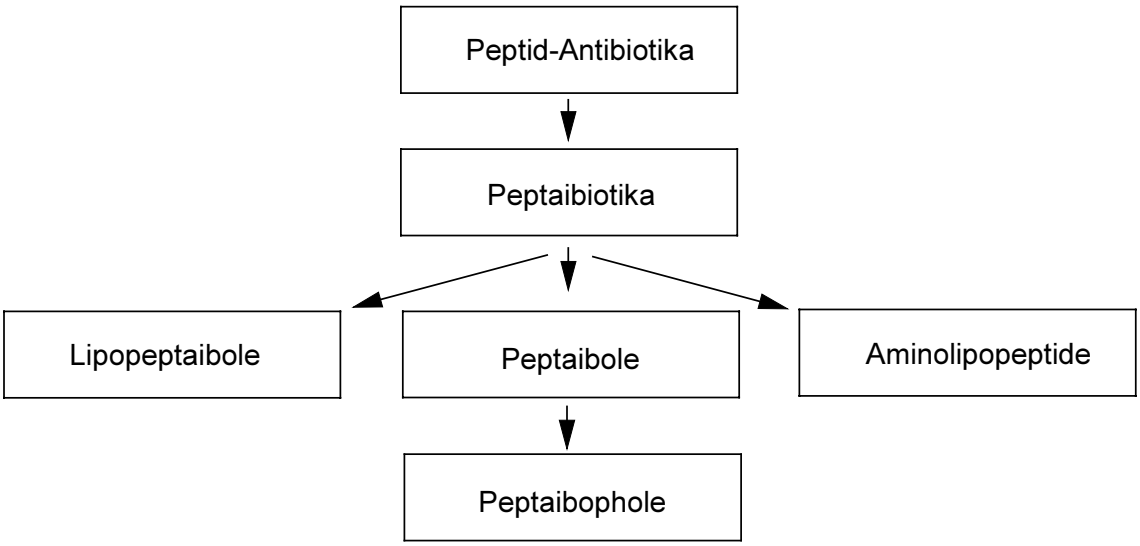


Abbildung 1.4 Gruppierungen der Peptaibiotika.

Die folgenden Charakteristika wurden an Peptaibolen untersucht, scheinen aber auf Grund der strukturellen Verwandtschaft auch für Lipopeptaibole und Aminolipopeptide zuzutreffen:

Die Biosynthese der Peptaibole ist nicht ribosomal gesteuert, sondern wird von einem unspezifischen Multienzymkomplex durchgeführt. Die in dem Peptid enthaltenen AS werden in Form von Thioestern am synthetisierenden Enzym aktiviert und dann eingebaut (Rindfleisch und Kleinkauf 1976; Kleinkauf und von Döhren 1990).
Ooka und Takeda (1974) vermuteten, daß L-Valin als Precursor für die α-Aminoisobuttersäure im Biosyntheseweg der Peptaibole fungiert. Der *C*-terminale Aminoalkohol wird über ein separates Enyzmsystem synthetisiert (Mohr und Kleinkauf 1978).
Aus dem unspezifischen Einbau der AS resultiert die Mikroheterogenität der Peptide (Brückner und Przybylski 1984a; Rebuffat et al. 1995), wobei meistens ein oder zwei Sequenzanaloga dominieren (Kleinkauf 1980).
Supplementierung von Ala, Aib, Gly oder Glu in das Wachstumsmedium der Peptaibol-produzierenden Schimmelpilze resultierte in einer erhöhten Produktion der die jeweilig hinzugegebene AS enthaltenden Peptide (Krasnoff und Gupta 1991).

Bei einer Supplementierung von Gln kam es jedoch nur zu einer vermehrten Synthese von ungewöhnlich Aib-reichen Peptiden und nicht, wie erwartet, zu einer erhöhten Bildung von Gln-haltigen Peptiden. Ein Peptaibol, welches die normalerweise nicht in dieser Substanzklasse vorkommende AS Asp enthält, wurde auch nach deren Supplementierung nicht gebildet (Leclerc et al. 1998).

1.1.1 Biologische Aktivitäten von Peptaibiotika

Peptaibiotika zeigen bakterizide Wirkungen auf gram-positive Bakterien, während hemmende Effekte auf gram-negative Bakterien nur mit sehr hohen Konzentrationen erzielt werden (Fujita et al. 1984; Gräfe et al. 1995).
Fungizide Wirkungen gegen eine Reihe von Pilzen und Hefen, darunter auch humanpathogene Arten, konnten nachgewiesen werden (Arai et al. 1973; Fukushima et al. 1983a; Goulard et al. 1995). So wirkt Trichopolyn gegen *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus*, aber auch gegen den in Japan beliebten Speisepilz *Lentinus edodes* (Fuji et al. 1978; Fujita et al. 1984).
Biologische Aktivitäten gegen Protozoen sind für die Peptaibole Trichorzianin, Zervamicin und Antiamoebin beschrieben (Thirumalachar 1968; Argoudelis et al. 1974; El Hajji et al. 1989), konnten jedoch zumindest unter Verwendung von Antiamoebin nicht reproduziert werden (Kohls und Bradley 1970).
Efrapeptin zeigt eine hohe Toxizität gegen Moskitos und Larven der Schwarzen Fliege (Weiser und Matha 1988; Matha et al. 1988), sowie gegen die Haus- und Fruchtfliege (Matha et al. 1992).

Viele Untersuchungen antagonistischer Wirkungen gegen phytopathogene Pilze im Rahmen der biologischen Schädlingskontrolle sind mit Peptaibol-produzierenden Spezies der Gattung *Trichoderma, Gliocladium* und *Stilbella* durchgeführt worden (Singh und Webster 1973; Köhl et al. 1997; Askew und Laing 1994; Inbar et al. 1996). Schirmböck et al. (1994) konnten eine synergistische Wirkung zwischen den von *Trichoderma harzianum* exponierten lytisch wirksamen Enzymen und den Peptaibolen Trichorzianin beweisen.

Neben den antibiotischen und antagonistischen Wirkungen sind auch physiologische Effekte der Peptaibiotika bekannt. Diese reichen von Entkopplung der oxidativen

Phosphorylierung in Mitochondrien (Okuda et al. 1994) über Antitumorreaktionen (Arai et al. 1973) bis hin zu neuroleptischen Aktivitäten (Ritzau et al. 1997) und Beeinflussung der Rumenfermentation von Wiederkäuern (Brückner und Graf 1983).

Peptaibiotika sind in der Lage sich sowohl spannungsabhängig, als auch spannungsunabhängig in Lipiddoppelmembranen zu integrieren. Durch kooperierende oligomere Aggregate mehrerer amphiphiler helikaler Peptaibolmoleküle bilden sich Ionenkanäle durch die Membran aus (Iida et al. 1995; Matsubara et al. 1996; Grigoriev et al. 1995, 1997; Rebuffat et al. 1995, 1996).
Am Beispiel des Harzianins konnte gezeigt werden, daß die spannungsunabhängige Permeabilität von Membranen vor allem durch die Hydrophobizität des Peptides bestimmt wird, während die spannungsabhängige Fähigkeit zur Porenbildung von der Amphiphilität des helikalen Peptids abhängig ist (Lucaciu et al. 1997).

Trichosporin-B induziert den Ca^{2+} - Influx in bovine chromaffine adrenerge Zellen und veranlaßt dadurch eine Ausschüttung von Catecholaminen (Tachikawa et al. 1996; Nagaoka et al. 1995).
Leucinostatin wirkt als Ionophor, welches ein- und zweiwertigen Kationen den Durchtritt durch die Membran von T-Lymphocyten ermöglicht. Hierdurch wird die Aktivierung der T-Lymphocyten durch Botenstoffe verhindert, was in einer immunsuppressiven Wirkung resultiert (Csermely et al. 1994).

Die Beeinflussung der oxidativen Phosporylierung erfolgt bei Trichosporin-B–Gabe durch Beeinflussung des Kationengradienten im Mitochondrium (Okuda et al. 1994). Auch für die Leucinostatine, Antiamoebine und die Zervamicine wird dieser Mechanismus der mitochondrialen Entkopplung durch Inkorporation der Moleküle in die innere Mitochondrienmembran genannt (Fukushima et al. 1983a,b; Krishna et al. 1990).
Ein zweiter Mechanismus zur Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette wird für die Efrapeptine und Elvapeptine genannt. Hier kommt es zu einer direkten Einflußnahme der Aminolipopeptide auf die mitochondriale ATPase (Jackson et al. 1979; Bullogh et al. 1982a,b).

Ampullosporin zeigt antipsychotische und neuroleptische Wirkungen. Untersuchungen an Mäusen zeigten, daß eine Hypothermie bis auf Raumtemperatur und eine parallel verlaufende Einschränkung der Fortbewegungsaktivität durch intraperitoneale Ampullosporin-Gabe induziert wurde (Ritzau et al. 1997).

Auf der Suche nach neuen Inhibitoren der Thrombocytenkoagulation wurde Clonostachin als wirksames Agens entdeckt. Es hemmt sowohl die reversible als auch die irreversible Thrombocytenaggregation. Die Wirkungsweise beruht auf einer Hemmung der ADP-induzierten Aggregation der Thrombocyten, jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht geklärt (Chikanishi et al. 1997).

In vitro konnte durch Zugabe von Paracelsin zur Rumenflüssigkeit bei einer Konzentration von 10 ppm eine Zunahme der Cellulose-Verdauung bei Rindern erzielt werden. Bei einer Konzentration von über 100 ppm trat jedoch eine Hemmung der Cellulose-Verdauung ein (Brückner und Graf 1983).
Das Peptaibol Aibellin erhöht die Propionsäureproduktion und reduziert die Methanogenese bei Rumen-Organismen, ohne dabei auf das Wachstum von Protozoen oder auf die Cellulose-Verdauung Einfluß zu nehmen (Hino et al. 1993; Kumazawa et al. 1994).

1.2 Sequenzierung der Peptaibiotika

Zwischen der ersten Isolierung von Peptaibiotika (Meyer und Reusser 1967) und deren richtiger und vollständiger Sequenzierung (Pandey et al. 1977a) vergingen nur 10 Jahre.
Da bekannt war, daß *N*- und *C*-Terminus der Peptaibiotika nicht in freier Form vorliegen, die enthaltenen Aminoalkohole jedoch noch nicht identifiziert waren, setzten die ersten Sequenzierungsversuche eine zyklische Struktur voraus. Sie bedienten sich der Methode des manuellen Dansyl-Edman-Abbaues, kombiniert mit der gaschromatographischen Analyse acidolytisch erzeugter Peptidfragmente (Payne et al. 1970).
Der Edman-Abbau liefert aber, besonders bei sterisch gehinderten Peptiden, nur Teilsequenzen der Peptide und keine verläßlichen Ergebnisse bei Peptidgemischen. Andererseits ist eine Vielzahl von Di- bis Tetrapeptiden notwendig um ein Peptaibiotikum mittels GC-MS zu charakterisieren (Steinhagen 1961; Nau 1976). Auch ist die Unterscheidung zwischen enthaltenem Glu/Gln und Asp/Asn unter den Derivatisierungsbedingungen mittels GC-MS nur unter Einsatz von weiteren Derivatisierungen des Peptides möglich (Atassi und Rosenthal 1969; Aydin et al. 1982).

Mit der Weiterentwicklung der Massenspektrometrie konnten immer größere Peptidfragmente erfolgreich sequenziert werden. So wurden mittels Electron-Impact (EI) und Feld-Desorptions-Massenspektrometrie die Primärstrukturen der Peptaibole Alamethicin (Pandey et al. 1977a), Antiamoebin I (Pandey et al. 1977b) und Trichopolyn (Fujita et al. 1981) aufgeklärt.

Einen weiteren Entwicklungsschub in der Peptidsequenzierung brachte die Einführung der Fast-Atom-Bombardment (FAB) Technologie gekoppelt mit Quadrupol Massenanalysatoren.
Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß auf eine dünne Probenschicht, gelöst in einer Matrix (meistens Glycerin), schnelle neutrale Atome (Argon oder Xenon) geschossen werden. Dadurch werden Quasi-Moleküle und Fragment-Ionen sowohl der Untersuchungssubstanz als auch der Matrix gebildet, die beschleunigt, fokussiert und in ihrer Masse analysiert werden (Williams et al. 1982; Taylor et al. 1983).

Der Bereich, in dem die FAB-Analyse sinnvoll eingesetzt werden kann, erstreckt sich auf Massen bis zu 5000 Da, für Moleküle mit höherem Molekulargewicht ist diese Technologie weniger geeignet (Nguyen et al. 1995).

Werden mehrere Massenanalysatoren hintereinander geschaltet (Tandem-Massenspektrometrie, MS-MS), können die im ersten Analysator (Quadrupol) anfallenden Ionen selektiert und im zweiten Analysator weiter fragmentiert werden. So können auch Partialsequenzen, welche im einfachen Massenspektrum nur schwache Signale liefern, eindeutig zugeordnet werden.

Peptaibole, die mittels FAB-MS sequenziert wurden, sind u.a. Trichotoxin A-50 (Przybylski et al. 1984), Gliodeliquescin A (Brückner und Przybylski 1984b), Trichosporin (Fujita et al. 1988a, b), Trichovirin (Kieß und Brückner 1990) und Boletusin (Lee et al. 1999).

Die Kopplung von FAB-MS und HPLC ist mit modifiziertem Interface (moving belt) bei Flußraten bis 0.5 ml/min praktikabel (continuous-flow-FAB-MS, FAB-CF-MS) (Stroh et al. 1985). Unter diesen Bedingungen muß entweder die visköse Matrix (Glycerin) zu dem Eluenten zugegeben werden, was in Peakverbreiterung und hohem Druck resultiert, oder eine zweite HPLC Pumpe wird benötigt, um die Matrix kontinuierlich nach der chromatographischen Trennung dem Eluenten zuzugeben (Moseley et al. 1989a, b).

Mittels FAB-CF-MS wurden die Peptaibole Leucinostatin C und D (Stroh et al. 1986) und Minorkomponenten der Trichosporine (Iida et al. 1993) in ihrer Sequenz aufgeklärt.

Abbildung 1.5 zeigt einen schematischen Aufbau eines Massenspektrometers gekoppelt mit einem HPLC.

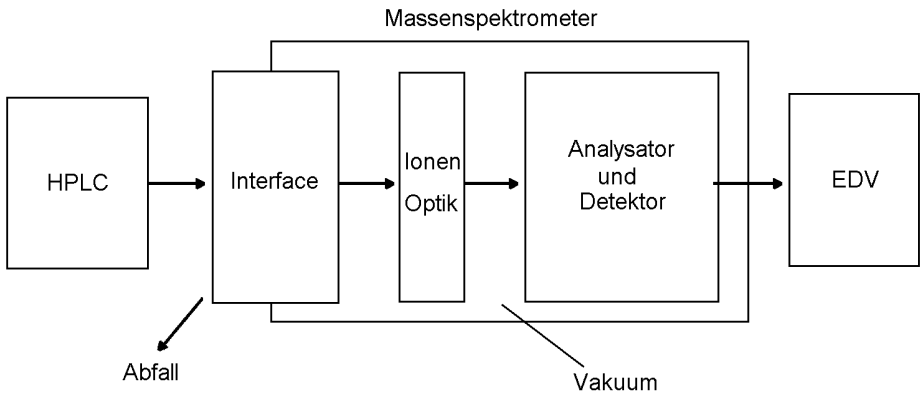


Abbildung 1.5 Schematischer Aufbau eines HPLC-gekoppelten Massenspektrometers.

Das HPLC-Eluat transportiert den Analyten in das Interface (Ionenquelle). Hier wird der Eluent und evtl. vorhandene flüchtige Pufferbestandteile entfernt und Ionen werden erzeugt. Die Ionenoptik fokussiert und transportiert die Ionen zu dem Analysator, in dem die Masse der Ionen analysiert wird und die Signale an eine EDV Anlage weitergegeben werden.

1.2.1 Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie

Eine Anfang der 90er Jahre etablierte Technik stellt die Elektrosprayionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS-MS) dar (Smith et al. 1990; Banks und Whitehouse 1996). Besonders thermolabile und hochmolekulare Verbindungen sind hiermit analysierbar (Poulter et al. 1990; Deterding et al. 1991; Neubauer und Mann 1997; Mollè et al. 1998).
Die bei FAB-MS-MS hintereinander geschalteten Quadrupol-Massenanalysatoren sind bei der ESI-MS-MS weitgehend durch kompaktere und preiswertere Ion-Trap Analysatoren ersetzt worden. Letztere ermöglichen es, ein Massenfragment zu isolieren und dieses durch Kollision mit Helium (CID, collision induced dissociation, Kollisionsenergie) gezielt weiter zu fragmentieren. Eines der entstehenden Tochter-Fragmente kann dann wiederum isoliert und hiervon ein weiteres Tochterionen-Spektrum erzeugt werden (MS^n) (Van Berkel et al. 1990).

Ein Vorteil der Elektrosprayionisierungs-Technik gegenüber der FAB-MS ist die Möglichkeit, das Massenspektrometer entweder direkt on-line an einen HPLC zu koppeln oder andere Detektoren wie UV- oder Fluoreszenz-Detektoren zwischen HPLC und Massenspektrometer zu betreiben (Heath und Giordani 1993). Eluenten-Flußraten von bis zu 1 ml/min können eingesetzt werden (Hopfgartner et al. 1993, Ikonomou et al. 1990).
Im folgenden sind Aufbau und Funktion des Elektrosprayionisierungs-Interface beschrieben.

1.2.1.1 Aufbau und Funktion des Elektrosprayionisierungs-Interface

Die Aufgabe des Elektrosprayionisierungs-Interface (ESI-Interface) ist es, solvatisierte Ionen in ihre Gasphase zu überführen. Damit übernimmt das Interface zwei Aufgaben: Verdampfung des Lösungsmittels / Eluenten und Überführung der Analysenmoleküle in die Gasphase. Der Prozeß der Ionisierung mittels eines ESI-Interface ist in Abb. 1.6 dargestellt.

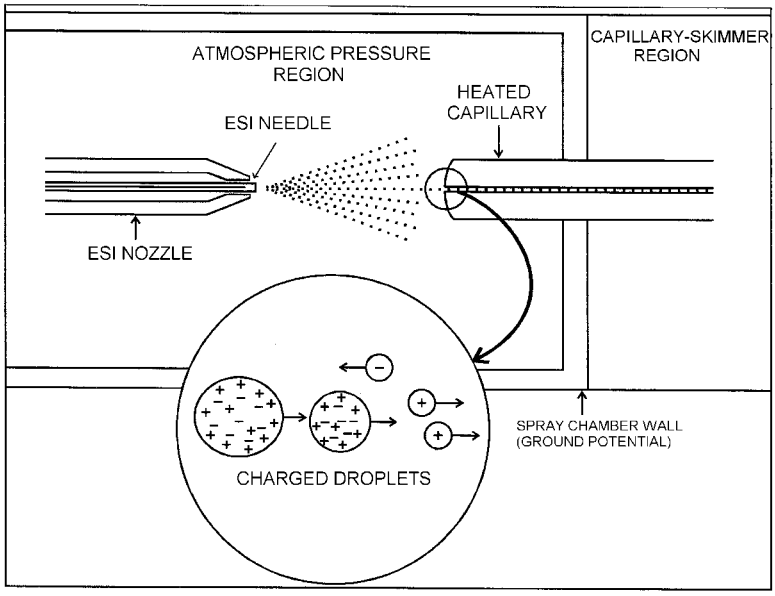


Abbildung 1.6 Prozeß der Bildung von Ionen im positiven Ionisierungsmodus im ESI-Interface.

Das HPLC-Eluat wird durch eine Kapillare (ESI-needle) geführt, zwischen deren Ende und einer wenige Millimeter entfernten Gegenelektrode (heated capillary) eine Hochspannung von 3 –10 kV anliegt. Die aus der Kapillare austretende Flüssigkeit wird in feine geladene Tröpfchen versprüht. Bei hohen HPLC-Flußraten kann der Prozeß der Feinvernebelung durch Zugabe eines sog. Hilfsgases (auxiliary gas) unterstützt werden. Durch die hohe Spannung erhalten die Nebeltröpfchen eine Überschußladung an ihrer Oberfläche, welche bis zu einem kritischen Wert ansteigt (Rayleight-Grenze). Danach setzt die Coulomb-Abstoßung ein, die Tröpfchen zerplatzen und es erfolgt ein Übergang der Ionen in die Gasphase unter Atmosphärendruck. Hierbei entstehen je nach Molekülgröße und Anzahl ladungsfähiger Gruppen einfach bis mehrfach geladene Ionen.

Je nach Ausrichtung des angelegten elektrischen Feldes werden ausschließlich positive oder negative Ionen durch eine geheizte Kapillare (heated capillary) in die Ionenoptik gezogen. Durch Variation der angelegten Spannung zwischen der heated capillary und der folgenden Skimmer-Region kann eine unspezifische Fragmentierung der ionisierten Substanzen erreicht werden (Ion-source CID). Die Skimmer-Region und die Ionenoptik dient der weiteren Fokussierung der Ionen und Leitung dieser zum Massenanalysator. Dort werden die Ionen durch ihr Verhältnis von Masse zu Ladung (*m/z*) detektiert (Gaskell 1997; Niessen und Tinke 1995, Ikonomou et al. 1990).

Durch Mehrfachladung sind auch hochmolekulare Verbindungen mit Massenspektrometern detektierbar, die nur einen relativ niedrigen Massenbereich (meistens bis ca. 2500 Da) erfassen können (Fenn et al. 1989; Hunt et al. 1989; Mann et al. 1989; Loo et al. 1992).

Die Ionenausbeute wird durch verschiedene Größen beeinflußt, wie z.B. Kapillartemperatur, pH-Wert des Lösungsmittels, Art und Konzentration der Eluentenbestandteile und Anwesenheit von Modifiern (Ikonomou et al. 1991; Kelly et al. 1992; Kamel et al. 1999; Temesi und Law 1999).

1.3 Fragmentierungsverhalten von Peptiden

Nachdem die Peptidsequenzierung mittels GC-EI-MS Analyse derivatisierter Partialhydrolysaten durch die leistungsfähigere FAB-MS Technik ersetzt wurde, entstand die Notwendigkeit, die durch die Ionisierung aus dem Peptid entstehenden Fragment-Ionen mittels einer allgemeinen übertragbaren Nomenklatur zu bezeichnen.

1.3.1 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus mit $(M+H)^+$ als Precursor-Ion

Durch die Ionisierung der Peptide entstehen positiv oder negativ geladene Ionen. Für die Sequenzierung wird meist der positive Ionisierungsmodus gewählt, da hier die Ionenausbeute höher als im negativen Ionisierungsmodus ist. Eine Ausnahme bilden phosphorylierte oder sulfonierte Peptide, welche unter FAB-MS Bedingungen ausgeprägte $(M-H)^-$ Pseudomoleküle bilden (Biemann 1990).

Eine Nomenklatur der Massenspektren von Peptiden wurde von Roepstorff und Fohlmann (1984) vorgeschlagen und ist heute in modifizierter Form (Biemann 1988, 1989) Grundlage für die Bezeichnung von Fragment-Ionen. Abbildung 1.7 zeigt schematisch die Bindungsstellen, an denen das Peptid durch CID unter Bildung von charakteristischen Fragmentserien zerfällt.

Die Ionen, welche durch den Fragmentierungsprozeß gebildet werden, sind in Abb. 1.8 aufgeführt. Alle Fragmentserien resultieren aus dem $(M+H)^+$ Precursor-Ion. Für die Fragmentserien, generiert aus dem $(M+Na)^+$ Precursor, werden andere Bildungsmechanismen und Strukturen diskutiert (siehe Kap. 1.3.2).

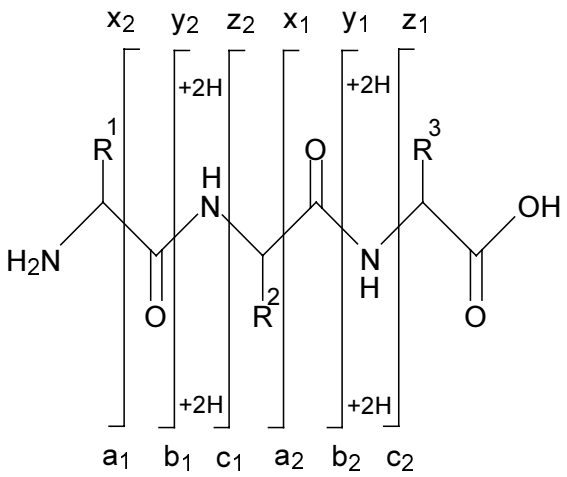


Abbildung 1.7 Nomenklatur für die Bezeichnung von Peptidfragmenten in der Massenspektrometrie (Biemann 1988, 1989).

Bei niedriger Kollisionsenergie (collision induced dissociation, CID) werden vor allem die *C*-terminale Acylium-Ionen bezeichnende b_n und *N*-terminale Ammonium-Ionen bezeichnende y''_n Serie (''= Masse des Fragmentes + 2 Da) gebildet. Die Apostrophierung bei der y-Serie wird oft zur Vereinfachung der Darstellung weggelassen.

Eine höhere CID resultiert in Formierung der *N*-terminalen a_n Acylium Serie durch Elimination von CO aus den korrespondierenden b_n Fragmenten (Johnson et al. 1987; Lim et al. 1999). Fragmente der a-Serie können auch durch direkten Verlust einer *C*-terminalen AS und CO aus dem intakten Molekül entstehen (Ambihapathy et al. 1997).
Die Positionen der AS können so über den Massenunterschied aufeinanderfolgender Fragmente der gleichen Serie errechnet werden. Mehrere gleichzeitig auftretenden Fragmentserien erhöhen die Redundanz der Sequenzierung, das Massenspektrum ist jedoch schwieriger zu interpretieren.

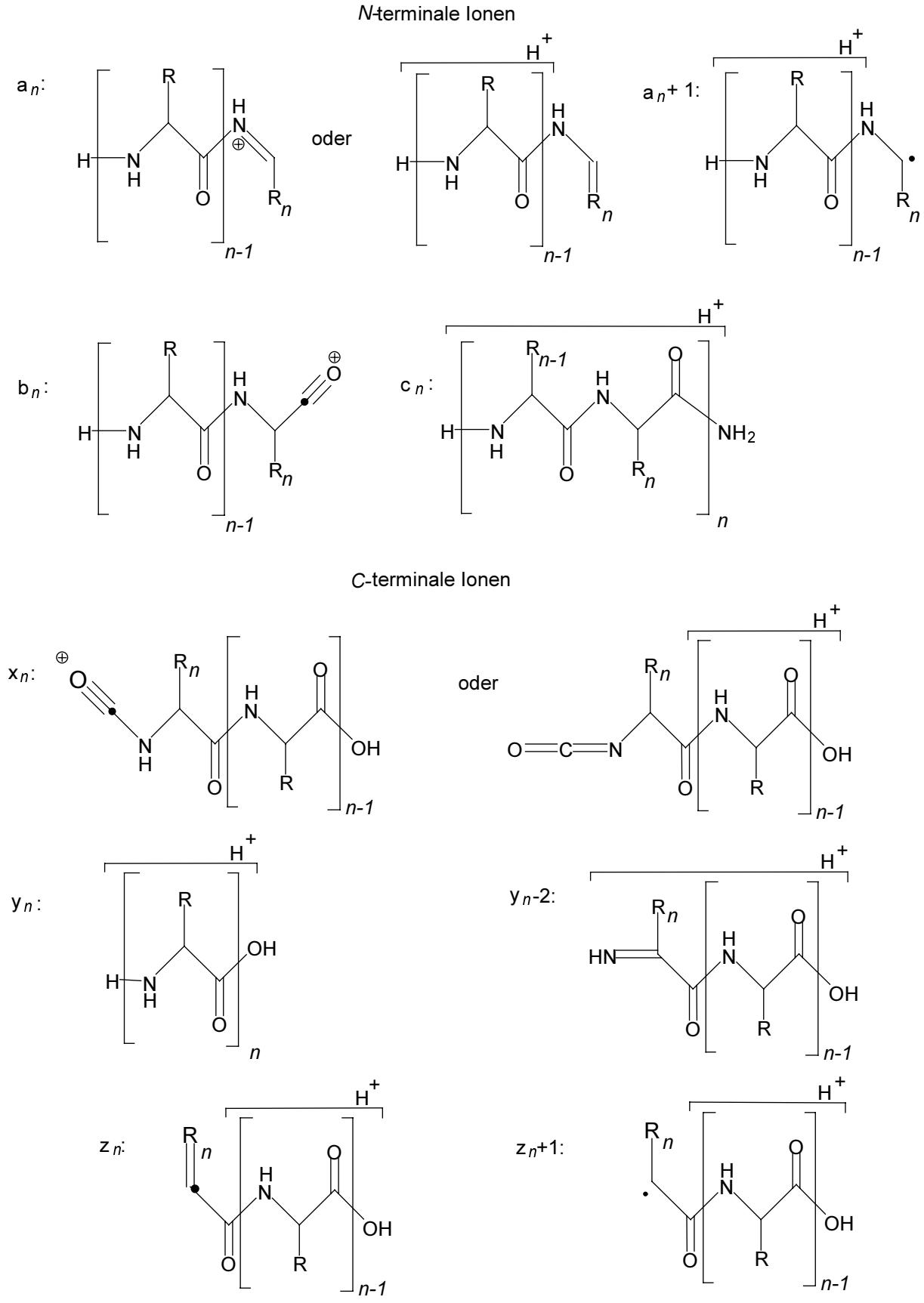


Abbildung 1.8 Vorgeschlagene Struktur der aus protonierten Peptiden generierten Fragment-Ionen (Biemann 1988,1989,1990); *n* = Anzahl an AS im Peptid.

Die molekularen Massen der erhaltenen Fragmente der in Abb. 1.8 gezeigten Ionen wurden in zahlreichen Studien bestätigt, die Struktur der jeweiligen Fragmente wird jedoch kontrovers diskutiert (Biemann 1988, Cordero et al. 1994; Yalcin et al. 1995, Van Dongen et al. 1996; Kanai et al. 1996; Eckart et al. 1998).
In Abbildung 1.9 sind die verschiedenen Vorschläge der Struktur von b_n Fragmenten am Beispiel des b_2-Ions des Dipeptides H-Gly-Gly-OH dargestellt.

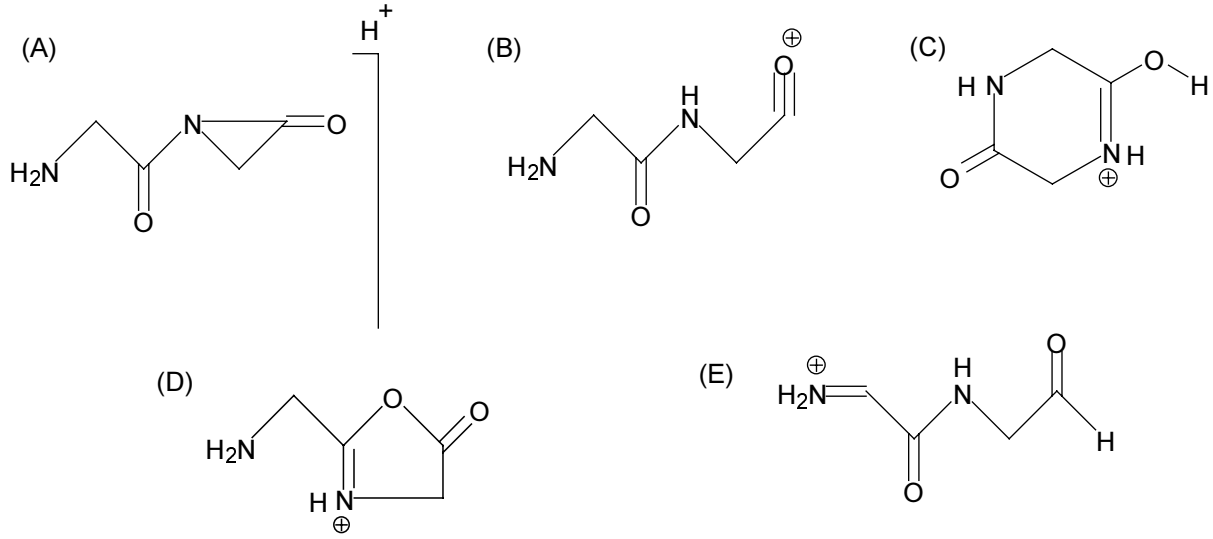
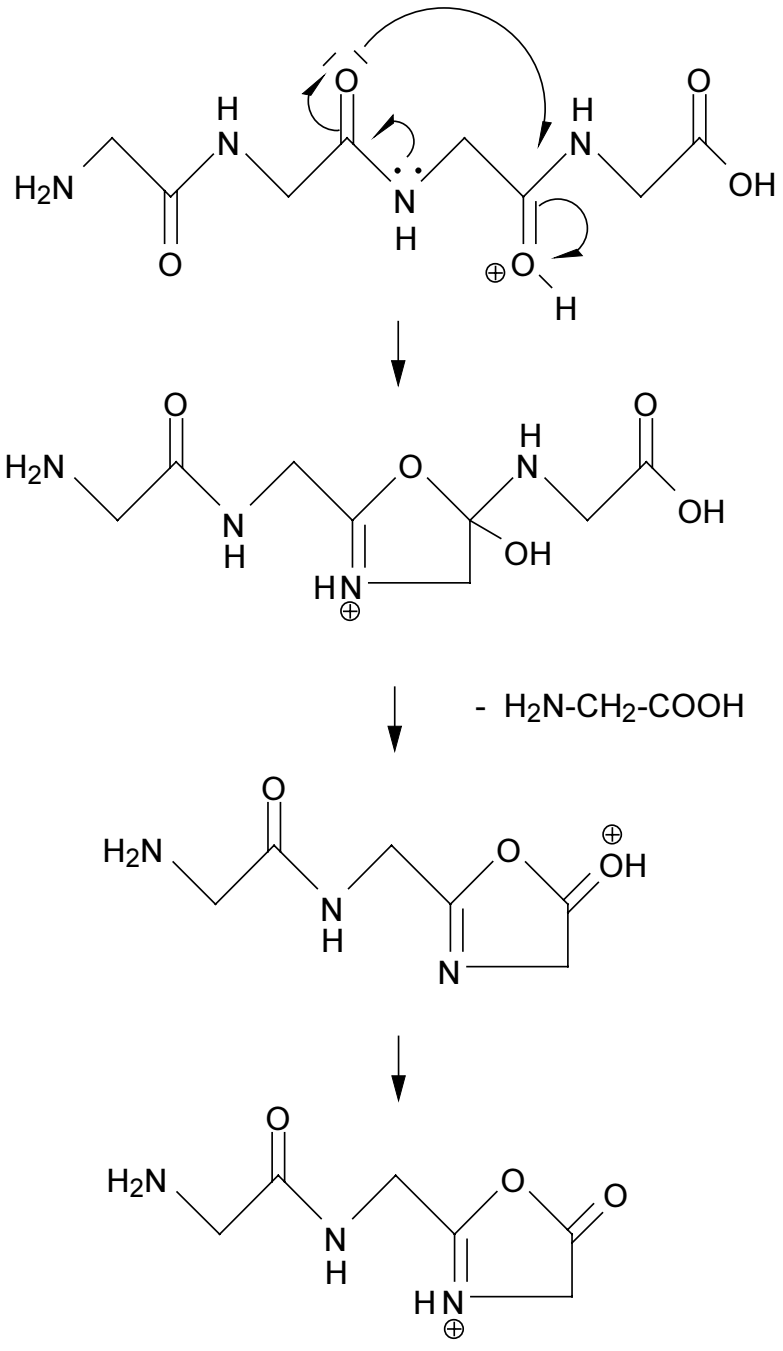


Abbildung 1.9 Strukturvorschläge von b_2 Fragmenten; (A) Aziridinon-Struktur (Kanai et al. 1996), (B) Acylium-Ion (Biemann 1988), (C) Diketopiperazin (Reid et al. 1999), (D) Oxazolon-Struktur (Yalcin et al. 1995), (E) Immonium-Ion (Eckart et al. 1998).

Alle in Abb 1.9 dargestellten Strukturen haben die gleiche Molekülmasse und könnten daher die Struktur des b_2 Fragmentes erklären. Lediglich die Diketopiperazin-Struktur konnte durch Synthese und anschließende massenspektrometrische Untersuchung widerlegt werden (Reid et al. 1999). *Ab initio* Kalkulationen von Yalcin et al. (1996) zeigten jedoch, daß b_n Fragmente mit großer Wahrscheinlichkeit als die in Abb. 1.9 (D) dargestellte Oxazolon-Struktur vorliegen.

Abbildung 1.10 zeigt den Mechanismus der Entstehung und die Struktur von b_n Ionen aus $(M+H)^+$ am Beispiel des Tetrapeptides H-$(Gly)_4$-OH. Es wird postuliert, daß die positive Ladung des Moleküles durch eine Protonierung einer Carboxylgruppe (Gly^3) hervorgerufen wird (Reid et al. 1999).



b_3

Abbildung 1.10 Mechanismus der Entstehung von b_n Ionen aus $(M+H)^+$ am Beispiel des Tetrapeptides H-$(Gly)_4$-OH; Entstehung eines Oxazolons (Yalcin et al. 1995; Reid et al. 1999).

Die Carbonylgruppe des Gly^2 greift nucleophil am protonierten Gly^3 an. Das Oxazolon (b_3) wird durch Spaltung der peptidischen Bindung zwischen Gly^3 und Gly^4 nach prototroper Massenverschiebung (Protonentransfer) gebildet.

Die Oxazolon-Struktur der b_n Fragmente kann unter Ausbildung eines azyklischen Acylium-Ion Intermediats unter exothermer Abspaltung von CO zu dem Iminium-Ion

der a_n Serie reagieren (b_n -> a_n +CO). Auch können b Fragmente unter Abspaltung neutraler Moleküle direkt in das nächst niedrigere Fragment der a-Serie überführt werden (b_n -> a_{n-1} + neutrale Fragmente) (Ambihapathy et al. 1997). Beide Reaktionswege sind in Abb. 1.11 dargestellt.

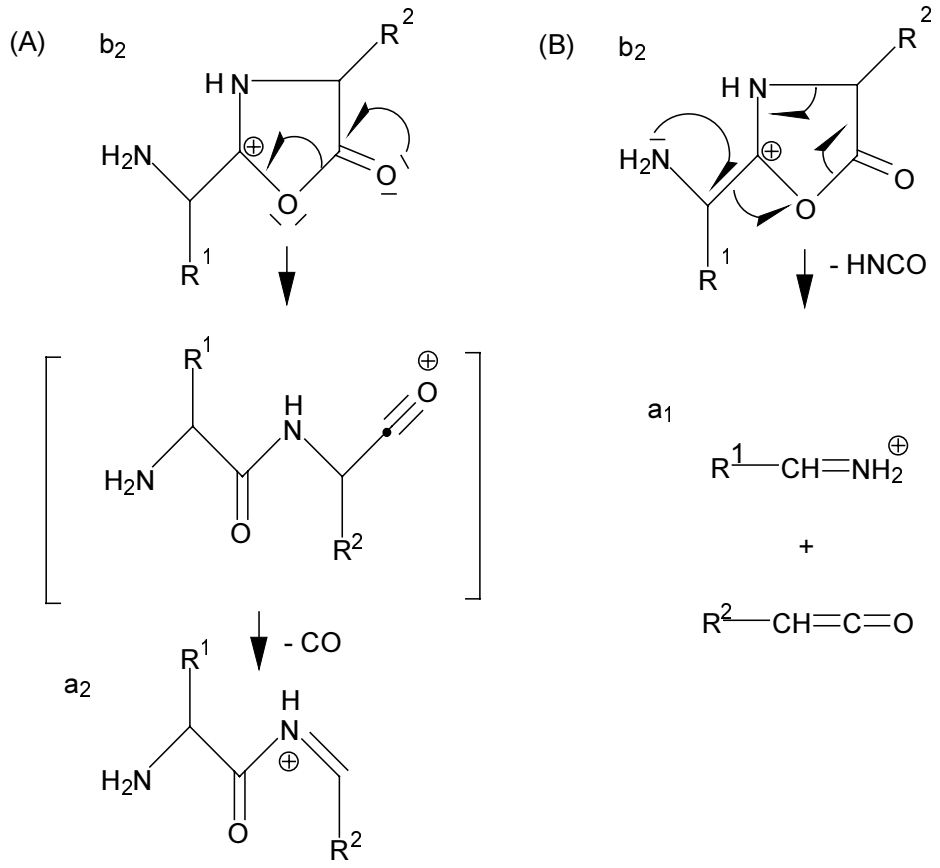


Abbildung 1.11 Bildungsmechanismus von Iminium-Ionen der a_n Serie aus b_n Fragmenten; (A) Bildung des a_2 Fragmentes aus b_2, (B) Bildung des a_1 Fragmentes aus b_2 (Ambihapathy et al. 1997).

C-terminale y Fragmente entstehen durch Spaltung der peptidischen C-N Bindung unter doppelter Protonierung des *N*-terminalen Stickstoffs. Eines der nötigen H-Atome stammt unter FAB-Bedingungen aus der Matrix, die Herkunft des zweiten H-Atoms wird kontrovers diskutiert (Hunt et al. 1986; Kenny et al. 1992).

Untersuchungen von an den C^{α}-Atomen Deuterium-markierten Pentapeptiden H-GGAAA-OH zeigten keine Massenverschiebung bei der Bildung von Fragmenten der y-Serie gegenüber den nicht markierten Peptiden. Daraus schlossen Kenny et al.

(1992), daß das zweite H-Atom der y_n -Serie aus der Aminogruppe des y_{n+1} Fragmentes resultiert. In Abb 1.12 ist der Mechanismus der Bildung von y_n Fragmenten unter Abspaltung eines neutralen Aziridinons gezeigt.

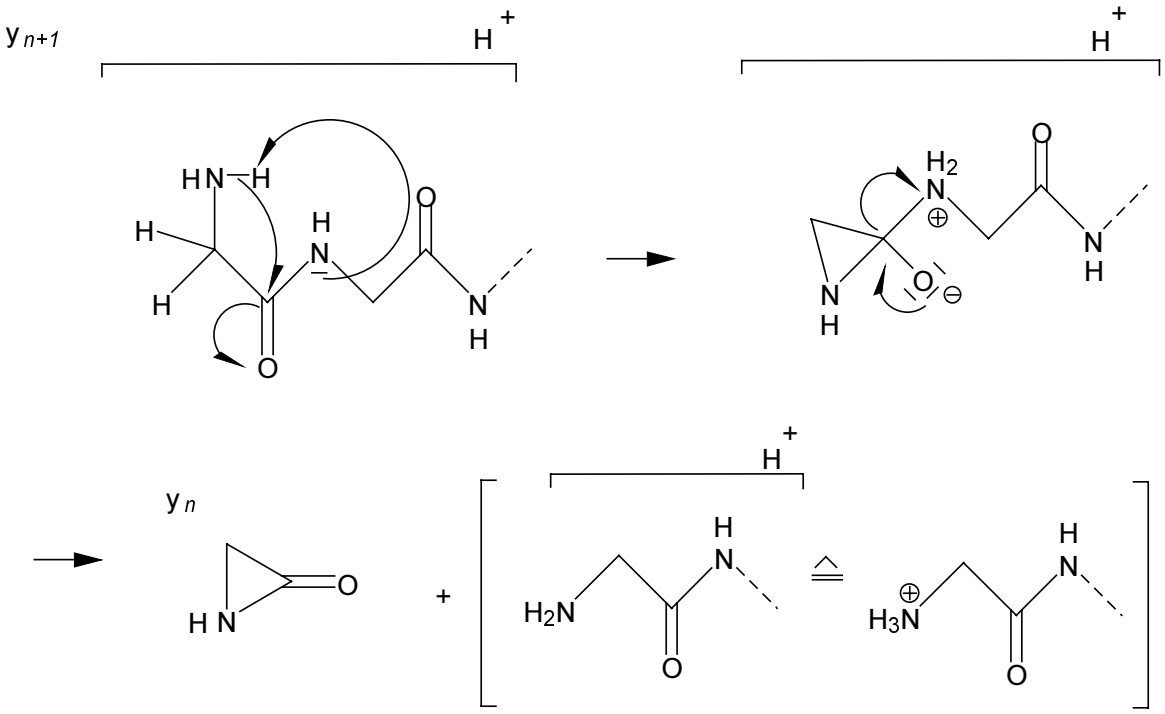


Abbildung 1.12 Bildungsmechanismus von Fragmenten der C-terminalen y_n Serie durch Abspaltung eines neutralen Aziridinons aus y_{n+1} (Kenny et al. 1992).

In Massenspektren treten unter FAB-MS Bedingungen oft y_n-2 (y''_n - 2 Da) Ionen auf. Diese sind charakteristisch für ein *N*-terminales Prolylpeptid (Williams et al. 1982; Biemann 1988). Die Entstehung der y_n - 2 Da Fragmente aus den y Fragmenten ist in Abb. 1.13 dargestellt.

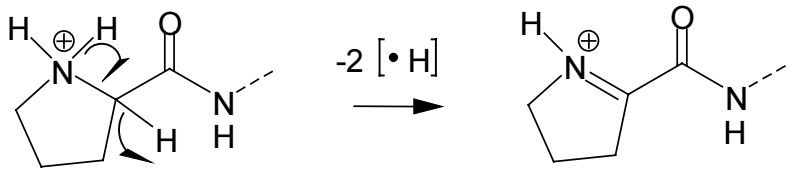


Abbildung 1.13 Bildung des y_n - 2 Da Iminium-Ions aus dem y_n Fragment bei *N*-terminalen Prolylpeptiden unter FAB-MS Bedingungen (Williams et al. 1982; Biemann 1988).

1.3.1.1 Differenzierung isobarer/isomerer Aminosäuren

Schwierigkeiten der Zuordnung von Massenunterschieden korrelierender Fragmente zu den korrespondierenden AS treten auf, wenn aufeinanderfolgende Ionen der gleichen Fragmentserien isobare (Leu/Ile, MM - H_2O= 113 Da) oder isomere (Lys/Gln, MM - H_2O= 128 Da) AS anzeigen. Um diese AS-Fragmente zuordnen zu können, werden mehrere Vorgehensweisen beschreiben.

Unter Einsatz von hoher Kollisionsenergie (> 200 eV) können isobare AS differenziert werden, da sich *C*-terminale d_n und *N*-terminale w_n und/oder v_n Ionen bilden (Biemann 1990). Dieser Prozeß erfordert $C^{\beta}–C^{\gamma}$ Bindungen, welche leicht gespalten werden können und tritt daher bei aromatischen AS sowie Gly und Ala nicht auf (Johnson et al. 1987). Ionen vom d_n Typ, resultierend aus dem Verlust von 42 Da (Propen) gegenüber den korrespondierenden a_n Fragmenten (w_n aus z_n), weisen auf das Vorhandensein von Leu hin (siehe Abbildung 1.14). Im Fall von Ile an dieser Stelle würde ein Massenunterschied der Fragmente von 28 Da auftreten.
Bei der Interpretation der Massenspektren muß jedoch beachtet werden, daß w_n Fragmente bereits zwei bis drei AS vor der entsprechenden Position entstehen können (Biemann 1990).
Fragmente der v_n Serie entstehen bei komplettem Verlust der Seitenkette. Sie treten oft auf, wenn eine basische AS oder Thr am *N*-Terminus der Fragmente lokalisiert ist (Biemann 1988).

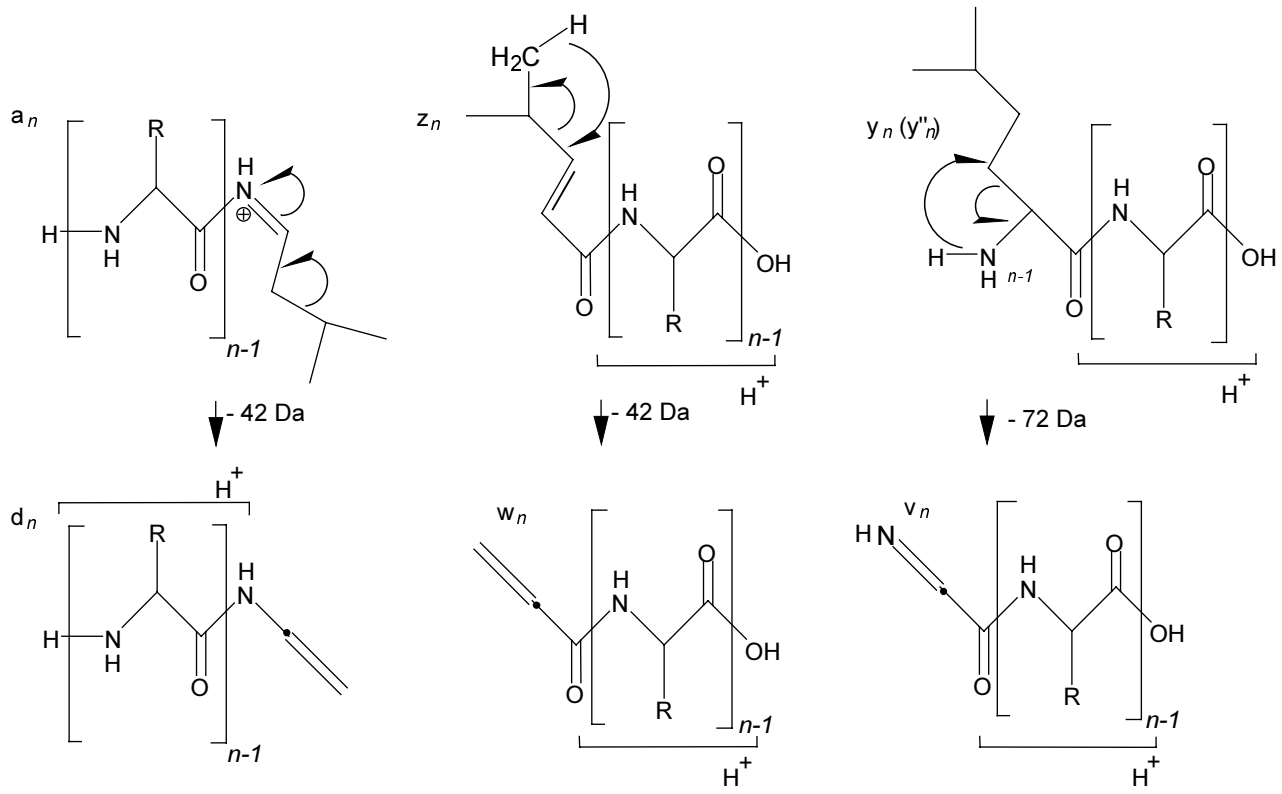


Abbildung 1.14 Unterscheidung von isobaren Aminosäuren durch Seitenkettenfragmentierung (Johnson et al. 1987; Biemann 1988, 1989; modifiziert).

Oft sind die spezifischen d, w und v Fragmente in einem Massenspektrum nicht ausgeprägt. Daher werden komplementäre Methoden diskutiert, um isobare AS zu differenzieren.

Einsetzbar ist die Kombination von manuellem Edman-Abbau und massenspektrometrischer Untersuchung der Phenylthiohydantoin-Derivate im positiven (Engelke et al 1987) oder im negativen Ionisierungsmodus (Ramsey et al. 1995). Die Derivate von *N*-terminalem Leu (Verlust von Propan) und Ile (Verlust von Methan und Ethan) weisen charakteristische Unterschiede auf.

Eine komplementäre Methode zur Unterscheidung isobarer Aminosäuren ist z.B. die zwei-dimensionale Kernresonanzspektrometrie (2 D-NMR). Diese wurde u.a. bei der Sequenzierung von Harzianin HK IV und den Trichorzianinen B eingesetzt (Rebuffat et al. 1989, 1996).

In Tabelle 1.1 sind weitere Fragmente aufgelistet, welche keiner der genannten Fragmentserien zugeordnet werden können, deren Verlust aber in Zusammenhang mit dem Massenunterschied aufeinanderfolgender Fragment-Ionen die vorliegende

AS identifiziert. So kann z.B. Hyp (MM $-H_2O$ 113 Da) durch das Auftreten eines b_n-H_2O Fragmentes von Leu (gleiche MM) unterschieden werden.

Tabelle 1.1 Bestimmung der Aminosäure durch die Abgangsgruppen (Eckart 1986, modifiziert).

Verlust von	AS
NH_3 (17 Da)	Arg, Asn, Gln, Lys, Orn
H_2O (18 Da)	Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr, Hyp
$HCONH_2$ (45 Da)	Asn, Gln
HCOOH (46 Da)	Asp, Glu

1.3.2 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus mit $(M+Na)^+$ als Precursor-Ion

Bei vielen Peptiden und deren Partialhydrolysaten, z.B. nach Einwirkung von spezifischen Endopeptidasen oder durch verunreinigte Lösungsmittel, ist das $(M+H)^+$ Pseudomolekül nur in geringer Intensität detektierbar. Um diese Peptide zu sequenzieren müssen diese entweder „entsalzt“ werden, oder die $(M+Na)^+$ Ionen werden zur Sequenzierung herangezogen. Eine schnell praktikable Methode der on-line Entsalzung von Peptiden wurde von Marina et al. (1999) beschrieben.

Besonders bei hochmolekularen Peptiden ist die Molekülmasse schwer zu ermitteln, wenn nur der Massenunterschied der $(M + n\ H)^{n+}$ Isotope zur Errechnung verwendet wird. Daher werden Natriumsalze der Peptide durch submillimolare Zugabe von z.B. NaOAc beabsichtigt erzeugt, um die Anzahl der Ladungen der Ionen durch die Massenverschiebung von $(M + n\ H)^{n+}$ zu $(M + n\ Na)^{n+}$ zu errechnen (Neubauer und Anderegg 1994).

Eine Fragmentierung der $(M+Na)^+$ tritt erst bei höherer CID als bei $(M+H)^+$ Ionen auf (Tang et al. 1988). Ein mögliche Struktur der aus den $(M+Na)^+$ Precursor-Ionen entstehenden a und b Fragmentserien wurde von Kanai et al. (1996) vorgeschlagen (siehe Abb. 1.15).

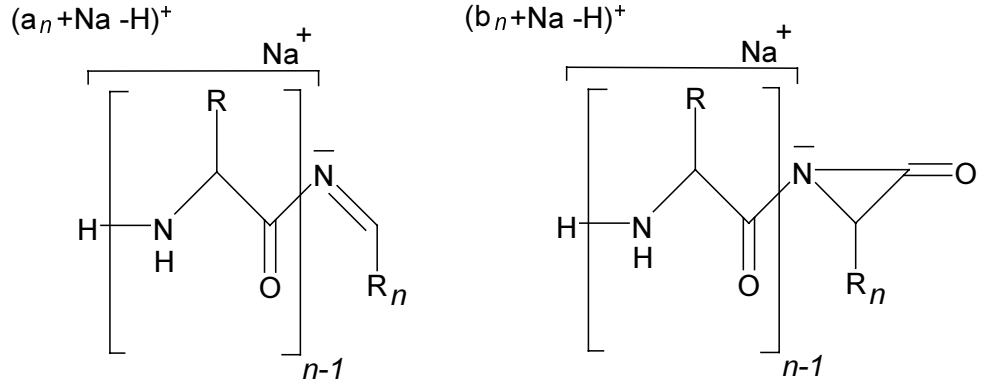


Abbildung 1.15 Struktur der $(a_n + Na - H)^+$ und $(b_n + Na - H)^+$ Fragmente; $(M+Na)^+$ als Precursor (modifiziert nach Kanai et al. 1996).

Ein $(b_n + Na^+ - H)^+$ Fragment entsteht durch Zyklisierung der Carbonylfunktion mittels Abspaltung eines H-Atoms aus dem Stickstoff der *C*-terminalen AS unter Bildung eines neutralen Aziridinons. Das entsprechende a_n Fragment wird durch Eliminierung von CO aus dem b_n Ion gebildet. Das Na-Addukt der a_n und b_n Ionen erzeugt deren Ladung. Durch den Verlust eines H-Atoms ist die gesamte molekulare Masse der Fragmente nur um 22 Da gegenüber den Ionen, welche aus $(M+H)^+$ Presursor-Ionen resultieren, erhöht und nicht um 23 Da (Kanai et al. 1996).
Die Fragmentierung von Peptiden unter Abspaltung von neutralen Aziridinonen und Diketopiperazinen wurde auch von Cordero und Wesdemiotis (1994) diskutiert.

Eine weitere Besonderheit, die bei Tochterionen des $(M+Na)^+$ Precursors auftreten, ist das Phänomen eines $(b_n + 17\ Da + Na)^+$ Fragments. Dieses Fragment kann leicht mit dem $(c_n + Na)^+$ Ion verwechselt werden (Tang et al. 1988), welches eine gegenüber dem entsprechenden b_n Ion um 16 Da erhöhte Masse aufweist. Der Mechanismus der Bildung von $(b_n + 17\ Da + Na)^+$ Ionen ist in Abb. 1.16 dargestellt.

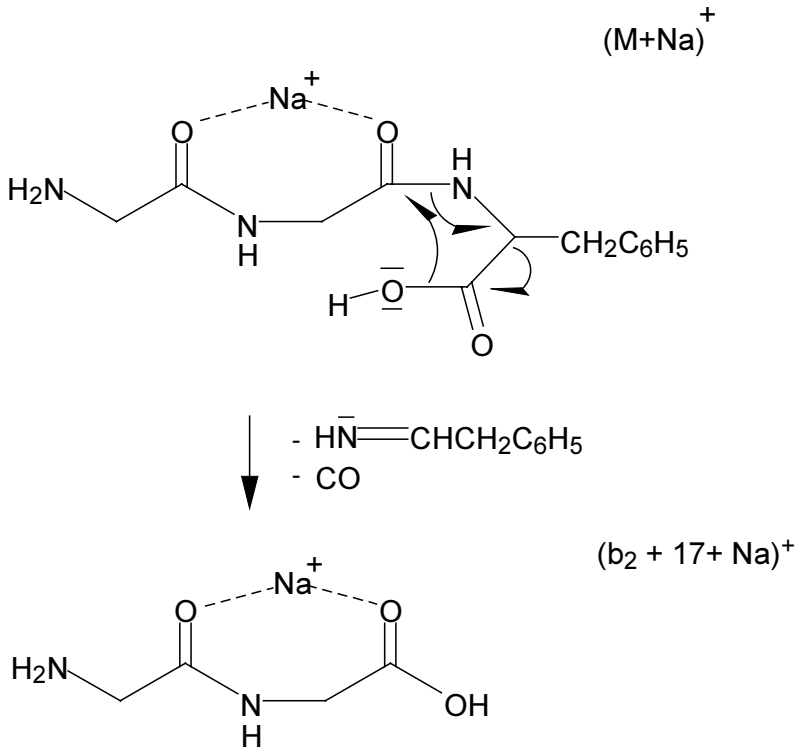


Abbildung 1.16 Bildung des $(b_2 +17\ Da + Na)^+$ Fragments am Beispiel des Tripeptides H-GGF-OH (Tang et al. 1988).

Das Natrium-Atom ist in einem Chelatkomplex an die Carboxylfunktionen des Peptides gebunden. Durch die Bindung von Natrium wird der Doppelbindungscharakter der C-N Amindbindung erhöht, wodurch ein nucleophiler Angriff der *C*-terminalen Hydroxylgruppe erleichtert wird (Tang et al.1988).
Dieser Mechanismus erfordert jedoch eine Hydroxylgruppe in unmittelbarer Nachbarschaft zu der Carboxylfunktion und kann somit nicht alle in einem Massenspektrum auftretenden $(b_n +17 + Na)^+$ Ionen erklären.

1.3.3 Sequenzierung im negativen Ionisierungsmodus

Den zahlreichen Veröffentlichungen über das Fragmentierungsverhalten von Peptiden im positiven Ionisierungsmodus stehen nur wenige Untersuchungen zum Fragmentierungsverhalten von Peptiden im negativen Ionisierungsmodus gegenüber.

Besonders über die Strukturen der Fragment-Ionen und deren Bildungsmechanismen ist nur wenig bekannt.

Die Analyse von Biomolekülen im negativen Ionisierungsmodus kann deren Detektion im positiven Modus ergänzen (Loo et al. 1992). Besonders glykosylierte, phosphorylierte und sulfonierte Verbindungen zeigen hier erhöhte Ionisierungseigenschaften (Gibson und Cohen 1990; Mollè et al. 1998; Kamel et al. 1999).

Im Gegensatz zum positiven Ionisierungsmodus wird im negativen Modus unter FAB-MS Bedingungen das $(M-H)^-$ Ion detektiert (Williams et al. 1982; Neubauer und Mann 1997). ESI-MS Untersuchungen *N*-terminal derivatisierter Peptide resultierten neben dem $(M-H)^-$ Pseudomolekül hingegen auch in der Bildung des radikalischen Anions $(M)^-$ (Ramsay et al. 1995).

Die generierten Negativionen-Spektren sind generell leichter zu interpretieren, da weniger unterschiedliche Fragmentserien auftreten und keine Addukte von Metall-Ionen detektiert werden (Lindh et al. 1994).

Die negative Ladung des Moleküls resultiert laut Williams et al. (1982) aus der Bildung eines *C*-terminalen Carboxylat-Anions. Der aufgrund dieser Annahme vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus, hervorgerufen durch hydrolytische Spaltung zwischen C^{α}-Atom und Aminogruppe unter neutralem Verlust von NH_3 und Ausbildung eines neuen Carboxylat-Anions (Williams et al. 1982), wird in der Literatur allerdings nicht weiter diskutiert.

CID Experimente mittels FAB-MS im negativen Modus von Bradford et al. (1995) führten zu einer Fragmentierung von Peptiden, die der im positiven Ionisierungsmodus ähnlich ist. Es wurden Ionen der ‘‘a, ‘‘b, c, ‘‘x, y und ‘‘z Serie identifiziert (‘‘= Masse des Ions + 2 Da).
Heerma et al. (1997) beschrieben anhand von Experimenten mit hoch energetischer CID, durchgeführt an *N*-acetylierten Peptiden und Peptoiden, einen Mechanismus für die Bildung der hauptsächlich identifizierten c_n Fragment-Ionen (Abb 1.17). Neben den c_n Ionen war die y_n Fragmentserie ausgeprägt. Für deren Bildung wird jedoch kein Mechanismus erwähnt.

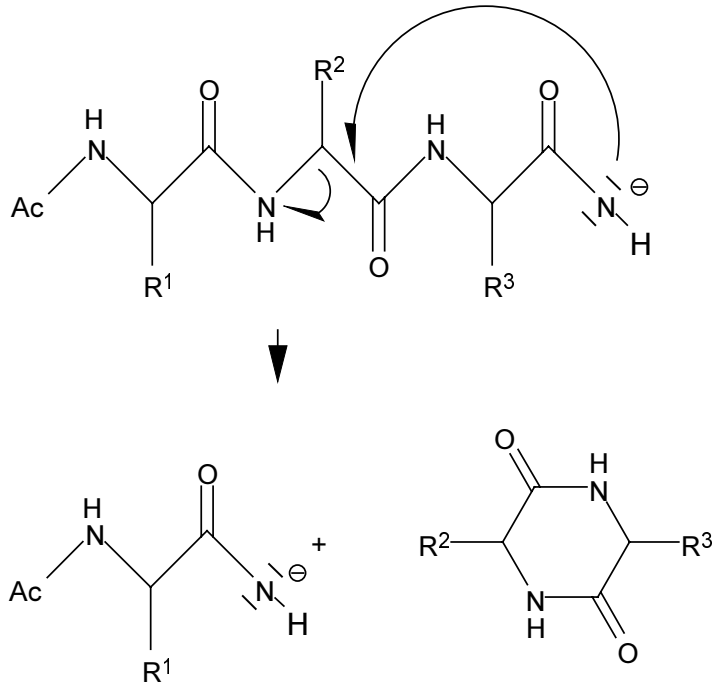


Abbildung 1.17 Postulierter Mechanismus der Entstehung von c Fragment-Ionen im negativen Ionisierungsmodus bei *N*-terminal acetylierten Peptiden (Heerma et al. 1997)

Die negative Ladung des Peptides tritt laut Heerma et al. (1997) durch Abstraktion eines *C*-terminalen H^+ auf. Fragmente der c Fragmentserie entstehen durch Abspaltung eines energetisch neutralen Diketopiperazins aus dem $(M-H)^-$. Die negative Ladung ist auch bei den generierten Fragmenten am *C*-Terminus lokalisiert (Heerma et al. 1997).

ESI-MS-CID Untersuchungen des Tripeptides H-LAL-OH *C*-terminal derivatisiert mit 4-Aminonaphthalinsulfonsäure, demonstrierten die Bildungvon c, y und ‘‘x Fragmenten im negativen Modus. Durch die Derivatisierung konnte eine 40-fach erniedrigte Nachweisgrenze erreicht werden, da das Peptid durch die Derivatisierung mit 4-Aminonaphthalinsulfonsäure leichter dissoziiert und somit das $(M-H)^-$ Ion in erhöhtem Maße vorliegt (Lindh et al. 1994, Griffiths et al. 1995). Wurde das underivatisierte Peptid untersucht, waren neben geringen Seitenkettenfragmenten vom Typ ‘w und ‘v hauptsächlich die Fragmente der y-Serie detektierbar (Griffiths et al. 1995).

1.4 Aufgabenstellung

Der Einsatz von Schimmelpilzen aus den Gattungen *Trichoderma*, *Stilbella* und *Gliocladium* wird im Rahmen der biologischen Schädlingskontrolle gegen phytopathogene Pilze diskutiert. Die auf der Bildung von cellulolytisch aktiven Enzymen beruhende biologische Wirksamkeit wird wahrscheinlich synergistisch durch die Expression von Peptaibolen unterstützt (Schirmböck et al. 1994).
Daher war es Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu entwickeln, mit der Peptaibole schnell sequenziert werden können.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Peptide sollten on-line nach HPLC Trennung der Komponenten unter Verwendung eines Elektrosprayionisierungs-Tandem-Massenspektrometers durchgeführt werden.
Die in der Literatur beschriebenen massenspektrometrischen Fragmentierungsmechanismen von Peptiden sollten hierbei im Hinblick auf die ungewöhnlichen Peptaibolstrukturen kritisch betrachtet werden und auftretende Abweichungen mechanistisch erklärt werden.

Bereits als Rohmaterial vorliegende Peptaibole sollten dann sequenziert, evtl. bekannte Strukturen bestätigt und neue Analoga bestimmt werden. Weiterhin sollten bisher nicht untersuchte Schimmelpilze in Submerskultur angezogen werden und die von ihnen gebildeten Peptaibole durch chromatographische Verfahren isoliert und anschließend sequenziert werden.
Die Positionen der evtl. in den Peptaibolen enthaltenen isobaren AS sollten durch gaschromatographische Analyse von durch Methanolyse aus den Peptaibolen generierten Dipeptiden identifiziert werden.

Ein abschließend durchgeführter biologischer Aktivitätstest sollte antibiotische und hämolytische Wirkungen der Isolate aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Instrumentelle Anordnung und Parameter

Im folgenden sind die zur Sequenzierung der Peptaibole eingesetzten Instrumente aufgeführt und spezifiziert, insofern die Parameter nicht in den Publikationen [A - C] enthalten sind.

2.1.1 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie

Eine HPLC-Anlage HP 1100 (Hewlett Packard, D-76337 Waldbronn) bestehend aus Entgaser, Gradientenmischer, binärer HPLC-Pumpe und Autosampler derselben Serie wurde verwendet, entweder verbunden mit einem UV-Detektor (Hewlett-Packard) oder on-line gekoppelt an das Massenspektrometer.

Stationäre Phasen:

1. Superspher® 100 RP-18, 250 mm × 4 mm i.D., 4 µm (Merck, D-64271 Darmstadt)
2. Spherisorb ODS, 250 mm × 8 mm i.D., 3 µm (Grom, D-71083 Herrenberg)
3. Fluofix® 1 EW 425, 250 mm × 4 mm i.D., 5 µm (Maisch High Performance LC, D-72119 Ammerbusch)

Die Eluenten setzten sich aus Acetonitril, Methanol (beide Merck) und H_2O bidest. zusammen. Die genauen Anteile sind in [A - C] beschrieben. Um Glu enthaltende Peptaibole von der Säule zu eluieren, wurde 0.1 % TFA (Fluka, Buchs, Schweiz) zu den Eluenten hinzugegeben [B].

2.1.2 Elektrosprayionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie

Zur Sequenzierung der Peptaibole wurde ein Elektrosprayionisierungs-Tandem-Massenspektrometer (ESI-MS) vom Typ LCQ (ThermoQuest Finnigan MAT, San José, USA) verwendet. Die Peptaibole wurden entweder per Direktinjektion [A] oder nach flüssigchromatographischer Trennung analysiert [B, C]. Die jeweiligen gerätespezifischen Einstellungen sind in [A - C] beschrieben.

2.1.3 Gaschromatographie

Die isolierten Peptaibole wurden auf Chiralität sowie Stöchiometrie untersucht [A, B], in [C] wurde weiterhin eine nicht-chirale Untersuchung enthaltener AS durchgeführt. Sämtliche Bestimmungen der AS-Zusammensetztung wurden im SIM-Modus durchgeführt. Hierbei werden selektiv innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls nur charakteristische Massenfragmente einzelner AS detektiert, wodurch die Empfindlichkeit deutlich gesteigert wird.

2.1.3.1 Herstellung von Lösungen und Reagenzien für die Gaschromatographie

AS-Standardlösungen

Es wurden auf das jeweilige analytische Problem angepaßte quantitativ definierte Standardlösungen eingesetzt. Aufgrund der hohen Genauigkeit und der einfachen Handhabung wurde als Ausgangslösung ein kommerzielles äquimolares AS-Gemisch der proteinogenen AS verwendet, dem nach Bedarf entsprechende Mengen an Aminoalkoholen und nicht-proteinogenen AS zugesetzt wurde [A - C].

Alkohol/HCl-Reagenzien für die Veresterung

Vorgekühltes AcCl wurde tropfenweise zu dem im Eisbad gekühlten und gerührten Alkohol zugesetzt, so daß eine der jeweiligen Fragestellung [A - C] angepaßte Menge HCl-Lösung im entsprechenden Alkohol resultierte (Zumwalt et al. 1987).

2.1.3.2 Chirale Aminosäurenanalyse mittels GC-SIM-MS

Zur chiralen Analyse der AS-Derivate wurde ein Gaschromatograph GC 17 A mit Quadrupol-Massenspektrometer QP 5000 und Split/Splitless-Injektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) verwendet [A - C].

Systemeinstellungen

Injektor- und Detektortemperatur jeweils	250 °C
Elektronenstoßenergie:	70 eV
Detector Gain:	1.5 kV
Split-Verhältnis bei Injektion:	1:10 bis 1:50
Injektionsvolumen:	1 µl
Trägergas	Helium 5.0 (Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)

Säule:

Chirasil-L-Val® (*N*-Propionyl-L-Valin-*tert*-Butylamide-Polysiloxan), Fused-Silica-Kapillarsäulen, 25 m x 0.25 mm i.D., stationäre Phase 0.12 µm (Chrompack, Middelburg, Niederlande)

Druckführung des Trägergases und Temperaturführung des Säulenofens erfolgten wie in [A] beschrieben.

Die Peptaibole wurden bei 110 °C in 6 M HCl für 24 h totalhydrolysiert. Die freigesetzten AS wurden zu den *N*-PFP-AS-2-Propylester derivatisiert, Aminoalkohole lagen unter diesen Bedingungen als *N(O)*-Bis(PFP)-Aminoalkohol vor [A - C].
Lediglich die Konfiguration von Iva konnte unter diesen Derivatisierungsbedingungen nicht ermittelt werden. Daher wurden für die Chiralitätsbestimmung von Iva die *N*-Acetyl-Iva-2-Propylester eingesetzt [A - C].

Die folgende Tabelle zeigt die Retentionszeiten und zugehörige charakteristische Massenfragmente der in den untersuchten Peptiden detektierten AS und Aminoalkohole [A - C].

Tabelle 2.1 Retentionszeiten [min] und charakteristische Massenfragmente [*m/z*] der in den untersuchten Peptiden detektierten Aminosäuren (AS) und Aminoalkohole (AA); chirale Analyse der PFP-2-Propylester.

AS/AA	Retentionszeit [min]	*m/z*
Aib	5.08	204
D/L-Iva	5.98	216, 218
D-Ala	7.44	190, 191
L-Ala	9.18	190, 191
D-Val	11.09	203, 218
L-Val	12.44	203, 218
L-Valol	13.94	188, 218
Gly	14.02	176
D-Pro	17.33	216
L-Pro	17.65	216
D-Leu	18.18	190, 203
L-Leuol	18.60	190
L-Leu	20.65	190, 203
trans-4-L-Hyp	24.25	214
D-Phe	31.34	91
D-Glu	31.74	202
L-Pheol	32.00	91, 280
L-Phe	32.24	91
L-Glu	32.47	202

2.1.3.3 Achirale Aminosäurenanalyse mittels GC-SIM-MS

Zur nicht-chiralen Analyse der AS-Derivate wurde ein Gaschromatograph HP 6890 mit einem Quadrupol-Massenspektrometer der Serie 5972 (Hewlett-Packard) verwendet [C].

Systemeinstellungen

Injektor- und Detektortemperatur jeweils	250 °C
Elektronenstoßenergie:	70 eV
Detector Gain:	1.5 kV
Split-Verhältnis bei Injektion:	1:50
Injektionsvolumen:	1 µl
Trägergas:	Helium 5.0 (Messer-Griesheim)

Säule:

Heliflex® AT5 (crosslinked 5% Diphenyl- 95%-Dimethyl Siloxan), Länge 30 m x 0.25 mm i.D., Filmdicke 0.25 µm (Alltech Associates, Deerfield, USA)

Temperaturprogramm:

80 °C - 3 °C/min - 120 °C - 8 °C/min - 160 °C - 15 °C/min 260 °C 2 min.

Zur gaschromatographischen Analyse wurden die zu den TFA-AS-*n*-Butylestern derivatisierten Aminosäuren und die *N(O)*-Bis(TFA)-Aminoalkohole eingesetzt [C].
In Tabelle 2.2 sind die Retentionszeiten und zugehörigen charakteristischen Massenfragmente der in den untersuchten Peptiden detektierten AS und Aminoalkohole aufgeführt.

Tabelle 2.2 Retentionszeiten und charakteristische Massenfragmente [*m/z*] der in den untersuchten Peptiden detektierten Aminosäuren (AS) und Aminoalkohole (AA); Nicht-chirale Analyse der TFA-*n*-Butylester.

AS/AA	Retentionszeit [min]	*m/z*
Valol	6.02	139, 138, 168
Leuol	7.64	140, 153, 182
Ala	10.50	140,141
Aib	10.74	154
Gly	11.24	126, 127
Iva	12.88	166, 168, 184
Val	14.30	153, 168, 169
Leu	16.33	140, 153, 182
Pheol	17.95	91, 230
Pro	19.14	166
Hyp	19.60	164
Phe	22.00	91, 148, 190, 216
Glu	23.03	81, 82, 206

2.1.3.4 Dipeptidanalyse mittels GC-MS

Da unter den gewählten Bedingungen bei der Sequenzierung mittels ESI-MS isobare Aminosäuren nicht unterschieden werden konnten, wurden deren Positionen unter Verwendung von GC-MS identifiziert [A]. Weiterhin konnten mittels Dipeptidanalytik die Peptidfragmente, welche aufgrund niedriger Masse mit dem ESI-MS nicht sequenziert werden konnten, bestimmt werden [A - C].

Diese Methode konnte auch eingesetzt werden, um die *N*-terminale AS der Peptaibole zu ermitteln. Hierzu wurde das Methanolysat ohne folgende Acylierung mit dem Gaschromatographen analysiert [A, C].

Die Dipeptide wurden mittels einem Gaschromatographen HP 6890 gekoppelt an ein Quadrupol-Massenspektrometer der Serie 5972 (Hewlett-Packard) detektiert [A - C].

Systemeinstellungen

Injektor- und Detektortemperatur jeweils	250 °C
Elektronenstoßenergie:	70 eV
Detector Gain:	1.5 kV
Split-Verhältnis bei Injektion:	1:10 bis 1:2
Injektionsvolumen:	1 - 2 µl
Trägergas:	Helium 5.0 (Messer-Griesheim)

Säulen:

- HP-5MS (crosslinked 5 % Diphenyl- 95 % Dimethyl-Siloxan) Länge 30 m x 0.25 mm i.D. Filmdicke 0.25 µm (Hewlett-Packard)
- Heliflex® AT5 (crosslinked 5% Diphenyl- 95% Dimethyl-Siloxan), Länge 30 m x 0.25 µm i.D., Filmdicke 0.25 µm (Alltech Associates, Deerfield, USA)

Die Generierung der Dipeptide aus den Peptaibolen, die Derivatisierungsbedingungen, Retentionszeiten und charakteristische Massenfragmente der TFA-Dipeptid-Methylester sind in [A - C] beschrieben.

2.2 Mikrobiologische Arbeiten

2.2.1 Herkunft der verwendeten Pilzstämme

Die Herkunft der in [A - C] zur Isolierung von Peptaibolen eingesetzten Pilzstämme wird im Material- und Methodenteil der jeweiligen Publikation beschrieben.

2.2.2 Fermentationsmedien

Die Zusammensetzung des für die Anzucht der Schimmelpilze in Platten- und Submerskultur verwendeten Malzextraktmediums, sowie die genauen Spezifikationen der

in den Publikationen [A - C] verwendeten Geräte und Materialien erfolgt jeweils im Material- und Methodenteil der entsprechenden Arbeiten.

2.2.3 Anzucht der Schimmelpilze in Submerskultur

Alle Schimmelpilze wurden im Malzextraktmedium fermentiert.
Die Produktion der Peptaibole wurde mittels dünnschichtchromatografischer Untersuchung von täglich steril entnommenen Proben unter H_2O- und TDM-Detektion (Von Arx et al. 1976) überwacht.
Am Tage der höchsten Peptaibolproduktion wurde das Pilzmyzel von der Kulturbrühe getrennt und verworfen. Zur weiteren Aufreinigung der Peptide wurde ausschließlich die Kulturbrühe verwendet [A, C].
Trichotoxin A-40 lag bereits als Rohmaterial vor [B].

2.2.4 Aufreinigung und Isolierung der Peptaibole

Die Peptaibole wurden mittels MPLC unter Verwendung von XAD-2 Säulenmaterial, und APLC mit LH-20 Material aus der Kulturbrühe isoliert [A, C].
Weitere Reinigungsschritte wie MPLC unter Verwendung von LiChroprep RP-8 Material bei dem Peptidisolat aus *Stilbella erythrocephala* [C] oder semipräparativer HPLC bei Trichovirin II [A] sind in dem jeweiligen Material- und Methodenteil beschrieben.
Die genauen Spezifikationen der in den Publikationen [A - C] zur Isolierung der Peptaibole verwendeten Chemikalien und Materialien erfolgen jeweils im Material- und Methodenteil der entsprechenden Arbeiten.

2.2.5 Biologische Aktivitätsprüfung der isolierten Peptaibole

Zur Prüfung der biologischen Aktivitäten der Isolate wurde der Agar-Diffusions-Test gegen *Bacillus subtilis* DSM 347, *Staphylococcus aureus* DSM 797 und *Escherichia coli* DSM 498 eingesetzt. Weiterhin wurde ein Hämolysetest durchgeführt. Die benötigten Materialien sowie die Durchführung der Tests sind in [A] beschrieben.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die in den Originalartikeln [A - C] publizierten Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten zusammenfassend dargestellt und diskutiert.

3.1 Sequenzierung von Trichovirin II, Peptaibol-Antibiotika aus *Trichoderma viride* NRRL 5243

1972 wurde die Isolierung und Charakterisierung von Trichotoxin (TT) A und B aus *Trichoderma viride* NRRL 5242 und NRLL 5243 beschrieben (Hou et al. 1972). Irmscher et al. (1978) zeigten, daß TT A aus zwei Peptidgruppen (TT A-40 und TT A-50) besteht. Zur Isolierung von TT wurde später eine Kultur von *T. viride* NRLL 5243 in Fernbachkolben eingesetzt. Die aus diesem Pilz isolierten Peptaibole waren jedoch nicht identisch mit den ursprünglich aus *T. viride* NRRL 5242 isolierten Komponenten. Daher wurde der Name dieser Peptaibole in Trichovirin (TV) geändert (Kieß et al. 1990; Brückner et al. 1991, 1993).
In einem weiteren Züchtungsansatz von *T. viride* NRRL 5243, durchgeführt in Submerskultur, konnte neben TV eine zweite Peptidgruppe detektiert werden, die nur unter diesen Fermentationsbedingungen gebildet wurde.

Die Primärstruktur dieser Peptaibole sollte unter Verwendung von ESI-MS-MS per Direktinjektion im positiven Ionisierungsmodus und GC-EI-MS aufgeklärt werden [A].

Das analytische Elutionsprofil der Peptaibole auf RP-18 Phase (ODS, Octadecylsilyl-) ist in Abb. 1 [A] dargestellt. Mittels semipräparativer HPLC konnten 6 Peptaibolfraktionen getrennt werden, welche auf einer ODS-Phase rechromatographiert wurden. Unter diesen Bedingungen eluierten alle Fraktionen jeweils als nur ein Peak (Ausnahme Fraktion 2 und 6), was auf hoch-reine Substanzen hindeutet. Die Untersuchung der Fraktionen mittels ESI-MS im positiven Ionisierungsmodus zeigte jedoch eine weitere Mikroheterogenität an.
Daher wurden die auf einer ODS-Phase nicht trennbaren Peptaiboleinzelfraktionen unter Verwendung einer nicht-polaren perfluorierten stationären Phase (Fluofix®-Phase) untersucht, welche eine weitere Auftrennung der Einzelfraktionen ermöglichte (Einschübe in Abb. 2 [A]).

Die Fluofix®-Phase ist eine Umkehrphase, bestehend aus hoch-reinem, porösen Kieselgel, welches mit verzweigten Fluorkohlenwasserstoffen belegt ist. Durch ihre leicht negativ geladene teflonähnliche Oberfläche weist diese stationäre Phase eine andere Trenncharakteristik als gewöhnlich verwendete ODS-Phasen auf (Danielson et al. 1991; Monde et al. 1996). Am Paracelsin (PC) konnte gezeigt werden, daß eine partielle Elutionsumkehr der Komponenten PC A und B gegenüber einer RP-18 Phase unter Verwendung der Fluofix®-Phase auftritt (Jaworski et al. 1998).

Durch die Kombination von HPLC on-line ESI-MS (Abb. 3a in [A]) und Untersuchungen der Fraktionen per MS-MS mittels Direktinjektion (Abb. 3b,c in [A]) konnten so die Peptaibole TV II 1a - 6b in ihrer Primärstruktur aufgeklärt werden, lediglich die enthaltenen isobaren AS und Val/Iva konnten unter Verwendung von ESI-MS nicht zugeordnet werden. Die detektierten Peptidfragmente sind in Tabelle 1 [A] aufgeführt.

Die Bestimmung der Positionen der isobaren AS erfolgte unter Verwendung von GC-MS. Die eingesetzte Methode beruht auf der Generierung von Dipeptid-Methylester aus den Peptaibolen, gefolgt von Detektion der Dipeptide mittels GC-MS [A].

Die Positionen der enthaltenen isobaren AS der Peptaibole TV II 1b – 6b konnten so zweifelsfrei zugeordnet werden. Lediglich die Position Vxx^{7} in TV II 1a und 2c war auf diese Weise nicht bestimmbar, da neben dem Dipeptid Glu-Val in beiden Fraktionen ebenfalls Glu-Iva detektiert wurde (Abb. 4 in [A]).
Auch die AS-Positionen Vxx^{1}, Vxx^{5} und Vxx^{12} der Antiamoebine XIII und XIV in [C] konnten mit dieser Methode identifiziert werden, das mittels ESI-MS nicht detektierbare Dipeptid Pro^{13}-Leu^{14} in [B] wurde ebenso auf diese Weise aufgeklärt.

Die durchgeführten antibiotischen Tests gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* zeigten biologische Aktivitäten von TV II, wie sie für Peptaibole dieser Kettenlänge bekannt sind (Tab. 3 in [A]) (Irmscher und Jung 1977).

Die zur Bestimmung der Positionen isobarer AS eingesetzte, bislang nur partiell beschriebene Methode wird im folgenden detailliert dargestellt.

3.1.1 Dipeptidanalyse mittels GC-MS

Die Retentionszeiten, diagnostische Massenfragmente und relative Intensitäten der zur Positionsermittlung eingesetzten Dipeptide sind in Tab. 2 [A] aufgeführt. Die Positionen isobarer AS, welche mittels GC-MS zugeordnet wurden, sind in Abb. 4 [A] unterstrichen. Dipeptide, die nicht käuflich zu erwerben waren, konnten durch Methanolyse von definierten, diese Dipeptide enthaltenden Peptaibolen erzeugt werden. In Abb 3.1 ist das Massenspektrum von dem Dipeptid TFA-Glu-Iva-OMe, generiert aus Antiamoebin, dargestellt, Abb. 3.2 zeigt das Massenspektrum von TFA-Leu-Leu-OMe (Sigma). Im jeweiligen Einschub wird die Struktur der derivatisierten Dipeptide und deren charakteristische Massenfragmente dargestellt.

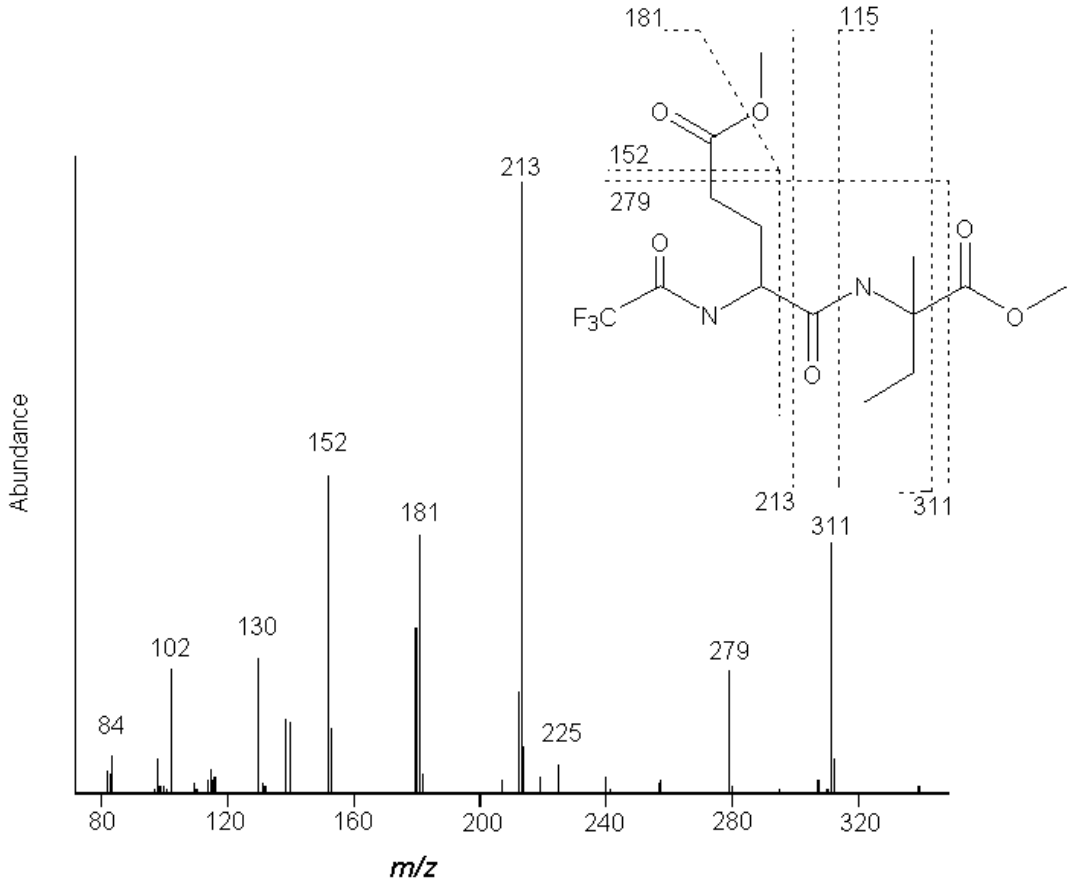


Abbildung 3.1 Massenspektrum und Fragmentierungsschema von TFA-Glu-Iva-OMe.

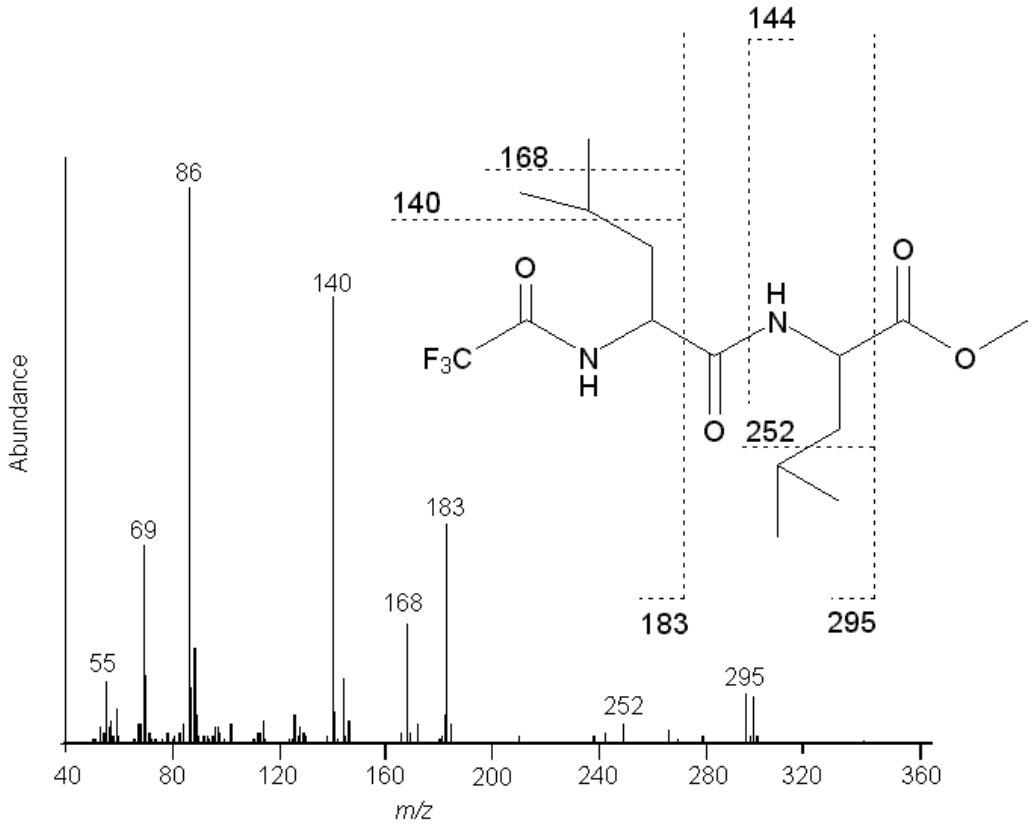


Abbildung 3.2 Massenspektrum und Fragmentierungsschema von TFA-Leu-Leu-OMe (RT 12.10 min).

Wie aus den Abbildungen ersichtlich, erfolgt die Bildung der jeweiligen Hauptfragmente unter Spaltung der C^{α}–CO Bindung. Neben den Fragmenten, die aus der *N*-terminalen AS herrühren, sind die jeweiligen $(M - COOCH_3)^+$ detektierbar. Eine charakteristische Seitenkettenfragmentierung der *C*-terminalen AS kann nur bei dem Dipeptid Leu-Leu detektiert werden, charakteristische Fragment-Ionen bei *C*-terminalem Val/Iva treten nicht oder nur in geringen Mengen auf (Tab. 2 in [A]).
Da sich jedoch die Retentionszeiten der Dipeptide, die *C*-terminal isobare Val/Iva enthalten, unterscheiden, können diese aufgrund von Retentionszeit in Kombination mit dem Fragment-Ion $(M - COOCH_3)^+$ und *N*- terminalen charakteristischen Fragmenten zweifelsfrei zugeordnet werden (siehe Tab. 2 [A]).
Die Zuordnung von Leu/Ile durch eine charakteristische Fragmentierung ist aufgrund des gegenüber Val/Iva längeren Acylrestes am C^{α} auch möglich, wenn Leu/Ile in *C*-terminaler Position des Dipeptides stehen.

Die vorgestellte Methode ist nicht, oder nur eingeschränkt, zur Quantifizierung einsetzbar, da die Response-Faktoren der Iva-Dipeptide aufgrund deren sterischen Hinderung und der damit verbundenen niedrigen Derivatisierungsausbeute gegenüber Val-enthaltenden Dipeptiden sehr niedrig sind. Auch kann ein zur Quantifizierung notwendiger äquimolarer Standard nur schwer hergestellt werden, da nicht bekannt ist, wie hoch die Derivatisierungsausbeute aus den methanolysierten Standard-Peptaibolen ist.

Eine genauere Untersuchung von Reaktionsbedingungen und quantitativer Auswertung der resultierenden detektierbaren Dipeptide zeigte, daß die Ausbeute durch kürzere Methanolyse (6 h), gefolgt von kürzerer Acylierung (15 min) bei niedrigerer Temperatur (70 °C) deutlich gesteigert werden konnte [C].
Durch die niedrigere Reaktionstemperatur wird insbesondere die Bildung von Diketopiperazinen, welche der Acylierung unzugänglich sind, vermindert und die weitere Hydrolyse der Dipeptide zu den freien AS unterdrückt.

Die GC-MS Analyse von derivatisierten Dipeptiden zur Zuordnung isobarer AS hat gegenüber NMR-Untersuchungen den großen Vorteil, daß keine hoch-reinen Peptide vorliegen müssen und Mikrogramm-Mengen an Peptiden ausreichend sind.

3.2 Sequenzierung der Peptaibol-Antibiotika Trichotoxin A-40 mittels on-line HPLC-ESI-MS

In dieser Arbeit sollten die Trichotoxine A-40 untersucht werden. Diese sind bereits beschrieben (Brückner und Przybylski 1984), jedoch wurde die ursprüngliche Sequenzierung mittels GC-MS von 2 *N*-terminalen und 3 *C*-terminalen aus der mikroheterogenen Mischung mittels Trifluoracetolyse erhaltenen Peptidfragmenten durchgeführt. Die Gesamtsequenz der Peptide wurde dann durch korrespondierende Mengen der *C*- und *N*-terminalen Peptidfragmente zugeordnet (Przybylski et al. 1984). Die Zuordnung der Peptide zu dem charakteristischen HPLC-Elutionsprofil, sowie die Angabe der relativen Anteile der Peptaibole an der mikroheterogenen Gesamtmischung konnte jedoch nicht getroffen werden.
Daher sollte in dieser Arbeit die richtige Zuordnung der Peptidfragmente zu den Sequenzen überprüft, die relativen Mengen der Peptide bestimmt und neue, bislang nicht bekannte Komponenten sequenziert werden.
Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag somit in der Entwicklung und Durchführung einer Methode, die es ermöglichte, die Sequenzen schnell und unter Verwendung wenig Probenmaterials durchzuführen. Da die Trichotoxine A-40 schon teilweise in ihren Primärstrukturen bekannt waren, sollten sie des weiteren als Modelsubstanzen dienen, an denen die Entstehung und Struktur der Fragment-Ionen erklärt werden sollte.

Die Sequenzierung wurde mittels on-line HPLC- ESI-MS^n durchgeführt. Eine, wie in [A] durchgeführte, aufwendige semipräparative HPLC-Isolierung der Peptide entfiel.
Da die chirale AS-Analyse nur das Vorhandensein von D-Iva und L-Leu anzeigte, Val und Ile jedoch nicht detektiert wurden, war eine Dipeptidanalyse isobarer AS nicht notwendig. Lediglich das Fragment von (Pro-Leu)‘ (MM 211 Da) (Abb. 3e in [B]), welches wegen zu niedriger molekularen Masse nicht weiter fragmentiert werden konnte, wurde mittels GC-MS wie unter [A] beschrieben untersucht.

Das Elutionsprofil des Trichotoxin A-40 ist in Abb. 1a [B] dargestellt. Die Glu enthaltenden Peptide (Aydin et al. 1982) konnten nur unter Verwendung eines sauren Eluenten von der eingesetzten ODS-Phase eluiert werden. Durch den sauren Eluenten wird das Dissoziationsgleichgewicht von im Peptid enthaltenen sauren AS

in Richtung der protonierten Form verschoben, so daß die Peptide in definierten Peaks von der stationären Phase eluieren.
Im Prinzip sollte daher bei der HPLC-Detektion von Peptaibiotika und Peptiden allgemein neben einem normalerweise verwendeten neutralen Eluenten auch ein saurerer Eluent eingesetzt werden, da sonst saure AS enthaltende Peptide nicht detektierbar sind.

Der Einsatz des sauren Eluenten zeigte Auswirkungen auf die Molekül-Ionen der Peptaibole. Das Pseudomolekül $(M+Na)^+$, welches in Abb. 3a [A] das intensivste Ion darstellte, wurde fast vollständig durch das $(M+H)^+$ verdrängt (Abb. 3a [B]).
Des weiteren wurden zwei koeluierende Peptide bei Peak 5 mit gleicher molekularer Masse detektiert (siehe Abb. 3a [A]). Durch den Unterschied von jeweils 14 Da zwischen den *N*- und *C*-Termini der Peptide konnten diese trotz ihrer Koelution sequenziert werden.

Die Bestimmung der Primärstruktur der Peptaibole wurde durch on-line HPLC-ESI-MS und MS-MS bzw. MS^3 erreicht, wie in Abb. 4 [B] zusammenfassend dargestellt. Die charakteristischen detektierten Fragment-Ionen sind in Tab. 1 [B] aufgeführt.

Mittels HPLC on-line-ESI-MS^n im positiven und negativen Ionisierungsmodus konnten so die Sequenzen der bereits beschriebenen Komponenten (als 3, 4, 5a in [B] bezeichnet) bestätigt werden und drei weitere bisher unbekannte Strukturen (1, 2, 5) erfolgreich sequenziert werden (Abb. 2 [B]).

Im folgenden werden die angewandten Ionisierungsmodi, die jeweils detektierten Fragment-Ionen und daraus resultierende Fragmentierungsmechanismen diskutiert.

3.2.1 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus

Peptaibole zerfallen unter FAB-MS Bedingungen an der für diese Substanzklasse charakteristische(n) Aib-Pro Position(en). Dieses Charakteristikum wurde auch unter ESI-MS Bedingungen detektiert (Abb. 3a [A]; Abb. 3a [B]). Die Trichotoxine zerfallen an dieser Stelle in ein *N*-terminales Acylium-Ion (b_{12}) und ein *C*-teminales Prolylpeptid (y_6‘) (Abb. 3a [B]).

Die aus den $(M+H)^+$ durch MS-MS bzw. aus b_{12} durch MS^3 erzeugten Tochterionen gehörten ausnahmslos der b_n Serie an, die höchstwahrscheinlich Oxazolon-Struktur aufweisen (siehe Kap. 1.3.1).

Die Struktur der durch die Spaltung an der Aib-Pro Bindung entstehenden *N*-terminalen Prolylpeptide der y_n Serie wird jedoch meist nicht näher beschrieben (Lange et al. 1989; Iida et al. 1994; Huang et al. 1995) oder falsch interpretiert (Kanai et al. 1996).

So beschreiben Kanai et al. (1996) ein *C*-terminales Prolylpeptid (*m/z* 789 Da), welches die Sequenz (Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol) darstellen soll.

Auf Grund der protonierten AS-Massen liegt die kalkulierte Masse des internen Peptidfragments jedoch lediglich bei 788 Da. Die um 1 Da erhöhte Masse würde daher die Ladung des Prolylpeptides ändern, so daß das Peptid doppelt geladen wäre. Laut *m/z*-Darstellung müßte es dann bei 394.5 Da erscheinen. Ein nicht erkannter Gln (128 Da) gegen Glu (129 Da) Austausch scheint daher wahrscheinlicher.

Ein Mechanismus der Bildung von y_6 und Folgefragmenten ist von Iida et al. (1993) vorgeschlagen worden (Abb 3.3).

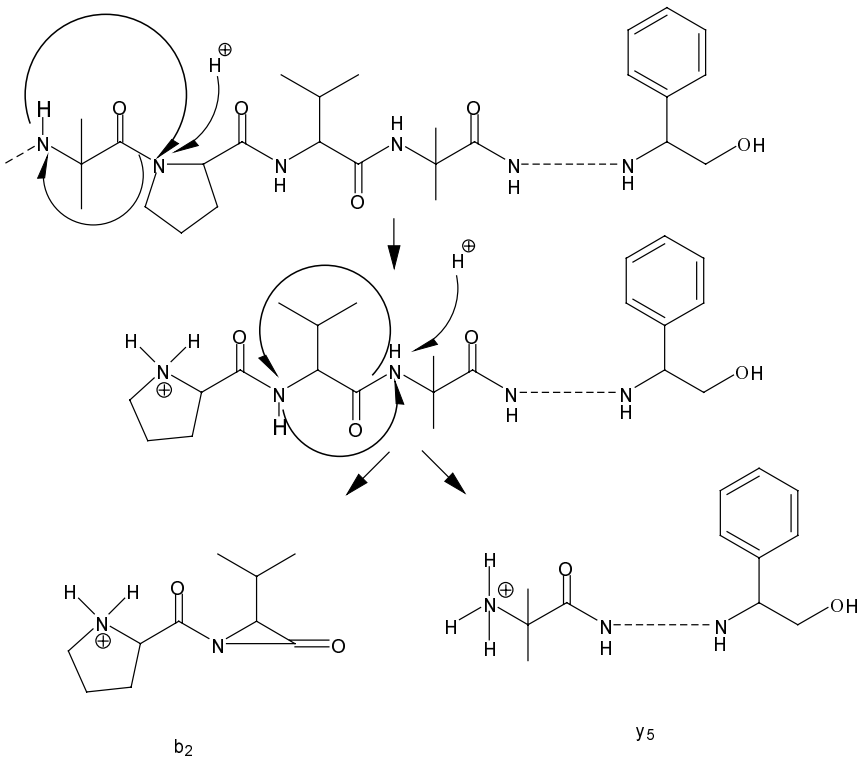


Abbildung 3.3 Bildung des *C*-terminalen y_6 Fragmentes und der daraus entstehenden Tochterfragmente (Iida et al. 1993); ---- = -Iva-Gln-Gln-.

Laut Iida et al. (1993) wird das *C*-terminale y_6 Fragment durch Spaltung der Aib-Pro Bindung erhalten. Es wird postuliert, daß das entstehende Prolylpeptid auf Grund der höheren Basizität des *N*-terminalen Stickstoffes gegenüber der *C*-terminal gelegenen Hydroxylgruppe protoniert ist.
Durch die Protonierung des *N*-terminalen Prolins kann die aus Abb. 3e [B] ersichtliche H_2O-Abspaltung jedoch nicht erklärt werden. Daher scheint die in Abb. 3e [B] dargestellte Struktur des einfach protonierten $y_6{}'_P$ Fragments mit Lokalisierung der Protonierung am *C*-terminalen Aminoalkohol wahrscheinlicher.

Die Folgefragmente des internen Fragments y_6 wurden von Iida et al. (1993) mit b_2 bezeichnet (Abb. 3.3), was unrichtig ist, da b Fragmente laut Definition nicht von internen Fragmenten abstammen sondern Folgefragmente des Gesamtpeptides darstellen.
Außerdem wird die Ladung der Fragmente in Abb. 3.3 durch das *C*-terminale Pro generiert, bei Ionen der b_n Serie ist diese Ladung jedoch am *C*-Terminus lokalisiert (siehe Kap. 1.3.1). Sinnvoller erscheint hier die Bezeichnung (Pro-Leu)‘ (Pro ist nur einfach protoniert), wie aus Abb. 3e [B] ersichtlich.
Eine mögliche Struktur des (Pro-Leu)‘, basierend auf der von Yalcin et al. (1996) vorgeschlagenen Oxazolon-Struktur der b_n Serie ist in Abb. 3.4 dargestellt.

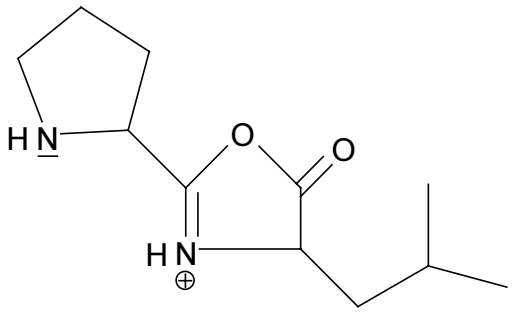


Abbildung 3.4 Mögliche Oxazolon-Struktur des internen Prolyl-Fragmentes (Pro-Leu)‘.

3.2.2 Sequenzierung im negativen Ionisierungsmodus

Die Ionisierung und Fragmentierung von Peptiden im negative Ionisierungs-Modus wurde bisher hauptsächlich unter Verwendung der FAB-MS Technik beschrieben.

Ausschließlich die Bildung des $(M-H)^-$ Ions wird berichtet (Williams et al. 1982; Neubauer und Mann, 1997).

Ramsay et al. (1995) zeigen, daß unter ESI-MS Bedingungen neben dem $(M-H)^-$ Pseudomolekül auch das radikalische Anion $(M)^-$ gebildet wurde, was durch die gegenüber FAB „weichere“ Ionisierungsmethode erklärt werden kann.

In [B] wurde ausschließlich das $(M)^-$ Ion detektiert (Einschub Abb. 3a [B]). Dieses Auftreten ist abhängig von dem pH-Wert des eingesetzten Eluenten, wie in der folgenden Abbildung (Abb. 3.5) am Beispiel von ZoomScan Spektren des Paracelsin A (PC A) gezeigt.

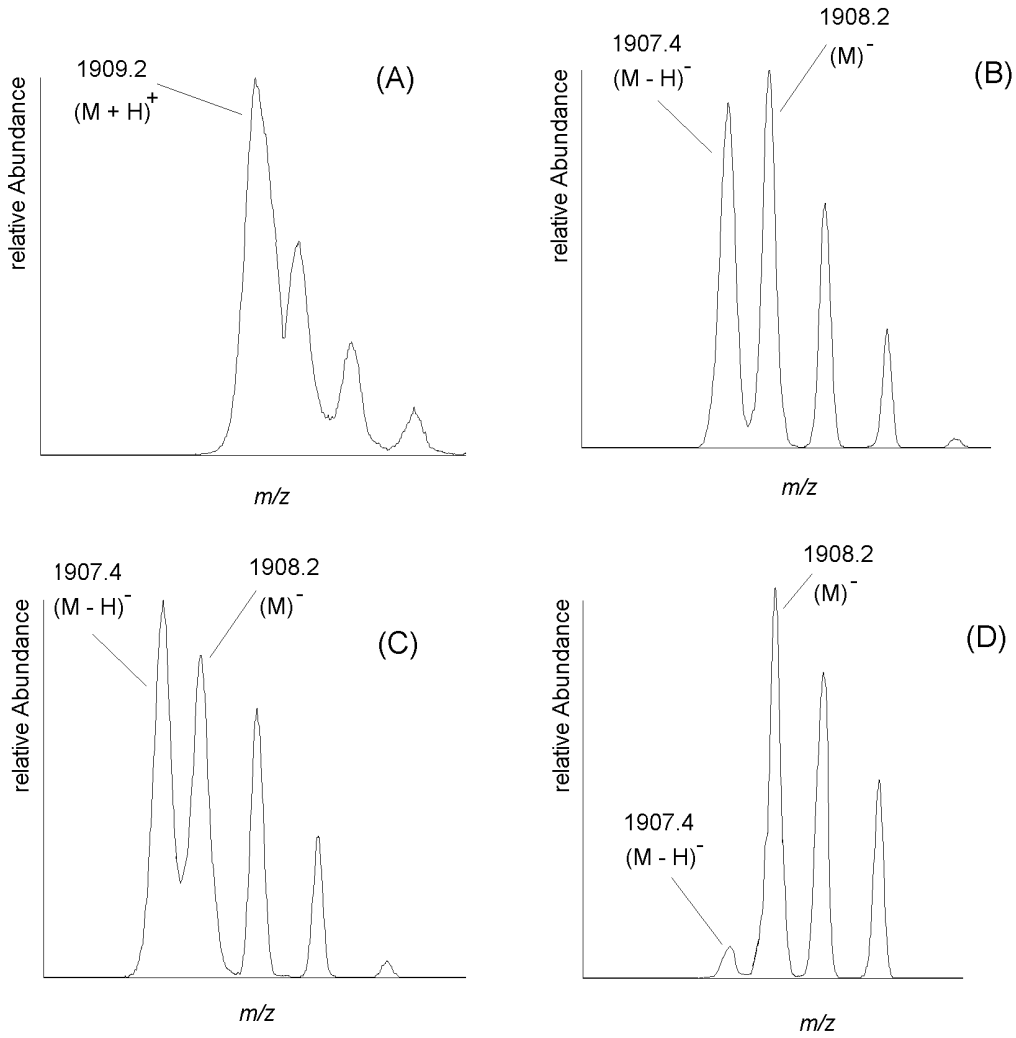


Abbildung 3.5 ZoomScan Spektren von PC A (MM = 1908 Da) Direktinjektion (3 µl/min): (A) positiver Ionisierungsmodus Lösungsmittel (LG) MeOH; (B) - (D) negativer Ionisierungsmodus, (B) LG (MeOH) neutraler pH, (C) LG MeOH + 1 % 4 M NH_3 (v/v), (D) LG MeOH + 1% TFA (v/v).

Im positiven Ionisierungsmodus wird neben den Isotopen-Peaks ausschließlich das $(M+H)^+$ Ion detektiert (A). Nachdem der Ionisierungsmodus gewechselt wird, ist nun $(M)^-$ sowie $(M-H)^-$ ausgeprägt, wie bereits von Ramsay et al. (1995) erwähnt (B). Wird der pH-Wert des Lösungsmittels erhöht, resultiert eine erhöhte Bildung des $(M-H)^-$ Ions (C), während eine Absenkung des pH-Wertes zu ausschließlicher Bildung des anionischen $(M)^-$ führt (D).

Die Anwendung von MS-MS auf $(M)^-$ resultierte in der Bildung der y_N Serie (N für negativen Ionisierungsmodus). Durch die detektierten Fragmente konnte neben der *N*-terminalen Acetylierung von Aib[1] auch die Fragment-Ionen y_{17} bis y_{12} detektiert werden.
Die Sequenzierungsergebnisse aus dem positiven Ionisierungsmodus wurden daher durch den negativen Ionisierungsmodus bestätigt und erweitert (Abb. 4 [B], Tab. 1 [B]). Eine mögliche Struktur der y_N-Fragmente (Aziridinolat-Anion) und der H_2O Abspaltung aus $(M)^-$ sind in der Abb. 3d [B] dargestellt.

3.3 Neue Sequenzen und neue Produzenten des Peptaibol-Antibiotikums Antiamoebin

Das mikroheterogene Antiamoebin (AAM) zählt zu den am längsten bekannten Peptaibolen (Thirumalachar 1968) und ist wegen seiner biologischen Wirksamkeit in vielen Studien untersucht worden.
AAM weist ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten bei schwach hämolytischer Wirkung auf (Thirumalachar 1968; Brückner et al. 1984; Matha et al. 1992). Es wurde kürzlich diskutiert, daß AAM sowohl als Porenbildner in biologischen Membranen, als auch als „Ion-carrier“ wirken kann (Duclohier et al. 1998).
Neben der Hauptkomponente AAM I sind noch 4 weitere Sequenzanaloga (Antiamoebin II-V) beschrieben (Pandey et al. 1977b, 1978; Rinehart 1983; Stroh et al. 1985). Jedoch wurden die Sequenzen von AAM II bis V nicht mit den charakteristischen HPLC-Elutionsprofilen korreliert und keine Mengenangaben der jeweiligen Komponenten an der Gesamtmenge der Peptide getroffen. Daher kann die Relevanz der einzelnen Peptide und deren Anteil an den biologischen Aktivitäten der Gesamtmischung nicht beurteilt werden. Des weiteren sind von den AAM IV und V nur *N*-terminale Teilsequenzen veröffentlicht, deren Richtigkeit aufgrund weiterer Mikroheterogenität am *C*-Terminus der Peptide fraglich ist.

Daher sollten in dieser Arbeit die bekannten Sequenzen an Hand kommerziell erhältlichem AAM aus *Emericellopsis synnematicola* (Sigma) und Original-AAM, isoliert aus *E. poonensis* ATCC 16540 (Thirumalachar 1968), überprüft, sowie dem HPLC Elutionsprofil zugeordnet und deren relative Bestandteile bestimmt werden. Des weiteren sollten neue, bisher nicht bekannte Analoga in ihrer Primärstruktur aufgeklärt werden.
Da die Synthese von AAM auch von Schimmelpilzen außerhalb der Gattung *Emericellopsis* diskutiert wird (Brückner und Reinecke 1989; Brückner et al. 1989a) sollten die bereits in mehreren Screeningverfahren als potentielle Produzenten dieses Peptaibols erkannten Schimmelpilze *Stilbella erythrocephala* ATTC 28144*, Gliocladium catenulatum* CBS 511.66 und *Stilbella fimetaria* CBS 548.84 (Brückner und Reinecke 1988; Brückner et al. 1989a,b) fermentiert, die produzierten Peptide isoliert und analysiert werden. Bereits vorliegende Peptaibole aus *E. salmosynnemata* CBS

382.62 (Brückner et al. 1980, 1983) und *E. synnematicola* CBS 176.60 (Kieß und Brückner 1989) wurden weiterhin untersucht.

Das HPLC Elutionsprofil der verschiedenen AAM Isolate unter identischen Bedingungen ist in Abb. 1 [C] dargestellt. Unter Verwendung eines aus MeOH/MeCN/H_2O bestehenden Eluenten und einer ODS-Phase konnten die mikroheterogenen Peptaibole früheren HPLC-Untersuchungen gegenüber bedeutend besser in die Einzelkomponenten getrennt werden (vgl. Das et al. 1986, 1988).
Die Hauptkomponente in jedem Isolat stellte AAM I dar, gefolgt von AAM III. Die relativen Mengen der jeweiligen AAM-Komponenten an der jeweiligen mikroheterogenen Mischung sind in Tab. 1 [C] dargestellt.
Die chirale AS-Analyse zeigte, daß Val und Ile in keinen Isolaten vorlagen. Lediglich im Isolat von *S. erythrocephala* ATCC 28144 war neben D-Iva auch L-Val nachweisbar. Daher wurden die Peptide dieses Isolats semipräparativ gereinigt und die Positionen der isobaren AS unter Verwendung der Dipeptidanalytik wie in [A] beschrieben bestimmt.
Es zeigte sich, daß eine nicht-chirale AS-Analyse eine genauere Stöchiometrie ergab, da unter den Derivatisierungsbedingungen die TFA-AS-*n*-Butylester von Aib und Iva deutlich höhere Responsefaktoren gegenüber den zur chiralen AS eingesetzten PFP-AS-2-Propylestern aufwiesen.
Die durch die Kombination von chiraler und nicht-chiraler AS-Analyse errechneten Stöchiometrien sind in Tab. 2 [A] dargestellt. Die Stöchiometrien sind bezogen auf L-Pheol (1.00), da der Aminoalkohol in AAM nicht im Zuge der Mikroheterogenität der Peptide ausgetauscht wird.
Zur Sequenzierung der Peptaibole wurden die Isolate von *E. synnemata* ATCC 16540 (Sigma), *E. poonensi*s ATCC 16411 (Hindustan Antibiotics) und *S. erythrocephala* ATCC 28144 gewählt. Die Isolate der anderen Schimmelpilze wurden durch Übereinstimmungen von Retentionszeiten, sowie identischen molekularen Massen und gleichen charakteristischen Fragmentierungsmustern mit den zur Sequenzierung herangezogenen AAM zugeordnet. Neben den bekannten AAM I und II konnten die Sequenzen von AAM IV und V bestätigt und 11 weitere, bislang nicht bekannte, Komponenten (AAM VI - XVI) erfolgreich in ihrer Primärstruktur aufgeklärt werden. Der für AAM III beschriebene Gln^{11}/Glu^{11} AS-Austausch (Rinehart 1983) konnte nicht bestätigt werden.

Es konnte nachgewiesen werden, daß auch Spezies der Schimmelpilze *Stilbella* und *Gliocladium*, neben *Emericellopsis* und *Cephalosporium*, in der Lage sind, AAM zu produzieren. Da der Einsatz dieser Spezies in der biologischen Schädlingsbekämpfung diskutiert wird (Papavizas 1985; Lewis und Papavizas 1993; Schirmböck et al. 1994; Köhl et al. 1997), scheinen die mikroheterogenen AAM, und damit Peptaibole allgemein, in den Mechanismus der antibiotischen Aktivität einbezogen zu sein.

Die Sequenzierung von AAM ist in Abb. 6 [C] am Beispiel einer bisher unbekannten Komponente (AAM VI) zusammengefaßt und wird im folgenden diskutiert.

3.3.1 Sequenzierung von Antiamoebin

Das HPLC Elutionsprofil des kommerziell erhältlichen AAM von *E. synnemata* ATCC 16540 (Sigma) ist in Abb. 3 [C] dem zur erstmaligen Sequenzierung eingesetzten Isolat aus *E. poonensi*s ATCC 16411 (Hindustan Antibiotics) gegenübergestellt. Die Chromatogramme zeigen, daß AAM II nicht in dem kommerziell erhältlichen Isolat enthalten ist.

3.3.1.1 Sequenzierung im positiven Ionisierungsmodus

Das Massenspektrum von AAM VI im positiven Ionisierungsmodus zeigte neben den Pseudomolekülen $(M+H)^+$ und $(M+Na)^+$ die für Peptaibole charakteristischen Fragmente, welche aus der labilen Aib(Iva)-Hyp(Pro) Bindung resultieren (Abb. 4a [A]).
Zur Sequenzierung wurde, im Gegensatz zur Strukturuntersuchung von TT A-40 im positiven Ionisierungsmodus, das $(M+Na)^+$ gewählt. MS-MS der zur Sequenzierung der TT A-40 gewählten $(M+H)^+$ Pseudomoleküle resultierte in Bildung von b_7 bis b_{12} Fragment-Ionen, eine weitere Fragmentbildung brach an der labilen Aib-Pro Bindung ab (Abb. 3b [B]).
Die bei AAM zur Sequenzierung eingesetzten $(M+Na)^+$ hingegen generierten ein vollständigeres Massenspektrum. Die aus der labilen Aib(Iva)-Hyp(Pro) Bindung resultierenden Fragment-Ionen ($a_9^{\#}$, $a_{12}^{\#}$, $a_{14}^{\#}$) waren zwar ausgeprägt, weitere Ionen konnten jedoch auch detektiert werden. Alle generierten Fragmente zeichneten sich durch die Anlagerung von Na^+ aus.

Kanai et al. (1996) beobachteten ebenfalls, daß durch MS-MS der durch Na^+ -Addukt erzeugten Pseudomoleküle komplette Massenspektren resultieren. Laut Kanai et al. (1996) wird die positive Ladung durch das Na^+-Addukt und nicht durch den tertiären *C*-terminalen Stickstoff erzeugt. Die Masse der Peptidfragmente ist daher nur um 22 Da gegenüber den aus $(M+H)^+$ generierten Ionen erhöht (siehe Kap. 1.3.2).
Diese Beobachtung konnte in [C] nicht bestätigt werden. Die von diesem Mechanismus abweichenden Massen der Fragment-Ionen werden daher im folgenden betrachtet.

Abbildung 3.6 und 3.7 zeigen ZoomScan MS-MS am Beispiel des PC A. Da die Isotopen-Peaks des PC A aufgrund des niedrigen Isolationbereiches (±0,5 Da) ausgeblendet sind, resultieren aus dem monoisotopischen $(M+Na)^+$ Precursor-Ion lediglich die monoisotopischen Tochterionen.

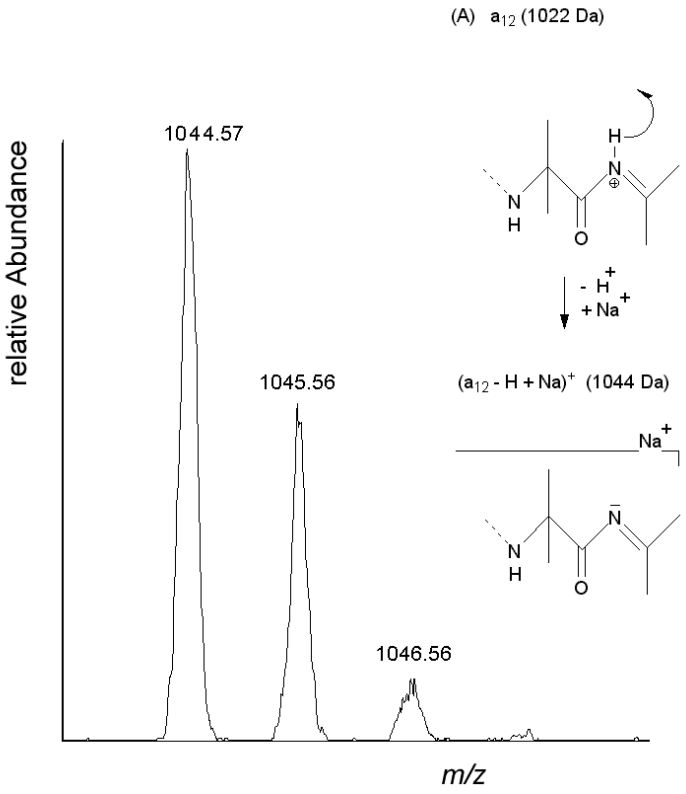


Abbildung 3.6 MS-MS von PC A (M + Na^+ 1932 Da, ±0.5 Da), Direktinjektion (3 µl/min), ZoomScan $(a_{12} - H + Na)^+$ (1044 Da); (A) Mechanismus der Bildung von $(a_{12} - H + Na)^+$ (Kanai et al. 1996).

Nach dem von Kanai et al. (1996) aufgestellten Mechanismus der Generierung von Fragmenten aus $(M+Na)^+$ Precursor-Ionen müßte das $(a_{12} - H + Na)^+$ Fragment eine Masse von 1044.0 Da aufweisen (Abb. 3.6 (A)). Die detektierte Masse ist jedoch um 0,57 Da gegenüber der errechneten Masse erhöht (Abb. 3.6).

Diese Abweichung wurde auch von Wenschuh et al. (1996) beschrieben. Daher ist die in Abb. 3.6 gezeigte Massenverschiebungen nicht durch einen Kalibrierungsfehler erklärbar.

Der postulierte Mechanismus kann weiterhin das Auftreten von Na^+-Addukt Fragmenten der a_n und b_n Serie, welche Hyp/Pro in *C*-terminaler Position aufweisen, nicht erklären. In diesem Fall liegt ein tertiäres Amid vor, welches daher kein H^+ Atom vom Stickstoff abspalten kann (Abb. 3.7 (A)). In Abb. 4b [C] sind jedoch die Na^+-Addukte der a- und b-Serie mit *C*-terminalem Prolin vorhanden ($a_9^{\#}$, $a_{12}^{\#}$, $a_{14}^{\#}$).

Auch im ZoomScan MS-MS von PC A ist das Fragment mit *C*-terminal lokalisiertem Prolin (a_{13}) detektierbar (Abb 3.7).

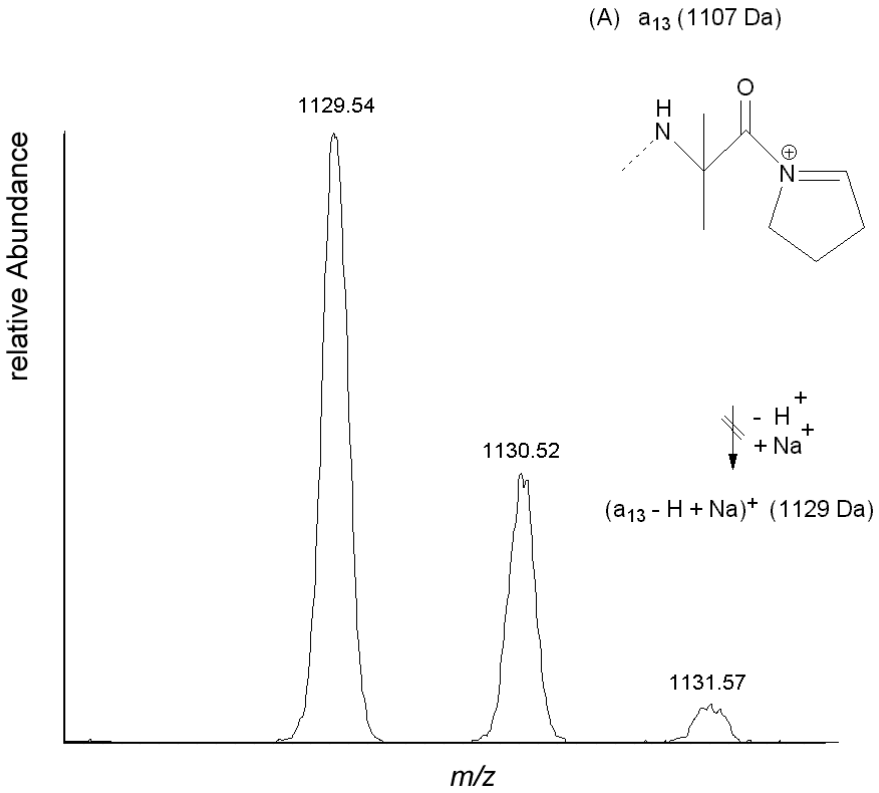


Abbildung 3.7 MS-MS von PC A ($M + Na^+$ 1932 Da, ±0.5 Da, Direktinjektion (3 µl/min), ZoomScan $(a_{12} - H + Na)^+$ (1129 Da); (A) Die Bildung von $(a_{13} - H + Na)^+$ ist auf Grund des *C*-terminalen tertiären Amids nicht möglich.

Der von Kanai et al. (1996) aufgestellte Mechanismus und die resultierende Struktur der Na^+ -Addukt Fragment-Ionen scheint daher nur eingeschränkt gültig.

Ein weiteres Phänomen, generiert durch MS-MS von $(M + Na)^+$, sind die in Abb. 4b [C] beobachteten $(b_{10}^{\#} + 17\ Da)^+$ Fragmente. Diese weisen formal die Masse der Ionen der Na-Addukt c-Serie auf und sind daher mit $c_{10}^{\#}$ (Biemann 1989, 1990) benannt.
Nach Biemann (1989, 1990) müßte in diesem Fall die Ladung des Acylium-Ions durch das protonierte Amin der *C*-terminalen AS erzeugt werden. Würde die Ladung des Fragmentes dann durch das Na^+ Addukt erhöht, müßte das resultierende Fragment laut *m/z* Darstellung auf der Hälfte der detektierten Masse auftreten.
Eine Erklärung der Herkunft der 17 Da könnte der von Tang et al. (1988) vorgeschlagene Mechanismus der Bildung von $(b_n + 17\ Da + Na)^+$ Fragmenten liefern (siehe Kap. 1.3.2).
Die zur Bildung dieser *C*-terminalen Carboxylgruppe notwendige Hydroxylgruppe könnte aus dem Hyp^{13} resultieren.
In diesem Fall müßte ein Fragment $(a_{13} + Na - 17\ Da)^{2+}$ mit *m/z* 643,5 Da oder $(a_{13} + 2\ Na - 17\ Da)^{2+}$ *m/z* 655 Da im Massenspektrum detektierbar sein. Da das $a_{13}^{\#}$ jedoch nur in geringen Intensitäten gebildet wird, tritt das hieraus resultierende interne Fragment nicht im Spektrum auf (Abb. 4b [C]).
Alternativ könnte die diffuse Anlagerung von neutralem NH_3, welcher durch Abspaltung aus dem benachbarten Gln^{11} entsteht, die erhöhte Masse $(b_{13} + NH_3 + Na)^+$ erklären.

3.3.1.2 Sequenzierung im negativen Ionisierungsmodus

Im negativen Ionisierungsmodus wurde neben dem Anion $(M)^-$ das doppelt negativ geladene Ion $(M)^{2-}$ detektiert, was die These der Bildung der Ionen im negativen Ionisierungsmodus durch Elektroneneinfang bestätigt.

MS-MS von $(M)^-$ generierte wie bereits in [B] beschrieben die y_N Serie der Fragment-Ionen. Ein Mechanismus, der die Bildung der y_N Fragmente erklärt, konnte formuliert werden (Abb. 5 [C]). Durch Abspaltung eines Acetyl-Ions aus $(M)^-$ entsteht ein Aziridinolat-Anion. Die Folgefragmente, welche auch Aziridinolat-Struktur besitzen, werden durch Abspaltung eines neutralen Aziridinolons erzeugt. Die negative Ladung der generierte Fragmente ist jeweils am *N*-Terminus der Fragmente lokalisiert (Abb. 5 [B]).

3.4 Schlußbetrachtung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Analoga bereits bekannter Peptaibole sequenziert, neue Produzenten von Peptaibolen erkannt und die Sequenzen der Peptide ermittelt werden. Die Produktion von AAM durch *G. catenulatum* und *S. fimetaria* ist besonders interessant, da diese Schimmelpilze potente Antagonisten von *Rhizoctonia solanii* darstellen und ihr Einsatz in der biologischen Schädlingskontrolle diskutiert wird.
Durch die Kopplung von HPLC und ESI-MS und MS-MS bzw. MS^n im positiven oder negativen Ionisierungsmodus entfällt die semipräparative Reinigung der Peptide vor ihrer Sequenzierung. Grenzen in der Sequenzierung werden in erster Linie durch die zur Trennung eingesetzten stationären Phase vorgegeben. So konnten einige Minorpeptaibole in der vorliegenden Arbeit auf Grund von Koelution und daraus resultierenden überlappenden und nicht eindeutig zuordenbaren Massenfragmenten nicht charakterisiert werden.
Stationäre Phasen, die eine von der zur on-line Sequenzierung eingesetzten ODS-Phase abweichende Trenncharakteristik aufweisen, wie z.B. die beschriebene Fluorkohlenwasserstoff-Phase, könnten es ermöglichen, auch schwer zu trennende Peptide erfolgreich zu sequenzieren.

In der Literatur sind verschiedene, teils widersprechende Bildungsmechanismen und Strukturen von Fragment-Ionen beschrieben. Da diese oftmals unter Verwendung von am C^{α}-Atom unsubstituierten kurzen Peptiden (Di- bis Tetrapeptiden) aufgestellt wurden, ist deren generelle Aussagekraft für Peptaibole eingeschränkt. Die Mechanismen, welche eine Fragmentbildung unter Abspaltung eines C^{α}-H-Atoms postulieren, könnten daher durch Untersuchungen z.B. von $C^{\alpha,\alpha}$-dialkylierten Oligo- und Polypeptiden $(Aib)_n$ geklärt werden. In diesem Fall würde eine Zyklisierung unter Einbezug des C^{α}-Atoms in der Abspaltung von 15 Da resultieren. Untersuchungen von Prolyl-Polypeptiden könnten die vermuteten Reaktionsmechanismen bestätigen und die Struktur der Fragmente eindeutig belegen. Bei Untersuchungen von Prolyl-Polypeptiden kann keine Zyklisierung der Fragmente unter Einbezug der Aminogruppe im Peptidverbund erfolgen, da diese bereits als tertiäres Amid vorliegt.

Die in [C] eingesetzte temperaturtolerante, preiswerte nicht-chirale Phase ermöglichte eine genaue Erstellung der AS-Stöchiometrie in kurzer Zeit. Zur Bestimmung der Chiralität mußte weiterhin die Chirasil-Val Phase eingesetzt werden.
Eine Verbesserung könnte durch die Veresterung der AS mit einem optisch aktiven Alkohol erreicht werden. Die Bestimmung der Chiralität enthaltener AS wäre dann auch auf der nicht-chiralen Phase möglich, da die unter diesen Derivatisierungsbedingungen entstehenden Diastereomere auf dieser stationären Phase getrennt werden.

Durch den Einsatz von GC-SIM-MS wird die Nachweisgrenze der Dipeptide verringert. So könnte unter Verwendung von GC-SIM-MS bei der Dipeptidanalyse zur Bestimmung isobarer AS eine aufwendige semipräparative Reinigung der Peptide durch einmalige manuelle Fraktionierung des HPLC-Eluates einer analytischen stationären Phase ersetzt werden.

4 Zusammenfassung

Die Sequenzierung von Peptaibiotika mittels Elektrosprayionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS) und MS^n (multiple MS) von charakteristischen Massenfragmenten ermöglichte eine Bestimmung der Primärstruktur von Peptaibiotika in kürzester Zeit. Durch die Kopplung des Massenspektrometers mit HPLC entfiel die kosten- und materialintensive semipräparative Reinigung der mikroheterogenen Komponenten.
Der Einsatz einer Fluorkohlenwasserstoff-Phase ergänzte die Verwendung einer normalerweise zur Peptidtrennung eingesetzten Octadecylsilyl-Phase (ODS) vorteilhaft. Die Fluorkohlenwasserstoff-Phase weist eine von ODS-Phasen abweichende Trenncharakteristik auf. Komponenten, die auf stationären Phasen vom ODS-Typ koeluieren, werden bei Verwendung dieser Phase oft getrennt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse von ESI-MS^n im positiven Ionisierungsmodus durch Untersuchungen im negativen Ionisierungsmodus komplettiert und erweitert, sogar vereinfacht, werden. Mögliche Mechanismen der im negativen Ionisierungsmodus gebildeten Fragmente konnten formuliert werden.

Die GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) Analyse von aus den Peptaibolen generierten Trifluoracetyl-Dipeptid-Methylestern ermöglichte die Bestimmung der Positionen von mittels ESI-MS nicht zuordenbaren isobaren Aminosäuren (AS). Die Methode erlaubte weiterhin, auch nicht kommerziell erhältliche Dipeptide durch Generierung aus definierten Peptaibolen zu erhalten und diese aufgrund ihres Massenspektrums zu identifizieren.
Unmittelbar nach der Methanolyse der Peptide lag die *N*-terminale AS als Acetyl-AS-Methylester vor. Diese flüchtige Verbindung konnte so komplementär zu ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus mittels GC-MS bestimmt werden.
Die Chiralität und Stöchiometrie der in den Peptaibolen enthaltenen AS konnte mittels GC-MS Untersuchungen in Form unterschiedlicher Perfluoracyl-AS-Alkylester-Derivate auf chiraler und nicht-chiraler stationärer Phase ermittelt werden.

Durch die angewandten Methoden konnten so 12 bisher nicht bekannte Peptaibole (Trichovirin II 1a – 6b) aus *Trichoderma viride* NRRL 5243 isoliert, dem HPLC Elutionsprofil zugeordnet und sequenziert werden. Bakterizide und hämolytische Aktivitäten des mikroheterogenen Peptidgemisches wurden ermittelt.

Im weiteren wurde das mikroheterogene Peptaibolgemisch Trichotoxin A-40 (TT A-40) mittels HPLC untersucht. Es zeigte sich, daß TT A-40 nur unter Verwendung eines Eluenten mit niedrigem pH-Wert von der verwendeten ODS-Phase eluiert wurde. Durch on-line HPLC-ESI-MS^n wurden drei bereits publizierte Sequenzen bestätigt und dem HPLC-Elutionsprofil zugeordnet. Weiterhin konnten eine weitere Hauptsequenz (TT A-40/5) und zwei weitere Minorkomponenten (TT A-40/1 und 2) sequenziert, dem charakteristischen HPLC-Elutionsprofil zugeordnet und prozentuale Anteile angegeben werden.

Aus Submerskulturen von *Stilbella erythrocephala* ATCC 28144*, Stilbella fimetaria* CBS 548.84 und *Gliocladium catenulatum* CBS 511.66 wurde Antiamoebin (AAM) isoliert. Die Isolate wurden mittels HPLC unter identischen Bestimmungen mit AAM-Isolaten aus *Emericellopsis poonensis* ATCC 16411 (Hindustan Antibiotics), *E. synnematicola* ATCC 16540 (Sigma), *E. salmosynnemata* CBS 382.62 (TÜ 165) und *E. synnematicola* CBS 176.60 verglichen.
Untersuchungen mittels gekoppeltem HPLC-ESI-MS-MS im positiven und negativen Ionisierungsmodus bewiesen, daß AAM I die Hauptkomponente in allen Isolaten darstellt. AAM II konnte nur in dem zur erstmaligen Sequenzierung eingesetzten Isolat aus *E. poonensis* ATCC 16411 (Hindustan Antibiotics) in geringen Mengen (1.9 %) nachgewiesen werden. Der in der Literatur beschriebene Gln^{11}/Glu^{11}-Austausch in AAM III konnte nicht bestätigt werden, die für AAM III beschriebene Sequenz wurde berichtigt. Auch die komplette Sequenzierung der AAM IV und V, von denen Teilsequenzen beschrieben waren, wurde durchgeführt.
Neben diesen 5 Antiamoebinen konnten mittels HPLC-ESI-MS-MS 11 weitere Sequenzanaloga in ihrer Primärstruktur aufgeklärt, dem HPLC Elutionsprofil zugeordnet und ihre relativen Anteile ermittelt werden.

Unter Verwendung der Dipeptidanalyse von semipräparativ fraktionierten Peptiden war es möglich, die Positionen der isobaren AS Val^{1}, Val^{5} und Iva^{12} in den Komponenten AAM XIII und XIV, synthetisiert nur von *S. erythrocephala* ATCC 28144, zuzuordnen.

Es wurde gezeigt, daß die Biosynthese von AAM auch von anderen Schimmelpilzgattungen als den bisher bekannten AAM-Produzenten *Emericellopsis* und *Cephalosporium* durchgeführt wird.

5 Literatur

Ambihapathy K, Yalcin T, Leung HW, Harrison AG (1997) Pathways to immonium ions in the fragmentation of protonated peptides. *J. Mass Spectrom.* **32**: 209-215.

Arai T, Mikami Y, Fukushima K, Utsui T, Yazawa K (1973) A new antibiotic, Leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. *J. Antibiot.* **3**: 157-161.

Argoudelis AD, Dietz A, Johnson LE (1974) Zervamicins I and II, polypeptide antibiotics produced by *Emericellopsis salmosynnemata. J. Antibiot*. **5**: 321-328.

Askew DJ, Laing MD (1994) The in vitro screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as source of aggressive strains. *Plant and Soil* **159**: 277-281.

Atassi MZ, Rosenthal AF (1969) Specific reduction of carboxyl groups in peptides and proteins by diborane. *Biochem. J.* **111**: 593-601.

Auvin-Guette C, Rebuffat S, Prigent Y, Bodo B (1992) Trichogin AIV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 2170-2174.

Aydin M, Bloss DH, König WA, Brückner H, Jung G (1982) Localization of the amide function in the sequence of peptide antibiotic trichotoxin A-40. *Biomed. Mass Spectrom.* **9**: 39-42.

Banks JF, Whitehouse CM (1996) Electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **270**: 486-519.

Becker D, Kieß M, Brückner H (1997) Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Liebigs Ann./Recueil*: 767-772.

Berg A, Ritzau M, Ihn W, Schlegel B, Fleck WF, Heinze S, Gräfe U (1996) Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059. *J. Antibiot*. **49**: 817-820.

Biemann K (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom*. **16**: 99-111.

Biemann K (1989) Some recent applications of mass spectrometry to biochemistry. *Biochem. Soc. Trans.* **17**: 237-243.

Biemann K (1990) Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-collision-induced dissociation. *Methods Enzymol*. **193**: 455-479.

Bosch R, Brückner H, Jung G, Winter W (1982) (-)-Isovaline: confirmation of its D-(=*R*)- configuration by x-ray analysis of its *N*-chloroacetyl derivate. *Tetrahedron* **38**: 3579-3583.

Bradford AM, Waugh RJ Bowie JH (1995) Characterization of underivatized tetrapeptides by negative-ion fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**: 677-685.

Brückner H, Nicholson GJ, Jung G (1980) Gas chromatographic determination of the configuration of isovaline in antiamoebin, samarosporin (emerimicin IV), stilbellin, suzukacillins and trichotoxins. *Chromatographia* **13**: 209-214.

Brückner H, Graf H (1983) Paracelsin, a peptide antibiotic containing α-aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons. Part A. *Experientia* **39**: 528-530.

Brückner H, Jung G, Przybylski M (1983). Chromatographic and mass spectrometric characterization of the structure of the polypeptide antibiotics samarosporin and stilbellin and identity with emerimicin. *Chromatographia* **17**: 679-685.

Brückner H, Przybylski M (1984a) Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance chromatography with high field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **296**: 263-275.

Brückner H, Przybylski M (1984b) Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of “peptaibols” and other Aib-containing peptides of fungal origin. I. Gliodeliquescin A from *Gliocladium deliquescens. Chromatographia* **19**: 188-198.

Brückner H, Graf H, Bokel M. (1984) Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulytically active mold *Trichoderma reesei*. *Experientia* **40**: 1189-1197.

Brückner H, König WA, Aydin M, Jung G (1985) Trichotoxin A-40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments. *Biochim. Biophys. Acta* **827**: 51-62.

Brückner H, Reinecke C (1988) GC-MS detection of Aib-containing polypeptide mycotoxins (antibiotics) in *Penicillium roqueforti* and other filamentous fungi. *J. High. Resol. Chrom.* **11**:735-738.

Brückner H, Nuber K, Reinecke C (1989a) Chromatographic detection of bioactive Aib-peptides in moulds of the genus *Stilbella*. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **333**: 777-778.

Brückner H, Wunsch P, Kussin C (1989b) Production of polypeptide antibiotics by molds of the genus *Gliocladium.* In: Aubry A, Marraud M, Vitoux B (Eds.) *Second Forum on Peptides.* Colloque INSERM, Vol. 174, John Libbey Eurotex, London, UK: 103-106.

Brückner H, Reinecke C (1989) Chromatographic assay for the rapid and sensitive detection of peptaibol mycotoxins (antibiotics) in filamentous fungi. *J. High Resol. Chrom*. **12**: 113-116.

Brückner H, Kripp T, Kieß M. (1991) Sequencing of new Aib-peptides by tandem mass spectrometry and automated Edman degradation. In: Giralt E, Andreu D (Eds.) *Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium.* ESCOM, Leiden, Niederlande: 347-349.

Brückner H, Kripp T, Kieß M. (1993) Polypeptide antibiotics trichovirin and trichobrachin: Sequence determination and total synthesis. In: Brandenburg D, Ivanov V, Voelter W (Eds.) *Chemistry of Peptides and Proteins.* Part A, DWI Reports TH Aachen, Verlag Mainz, Aachen, **5/6**: 357-373.

Bullogh DA, Jackson CG, Henderson PJF, Cottee FH, Beechey RB, Linnett PE (1982a) The isolation and purification of the elvapeptins. A family of peptide inhibitors of mitochondrial ATPase activity. *Fed. Europ. Biochem. Soc.* **145**: 258-262.

Bullogh DA, Jackson CG, Henderson PJF, Cottee FH, Beechey RB, Linnett PE (1982b) The amino acid sequence of efrapeptin D*. Biochem. Mol. Biol. Int.* **4**: 543-549.

Chikanishi T, Hasumi K, Harada T, Kawasaki N, Endo A (1997) Clonostachin, a novel peptaibol that inhibits platelet aggregation. *J. Antibiot.* **50**: 105-110.

Cordero MM, Wesdemiotis C (1994) Tandem mass spectrometry of peptides: Mechanistic aspects and structural information based on neutral losses. II tri- and larger peptides. *Org. Mass Spectrom.* **29**: 382-390.

Csermely P, Radics L, Rossi C, Szamel M, Ricci M, Mihàly K, Somogyi J (1994) The nonapeptide leucinostatin A acts as a weak ionophore and as an immunosuppressant on T lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1221**: 125-132.

Danielson ND, Beaver LG, Wangsa J (1991) Fluoropolymers and fluorocarbon bonded phases as column packings for liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **544**: 187-199.

Das MK, Raghothama S, Balaram P (1986) Membrane channel forming polypeptides. Molecular conformation and mitochondrial uncoupling activity of antiamoebin, an α-aminoisobutyric acid containing peptide. *Biochemistry* **25**: 7110-7117.

Das MK, Krishna K, Balaram P (1988) Membrane modifying activity of four peptide components of antiamoebin, a microheterogeneous fungal antibiotic. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **25**: 560-565.

Deterding LJ, Parker CE, Perkins J, Moseley MA, Tomer KB (1991) Capillary liquid chromatography-mass spectrometry and capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for the determination of peptides and proteins. *J. Chromatogr.* **554**: 329-338.

Duclohier H, Snook CF, Wallace BA (1998) Antiamoebin can function as a carrier or as a pore-forming peptaibol. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**: 255-260.

Eckart K (1986) Generation and interpretation of fast atom bombardment mass spectra of modified peptides. In: Wittmann–Liebold B (Ed.) *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis*. Springer Verlag: 403-414.

Eckart K, Holthausen MC, Koch W, Spieß J (1998) Mass spectrometric and quantum mechanical analysis of gas-phase formation, structure, and decomposition of various b(2) ions and their specifically deuterated analogs. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**: 1002-1011.

El Hajji M, Rebuffat S, Doan TL, Klein G, Satre M, Bodo B (1989) Interaction of trichorzianines, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum. Int. J. Pept. Prot. Res.* **29**: 207-215.

Engelke F, Hahn JH, Henke W, Zare RN (1987) Determination of Phenylthiohydantoin-amino acids by two-step laser desorption/multiphoton ionization. *Anal. Chem.* **59**: 909-912.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71.

Fuji K, Fujita E, Takaishi Y, Fujita T, Arai I Komatsu M, Hiratsuka N (1978) New antibiotics, trichopolyns A and B: Isolation and biological activity. *Experientia* **34**: 237-239.

Fujita T, Takaishi Y, Okamura A, Fujita E, Fuji K, Hiratsuka N, Komatsu M, Arita J (1981) New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 585-587.

Fujita T, Takaishi Y, Moritoki H, Ogawa T, Tokimoto K (1984) Fungal metabolites. I. Isolation and biological activities of hypelcins A and B (growth inhibitors against *Lentinus edodes*) from *Hypocrea peltata*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 1822-1828.

Fujita T, Iida A, Uesato S, Takaishi Y, Shingu T, Saito M, Morita M (1988a) Structural elucidation of trichosporin-B-Ia, IIIa, IIId and V from *Trichoderma polysporum*. *J. Antibiot.* **41**: 814-818.

Fujita T, Okuda M, Iida A, Uesato S, Takaishi Y, Shingu T (1988b) Isolation and structural elucidation of trichosporin-B-IIIb, c, d and Va, b from *Trichoderma polysporum*. *Tennen Yuki Kagobustu Toronkai Koen Yoshishu* **30**: 33-40.

Fujita T, Wada S, Iida A, Nishimura T, Kanai M, Toyama N (1994) Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and –II, from *Trichoderma viride. Chem. Pharm. Bull.* **42**: 489-494.

Fukushima K, Arai T, Mori Y, Tsubai M, Suzuki M (1983a) Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. I. Separation, physico-chemical properties and biological activities of leucinostatins A and B. *J. Antibiot.* **36**: 1606-1612.

Fukushima K, Arai T, Mori Y, Tsubai M, Suzuki M (1983b) Studies on peptide antibiotics, leucinostatins II. The structure of leucinostatins A and B. *J. Antibiot.* **36**: 1613-1630.

Gaskell SJ (1997) Electrospray: principles and practice. *J. Mass Spectrom.* **32**: 677-688.

Goulard C, Hlimi S, Rebuffat S, Bodo B (1995) Trichorzin HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot*. **48**: 1248-1253.

Gräfe U, Ihm W, Ritzau M, Schade W, Stengek C, Schlegel B, Fleck WF, Künkel W, Härtl A, Gutsche W (1995) Helioferins; novel antifungal lipopeptides from *Mycogone rosea*: screening, isolation, structures and biological properties. *J. Antibiot.* **48**: 126-133.

Grigoriev PA, Schlegel R, Dornberger K, Gräfe U (1995) Formation of membrane channels by chrysospermins, new peptaibol antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **1237**: 1-5.

Grigoriev PA, Berg A, Schlegel R, Gräfe U (1997) Differences in ion permeability of artificial bilayer membrane caused by ampullosporin and bergofungin, new 15-membered peptaibol-type antibiotics. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **44**: 155-158.

Gibson BW, Cohen O (1990) Liquid secondary ion mass spectrometry of phosphorylated and sulfated peptides and proteins. *Methods Enzymol.* **193**: 480-501.

Griffiths WJ, Lindh I, Bergman T, Sjövall J (1995) Negative-ion electrospray mass spectra of peptides derivatized with 4-Aminonaphthalenesulphonic acid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**: 667-676.

Gupta S, Krasnoff SB, Roberts DW, Renwick JAA, Brinen LS, Clardy J (1991) Structures of the efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolypocladium niveum*. *J. Am. Chem. Soc*. **113**: 707-709.

Heerma W, Boon JP, Versluis C, Kruijtzer JAW, Hofmeyer LJF, Liskamp RMJ (1997) Comparing mass spectrometric characteristics of peptides and peptoids II. *J. Mass Spectrom.* **32**: 697-704.

Heath TG, Giordani AB (1993) Reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography with on-line UV, fluorescence and electrospray ionization mass spectrometric detection in the analysis of peptides and proteins. *J. Chromatogr.* **638**: 9-19.

Hino T, Takeshi K, Kanda M, Kumazawa S (1993) Effect of aibellin, a novel peptide antibiotic, on rumen fermentation *in vitro. J. Dairy Sci.* **76**: 2213-2221.

Hopfgartner G, Wachs T, Bean K, Henion J (1993) High-flow ion spray liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **65**: 439-446.

Hou CT, Ciegler A, Hesseltine CW (1972) New mycotoxin, trichotoxin A, *from Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. *Appl. Microbiol.* **23**: 183-185.

Huang Q, Tezuka Y, Hatanaka Y, Kikuchi T, Nishi A, Tubaki K (1995) Studies on metabolites of mycoparasitic fungi IV. Minor peptaibols of *Trichoderma koningii. Chem. Pharm. Bull.* **43**: 1663-1667.

Hunt DF, Yates JR, Shabanowitz J, Winston S, Hauer CR (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6223-6227.

Hunt DF, Zhu NZ, Shabanowitz J (1989) Oligopeptide sequence analysis by collision-activated dissociation of multiply charged ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**: 122-124.

Hülsmann H, Heinze S, Ritzau M, Schlegel B, Gräfe U (1998) Isolation and structure of peptaibolin, a new peptaibol from *Sepedonium* strains. *J. Antibiot.* **51**: 1055-1058.

Iida J, Iida A, Takahashi Y, Takaishi Y, Nagaoka Y, Fujita J (1993) Fungal metabolites V. Rapid structure elucidation of antibiotic peptides, minor components of trichosporin Bs from *Trichoderma polysporum*. Applications of linked-scan and continuos fast-atom-bombardment mass spectrometry. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 357-365.

Iida A, Sanekata M, Fujita T, Tanaka H, Enoki A, Fuse G, Kanai M, Rudewicz PJ, Tachikawa E (1994) Fungal metabolites XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I-VII, from the fungus *Trichoderma harzianum. Chem. Pharm. Bull.* **42**: 1070-1075.

Iida A, Sanekata M, Wada S, Fujita t, Tanaka H, Enoki A, Fise G, Kanai M, Asami K (1995) Fungal metabolites XVIII. New membrane-modifying peptides, trichorozins I-IV, from the fungus *Trichoderma harzianum. Chem. Pharm. Bull.* **43**: 392-397.

Ikonomou MG, Blades AT, Kerbale P (1990) Investigation of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry *Anal. Chem.* **62**: 957-967.

Ikonomou MG, Blades AT, Kerbale P (1991) Electrospray-ion spray: A comparison of mechanisms and performance. *Anal. Chem.* **63**: 1989-1988.

Inbar J, Menendez A, Chet I (1996) Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 757-763.

Irmscher G, Jung G (1977) Die hämolytischen Eigenschaften der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin. *Eur. J. Biochem.* **80**: 165-174.

Irmscher G, Bovermann G, Boheim G, Jung G (1978) Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part A. Isolation, characterization and conformation. *Biochim. Biophys. Acta* **507**: 470-484.

Jackson CG, Linnett PE, Beechey RB, Henderson PJF (1979) Purification and preliminary structural analysis of the efrapeptins, a group of antibiotics that inhibit the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem Soc. Trans*. **7**: 224-226.

Jaworski A, Brückner H, Maisch A (1998) Elutionsumkehr mikroheterogener Peptidantibiotika an einer Fluorkohlenwasserstoff-Phase. *GIT Spezial Chromatographie* **18**: 86-89.

Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT (1987) Novel fragmentation process of peptides by collision-induced-decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem*. **59**: 2621-2625.

Kamel AM, Brown PR, Munson B (1999) Electrospray ionization mass spectrometry of Tetracycline, Oxytetracycline, Chlorotetracycline, Minocycline, and Methacycline. *Anal. Chem.* **71**: 968-977.

Kanai M, Iida A, Nagaoka Y, Wada S, Fujita T (1996) Fungal metabolites XXI. Characteristics of low energy collision induced dissociation of $[M + 2H]^{2+}$, $[M + H + Na]^{2+}$ and $[M + 2Na]^{2+}$ of peptaibols using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*. **31**: 177-183.

Kelly MA, Vestling MM, Fenselau CC (1992) Electrospray analysis of proteins: a comparison of positive-ion and negative-ion mass spectra at high and low pH. *Org. Mass Spectrom.* **27**: 1143-1147.

Kenny PT, Nomoto K, Orlando R (1992) Fragmentation studies of peptides: the formation of y ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**: 95-97.

Kieß M, Brückner H (1989) Scaled-up fermentation of the polypeptide antibiotic antiamoebin. In: Behrens D, Driesel AJ (Eds.) *DECHEMA Biotechnology Conferences*, VCH, Weinheim; **3B**:579-582.

Kieß M, Brückner H (1990) Trichovirin: Fermentation, isolation and sequence determination of a polypeptide antibiotic. In: Behrens D, Krämer P (Eds.) *DECHEMA Biotechnology Conferences*, VCH, Weinheim; **4B**: 1155-1158.

Kleinkauf H (1980) Die Biosynthese von Antibiotika-Peptiden. *Chemie in unserer Zeit* **4**: 105-114.

Kleinkauf H, von Döhren H (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* **192**: 1-15.

Kohls RE, Bradley RE (1970) Antiparasitic evaluation of a new antibiotic. *J. Parasitol.* **56**: 615-616.

Köhl J, Bèlanger RR, Fokkema NJ (1997) Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: A comparative microscopic and ultrastructural study. *Phytopathol.* **6**: 634-642.

Krasnoff SB, Gupta S (1991) Identification and directed biosynthesis of efrapeptins in the fungus *Tolypocladium geodes* GAMS (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Chem. Ecol.* **17**: 1953-1962.

Krishna K, Sukumar M, Balaram P (1990) Structural chemistry and membrane modifying activity of the fungal polypeptides zervamicins, antiamoebins and efrapeptins. *Pure Appl. Chem.* **62**: 1417-1420.

Kumuzawa S, Kanda M, Aoyama H, Utagawa M, Kondo J, Sakamoto S, Ohtani H, Mikawa T, Chiga I, Hayasa T (1994) Structural elucidation of aibellin, a new peptide antibiotic with efficiency enhancing activity on rumen fermentation. *J. Antibiot.* **47**: 1136-1144.

Lange C, Prigent Y, Henning P, Rebuffat S, Auvin-Guette C, El Hajji M, Bodo B (1989) Sequence of trichorzianines A VII using FAB desorption and tandem mass spectrometry. *Spectros. Int. J.* **7**: 145-168.

Leclerc G, Rebuffat S, Goulard C, Bodo B (1998) Direct biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* **51**: 170-177.

Lee SJ, Yeo WH, Yun BS, Yoo ID (1999) Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp. *J. Peptide Sci.* **5**: 374-278.

Lewis JA, Papavizas GC (1993) *Stilbella aciculosa*: a potential biocontrol fungus against *Rhizoctonia solani. Biocontrol Sci. Technol.* **3**: 3-11.

Lim H, Schultz DG, Chongwoo Y, Hanley L (1999) Relative dissociation energies of protonated peptides by electrospray ionization/surface-induced dissociation. *Anal. Chem.* **71**: 2307-2317.

Lindh I, Griffiths WJ, Bergman T, Sjövall J (1994) Charge-remote fragmentation of peptides derivatized with 4-aminonaphthalenesulphonic acid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**: 797-803.

Loo JA, Ogorzalek Loo RR, Light KJ, Edmonds CG, Smith RD (1992) Multiply charged negative ions by electrospray ionization of polypeptides and proteins. *Anal. Chem.* **64**: 81-88.

Lucaciu M, Rebuffat S, Goulard C, Duclohier H, Mole G, Bodo B (1997) Interaction of the 14-residue peptaibols, harcianins HC, with lipid bilayers: permeability modifications and conductance properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1323**: 85-96.

Mann M, Meng CK, Fenn JB (1989) Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal. Chem.* **61**: 1702-1708.

Marina A, Garcia MA, Albar JP, Yagüe J, Lopez de Castro JA, Vazquez J (1999) High-sensitive analysis and sequencing of peptides and proteins by quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*. **34**: 17-27.

Matha V, Weiser J, Olejnìcek J (1988) The effect of Tolypin in *Tolypocladium niveum* crude extract against mosquito and blackfly larvae in the laboratory. *Folia Parasitol.* **35**: 379-381.

Matha V, Jegorov A, Kieß M, Brückner H (1992) Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, α-aminoisobutyric acid rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue / Cell* **24**: 559-564.

Matsubara A, Asaini K, Akagi A, Nishino N (1996) Ion-channels of cyclic template-assembled alamethicins that emulate the pore structure predicted by barrel-stave model. *Chem. Commun.* **1996**: 2069-2070.

Meyer CE, Reusser F (1967) A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* **23**: 85-86.

Mohr H, Kleinkauf H (1978) Alamethicin biosynthesis. Acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochim. Biophys. Acta* **526**: 375-386.

Mollè D, Morgan F, Bouhallab S, Leonil J (1998) Selective detection of lactolated peptides in hydrolysates by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **259**: 152-161.

Monde T, Kamiusuki T, Kuroda T, Mikumo K, Ohkawa T, Fukube H (1996) High-performance liquid chromatographic separation of pheols on a fluorocarbon-bonded silica gel column. *J. Chromatogr. A* **722**: 273-280.

Moseley MA, Deterding LJ, Tomer KB, Jorgenson JW (1989a) Coupling of capillary zone electrophoresis and capillary liquid chromatography with coaxial continuos-flow fast atom bombardment tandem sector mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **480**: 197-209.

Moseley MA, Deterding LJ, de Wit JSM, Tomer KB, Kennedy RT, Bragg N, Jorgenson JW (1989b) Optimization of a coaxial continuous flow fast atom bombardment interface between capillary liquid chromatography and magnetic sector mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Anal. Chem.* **61**: 1577-1584.

Nau H (1976) Sequenzanalyse von Polypeptiden und Proteinen in der kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie. *Angew. Chem.* **88**: 74-86.

Nagaoka Y, Iida A, Kambara T, Tachikawa E, Asami K, Fujita T (1995) Effect of lipophilicity of trichosporin-Bs on ion-channel formation and catecholamine-releasing activity. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 640-642.

Neubauer G, Anderegg RJ (1994) Identifying charge states of peptides in liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **66**: 1056-1061.

Neubauer G, Mann M (1997) Parent ion scans of large molecules *J. Mass Spectrom.* **32**: 94-98.

Nguyen DN, Becker GW, Riggin RM (1995) Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology*. J. Chromatogr. A* **705**: 21-45.

Niessen WMA, Tinke AP (1995) Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J. Chromatogr. A* **703**: 37-57.

Okuda M, Iida A, Uesato S, Nagaoka Y, Fujita T Takaishi Y, Terada H (1994) fungal metabolites. X. The effect of peptide antibiotics, trichosporin-Bs, on the respiratory activity of mitochondria. *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 482-485.

Ooka T, Takeda I (1974) The relationship between α-amino isobutyrate and L-valine for the suzukacillin formation. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 19-27.

Pandey RC, Cook JC, Rinehart KL (1977a) High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 8469-8483.

Pandey RC, Meng H, Cook JC, Rinehart KL (1977b) Structure of Antiamoebin I from high resolution field desorption and gas chromatographic mass spectrometry studies. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 5203-5205.

Pandey RC, Cook JC, Rinehart KL (1978) Structure of the peptide antibiotic antiamoebin II. *J. Antibiot.* **31**: 241-243.

Papavizas GC (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* **23**: 23-54.

Payne JW, Jakes R, Hartley BS (1970) The primary structure of alamethicin. *Biochem J.* **117**: 757-766.

Poulter L, Green BN, Kaur S, Burlingame AL (1990) The characterization of native and recombinant proteins by electrospray mass spectrometry. In: Burlingame AL, McCloskey JA (Eds.) *Biological mass spectrometry*. Elsevier, Amsterdam, Niederlande: 119-127.

Przybylski M, Dietrich I, Manz I, Brückner H (1984) Elucidation of structure and microheterogeneity of the polypeptide antibiotics Paracelsin and Trichotoxin A-50 by fast atom bombardment mass spectrometry in combination with selective *in situ* hydrolysis. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**: 569-582.

Ramsay SL, Steinborner ST, Waugh RJ, Dua S, Bowie JH (1995) A simple method for differentiating Leu and Ile in peptides. The negative-ion mass spectra of $(M-H)^-$ ions of phenylthiohydantoin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**: 1241-1243.

Rebuffat S, El Hajji M, Henning P, Davoust D, Bodo B (1989) Isolation, sequence, and confirmation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Peptide Protein Res.* **34**: 200-210.

Rebuffat S, Conraux L, Massias M, Auvin-Guette C, Bodo B (1993) Sequence and solution confirmation of the 20-residue peptaibols saturnisporin SA II and SA IV. *Int. J. Peptide Protein Res.* **41**: 74-84.

Rebuffat S, Goulard C, Bodo B (1995) Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harcianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 1849-1855.

Rebuffat S, Hlimi S, Prigent Y, Goulard C, Bodo B (1996) Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic harzianin HK VI. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 2021-2027.

Reid GE, Simpson RJ, Hair RAJ (1999) Probing the fragmentation reactions of protonated glycine oligomers via multistage mass spectrometry and gas phase ion molecule hydrogen/deuterium exchange. *Int. J. Mass Spectrom.* **190/191**: 209-230.

Rinehart KL (1983) Fast atom bombardment mass spectrometry; a promising tool for structural studies. *Trends Anal. Chem.* **2**: 10-14.

Rindfleisch H, Kleinkauf H (1976) Biosynthesis of alamethicin. *FEBS Letters* **62**: 276-280.

Ritzau M, Heinze S, Dornberger KJ, Berg A, Fleck W, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U (1997) Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice. *J. Antibiot*. **50**: 722-728.

Roepstorff P, Fohlman J (1984) Proposal for a common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom*. **11**: 601.

Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Ariasn-Atac I, Scala F, Harman GE, Kubicek CP (1994) Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytophatogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4364-4370.

Singh N, Webster J (1973) Antagonism between *Stilbella erythrocephala* and other coprophilous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **61**: 487-495.

Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga CJ, Udseth HR (1990) New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.* **60**: 882-899.

Stroh JG, Cook JC, Milberg RM, Brayton L, Kihara T, Huang Z, Rinehart KL, Lewis IAS (1985) On-line liquid chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem.* **57**: 985-991.

Stroh JG, Rinehart KL, Cook JC, Kihara T, Suzuki M, Arai T (1986) Identification and structure assignment of compounds of leucinostatin and CC-1014 by directly coupled liquid chromatography / fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc*. **10**: 858-859.

Steinhagen E (1961) Massenspektrometrie als Hilfsmittel bei der Strukturbestimmung organischer Verbindungen, besonders bei Lipiden und Peptiden. *Z. Anal. Chem*. **181**: 462-480.

Tachikawa E, Nogimori K, Takahashi S, Mizuma K, Itoh K, Kashimoto T, Nagaoka Y, Iida A, Fujita T (1996) Pathway for Ca^{2+} influx into cells by trichosporin-B-Via, an α-aminoisobutyric acid-containing peptide, from the fungus *Trichoderma polysporum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1282**: 140-148.

Tang X, Ens W, Standing KG, Westmore JB (1988) Daughter ion mass spectra from cationized molecules of small oligopeptides in a reflecting time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* **60**: 1791-1799.

Taylor LCE, Hazelby D, Wakefield CJ (1983) The application of FAB spectra to structure elucidation. *J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **46**: 407-410.

Temesi D, Law B (1999) The effect of LC eluent composition on MS responses using electrospray ionization. *LC-GC International* **3**: 175-178.

Thirumalachar MJ (1968) Antiamoebin, a new antiprotozoal-anthelmintic-antibiotic. Part I: production and biological studies. *Hind. Ant. Bull.* **10**: 287-289.

Tsantrizos YS, Pischos S, Sauriol F (1996) Structural assignment of the peptide antibiotic LP 237-F8, a metabolite of *Tolypocladium geodes. J. Org. Chem*. **61**: 2118-2121.

Van Berkel GJ, Glish GL, McLuckey SA (1990) Electrospray ionization combined with ion trap spectrometry. *Anal. Chem.* **62**: 1284-1295.

Van Dongen WD, Heerma J, Haverkamp J, de Kloster CG (1996) Statistical analysis of mass spectral data obtained from singly protonated peptides under high-energy collision-induced dissociation conditions. *J. Mass Spectrom.* **31**: 1156-1162.

Von Arx E, Faupel M, Brugger M (1976) Das 4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan Reagenz (TDM). Eine Modifikation der Chloro-*o*-Tolidin Farbreaktion für die Dünnschichtchromatographie. *J. Chromatogr.* **120**: 224-228.

Weiser J, Matha V (1988) Tolypin, a new insecticidal metabolite of fungi of the genus *Tolypocladium inflatum* Gams (Deuteromycetes). *J. Invertebrate Pathol.* **51**: 94-96.

Wenschuh H, Suckau D, Rapp U, Bienert M, Krause E (1996) Mass spectrometric sequencing of synthetic peptides containing α,α-dialkylated amino acid residues by MALDI post source decay analysis. *Pept. Res.* **9**: 122-126.

Williams DH, Bradley CV, Santikarn S, Bojesen G (1982) Fast-atom-bombardment mass spectrometry. A new technique for the determination of molecular weights and amino acid sequences of peptides. *Biochem. J.* **201**: 105-117.

Yalcin T, Csizmadia IG, Peterson MR, Harrison AG (1996) The structure and fragmentation of B_n (n>=3) ions in peptide spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**: 233-242.

Zumwalt RW, Kuo KCT, Gehrke CW (1987) Amino acid analysis by gas chromatography, Vol. I-III. CRC Press, Boca Raton, FL, USA

6 Anhang

[A] Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243. _____ 73

[B] Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. _____ 84

[C] New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. _____ 95

Journal of Peptide Science
J. Peptide Sci. **5**: 341–351 (1999)

Structures of Trichovirins II, Peptaibol Antibiotics from the Mold *Trichoderma viride* NRRL 5243

ANDREAS JAWORSKI, JOCHEN KIRSCHBAUM and HANS BRÜCKNER*

Department of Food Sciences, Institute of Nutritional Science, Justus-Liebig University of Giessen, Giessen, Germany

Received 16 December 1998
Revised 13 March 1999
Accepted 14 March 1999

Abstract: From the culture broth of the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243 a mixture of polypeptides, named trichovirins (TV), could be isolated and purified by chromatography on XAD-2 adsorber resin and Sephadex LH-20 gel. Chromatography on silica gel using chloroform/methanol 8:2 as eluent provided a mixture of peptides named TV I. Subsequent elution with chloroform/methanol 1:1 yielded a second group of peptides named TV II. That group could be separated into individual components by repetitive HPLC on an octadecylsilyl and a fluorocarbon stationary phase. The sequences of 12 peptides of TV II could be determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry of isolated peptides and gas chromatography-mass spectrometry of methanolysates. The *N*-termini of the 18-mer peptides are acetylated and the *C*-termini consist of leucinol. Owing to the presence of α-aminoisobutyric acid (Aib) residues and the bactericidal and hemolytic activity, the peptides belong to the family of peptaibol antibiotics. Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: α-aminoisobutyric acid; electrospray ionization mass spectrometry; gas chromatography-mass spectrometry; isovaline; peptide antibiotics; sequence analysis; trichotoxin

INTRODUCTION

In 1972 the isolation and preliminary characterization of two peptide mycotoxins, named trichotoxin A and trichotoxin B, from *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. strains NRRL 5242 and NRRL 5243, respectively, was reported [1]. It was already realized that these peptides, among proteinogenic AA, also contained non-protein Aib. Trichotoxin B from *T. viride* strain NRRL 5243 was originally reported to be similar in chemical properties to trichotoxin A, however, the yield of material that could be isolated was insufficient to determine its characteristics [1].

Trichotoxin A later turned out to consist of two microheterogeneous groups of 18-mer peptides named trichotoxin A-40 and trichotoxin A-50 according to their R_f-values on TLC [2]. These two groups are distinguished mainly by an exchange of Glu and Gln [2–4] resulting in acidic (A-40) and neutral (A-50) peptides. Since the *N*-acetylated

Abbreviations: AA, amino acid(s); AAA, amino acid analysis; Ac, acetyl; Ac_2O, acetic anhydride; Aib (U), α-aminoisobutyric acid; CID, collision induced dissociation; DCM, dichloromethane; DSM, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany; EDC, 1-(3-dimethyl-aminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride; EI, electron impact; ESI, electrospray ionization; GC, gas chromatography; Gln (Q); HOBt, N-hydroxybenzotriazole; HPLC, reversed phase high-performance liquid chromatography; Iva, isovaline; Leu (L); Leuol, leucinol; MeCN, acetonitrile; MeOH, methanol; MPLC, medium pressure liquid chromatography; MS, mass spectrometry; MS-MS, tandem mass spectrometry; OMe, methyl ester; PFPAA, pentafluoropropionic acid anhydride; Pro (P); 2-PrOH, 2-propanol; SIM, selected ion monitoring; TCM, trichloromethane; TDM (reagent), chlorine/4,4'-bis(dimethylamino)diphenylmethane; TFAA, trifluoroacetic acid anhydride; TLC, thin-layer chromatography; Valol, valinol; Vxx, Val or Iva; Z, benzyloxycarbonyl.

* Correspondence to: Department of Food Sciences, Institute of Nutritional Science, Justus-Liebig University of Giessen, Südanlage 6, 35390 Giessen, Germany.
E-mail: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.
CCC 1075-2617/99/080341-11$17.50

peptides contain several Aib-residues, a *C*-terminal bonded L-Valol and exhibit antibiotic properties, they belong to the family of peptaibol antibiotics [5].

Besides their antimicrobial activities, peptaibols attracted much attention owing to their capability of forming voltage-gated ion-channels in lipid membranes [6–8]. This is attributed to the formation of helical structures of amphipathic natural peptaibols [9], or Aib-rich synthetic segments [10], as a result of the restricted conformational freedom of Aib-residues.

Further, it was postulated that the parallel formation of peptaibols and hydrolytic enzymes by species of *Trichoderma* might play an important role in its antagonistic actions against fungal pathogens [11].

Since production of Aib-peptides is very common in *Trichoderma* species as well as many other genera of filamentous fungi [12,13], screening of microorganisms for these peptides and the search for new structures and bioactivities is of continuous interest. Sequence determination has already led to structures on which the classical names peptaibols or peptaibophols cannot be applied. Thus, for peptides containing Aib and exerting interesting bioactivities the comprehensive name 'peptaibiotics' has been suggested [13–15] also comprising specifically defined groups such as lipopeptaibols [16] and aminolipopeptides [17].

From the mycelium of a culture of *T. viride* NRRL 5243 grown statically in Fernbach flasks in a complex medium, we could isolate sufficient peptidic raw material for further purification by liquid chromatography. The structures of seven major 14-mer peptides of the microheterogeneous mixture, comprising at least 21 peptides, could be determined [14,18,19]. The originally proposed name trichotoxin B [1] was changed by us to trichovirins I since the sequences of these 14-mer peptides were different from those of the 18-mer trichotoxins A-40 and A-50 [3,4] isolated from *T. viride* strain NRRL 5242.

In order to increase the yield of trichovirins (TV) we carried out large scale submerged fermentation of *T. viride* NRRL 5243. It was realized that under these conditions a second group of microheterogeneous peptides was produced which we named TV II.

Here we report on the isolation and sequence determination of the 18-mer peptides of TV II and on its antibiotic and hemolytic properties.

EXPERIMENTAL

Material and Methods

Solvents were of gradient grade and from Merck (Darmstadt, Germany). The synthetic dipeptides serving as standards, i.e. Val-Leu, Gly-Val, Glu-Val, Pro-Leu were from Sigma (Deisenhofen, Germany) and Leu-Val was from Bachem (Heidelberg, Germany). Reference amounts of Gly-DL-Iva-OMe and Leu-DL-Iva-OMe were synthesized in our laboratory using the mixed anhydride method (isobutyl chloroformate) from Z-Gly-OH or Z-Leu-OH (from Bachem) and DL-Iva-OMe, followed by hydrogenolytic cleavage of the Z-protecting group. The protected dipeptides were characterized by GC-MS. DL-Iva was synthesized in our laboratory by the Strecker procedure according to the literature [20], and DL-Iva-OMe was synthesized by heating of DL-Iva in 4 M HCl in MeOH. The reference dipeptides Aib-Val-OMe and Val-Aib-OMe were generated by acidic methanolysis [21] of paracelsin A [4] and Glu-D-Iva-OMe by methanolysis of antiamoebin [5]. For AAA, an AA standard solution (no. AA-S-18) (Sigma) was used and appropriate amounts of Aib (Sigma), DL-Iva and L-Leuol (Sigma) were added. For TLC pre-coated plates with silica gel 60 F 254, thickness 0.25 mm (Merck), were used. Peptaibols were detected by spraying with water and, after drying, with TDM reagent; eluent, TCM-MeOH-AcOH-H_2O (65:25:4:3); ratios of solvent mixtures are by volume throughout the text. For column chromatography Servachrom XAD-2 polystyrene adsorber resin, particle size 100–200 μm (Serva, Heidelberg, Germany), Sephadex LH-20, particle size 25–100 μm (Pharmacia, Freiburg, Germany), and silica gel 60, particle size 63–200 μm (Merck), were used.

For malt medium, 30 g of malt extract (Serva) and 3 g of soy pepton (Serva) were dissolved in 1 l demineralized water (final pH 6–6.5). For preparing malt agar medium, 15 g of agar (Fluka, Buchs, Switzerland) was added to the malt medium. For potato dextrose agar, 39 g of potato dextrose agar (Merck) was dissolved in 1 l demineralized water. For standard-1 agar medium, 39 g of standard-1 agar medium (Merck) was dissolved in 1 l demineralized water.

Sheep blood Petri dishes comprised of ready to use Columbia agar plates containing 7–10% defibrinized sheep blood (Oxoid, Wesel, Germany).

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Instrumental

For HPLC a HP 1100 instrument (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) comprising a binary pump, autosampler and UV-detector of the same series and HP ChemStation were used. HPLC columns employed were: HPLC column (A), Superspher® 100 RP-18, 250 × 4 mm i.d., 4 μm particle size (Merck); HPLC column (B), Spherisorb ODS-2, 250 × 8 mm i.d., 3 μm particle size (Grom, Herrenberg, Germany); and HPLC column (C), Fluofix® 1 EW 425, 250 × 4 mm i.d., 5 μm particle size (Maisch High Performance LC, Ammerbuch, Germany).

GC-MS instrument (A) was a HP 6890 (Hewlett-Packard) with mass selective detector equipped with HP-5MS (crosslinked 5%-diphenyl–95% dimethyl siloxane) column 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm (Hewlett-Packard); GC-MS instrument (B) was a Shimadzu 17A/QP 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Chirasil-L-Val column 25 m × 0.25 mm i.d. (Chrompack, Middelburg, The Netherlands). EI mass spectra on instruments (A) and (B) were recorded at an ionization energy of 70 eV.

For MPLC a MD 80/100 pump, controller PS 1 (Labomatic, Sinsheim, Germany) and Model FRAC-100 fraction collector (Pharmacia, Freiburg, Germany) were used.

For ESI-MS a LCQ™ instrument (Finnigan MAT, Bremen, Germany) was used. Peptaibols were analysed by direct injection with a syringe pump, or by on-line coupling of the HP 1100 HPLC and the LCQ instrument. The sheath gas used was nitrogen (purity > 99.5%) from a nitrogen generator Model 75-72 (Whatman, Balston Inc., Haverhill, MA, USA). Spray voltage was 5.3 kV, capillary temperature 230°C, capillary voltage 31 V and tube lens offset 35 V. The collision gas was helium, relative CID energy was set at 25%.

Fermentation Procedure

Trichoderma viride NRRL 5243 was obtained as lyophilized culture from the US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, IL, USA. The lyophilisate was suspended in sterile water (0.5 ml) and transferred to Petri dishes (9.5 cm diameter) with malt agar medium. After 10 days at room temperature intensive growth of the mold was observed. Agar discs (1 cm diameter) were used for the inoculation of 40 Erlenmeyer flasks (2 l) each containing 400 ml of malt medium. The flasks were shaken at 100 rpm at ambient temperature on a Model G 25 incubation shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). For monitoring peptaibol production aliquots (20 ml) of filtered culture broth were passed through Sep-Pak® C-18 cartridges (Waters, Milford, USA) and the peptides adsorbed eluted with MeOH. The eluate was evaporated to dryness and the residue was dissolved in MeOH (0.5 ml). Aliquots of 20 μl were investigated by TLC and peptaibols visualized by spraying with water and TDM-reagent; R_f (TV I) 0.88 and R_f (TV II) 0.67; the internal standard peptaibol paracelsin [4] had R_f 0.71.

Isolation of Trichovirins II

After shaking for 5 days, the culture broth (16 l) was filtered and passed through a MPLC-column (38 × 3.7 cm) packed with XAD-2. The resin was washed with water (1 l) and 40% MeOH (0.5 l). The peptides adsorbed were eluted with a linear gradient from 75% to 100% MeOH at a flow rate of 1.7 ml/min. Elution of peptides was monitored by TLC. Fractions containing peptaibols were combined and evaporated to dryness yielding 2.03 g of crude peptide mixture. The residue was dissolved in MeOH and subjected to chromatography on Sephadex LH-20 column (40 × 10 cm). Elution was monitored by TLC, appropriate fractions were combined and evaporated to dryness, yielding 1.34 g of a pale yellow powder consisting of two groups of peptides named TV I and TV II. The mixture was dissolved in TCM/MeOH (8:2) and subjected to MPLC on silica gel 60 column (38 × 3.7 cm). Using TCM/MeOH (8:2) as eluent, only TV I (650 mg) was eluted. Subsequent elution with TCM/MeOH (1:1) provided TV II (420 mg) after evaporation. Peptides of TV II were analysed by analytical HPLC on column A, and microgram amounts of peptides were isolated by repetitive HPLC of TV II peptides on column B (10 × 100 μl of 1% solutions in MeOH). The same binary gradient program was used for HPLC using columns A and B. Eluent A: MeOH/water/MeCN 39:22:39; eluent B: MeOH/MeCN 50:50; gradient program, 0 min 0% B, 5 min 10% B, 10 min 25% B, 20 min 30% B, 25 min 45% B, 30 min 50% B, 35 min 100% B, 40 min 100% B; temperature 40°C; flow rate 0.8 ml/min (column A) and 2.7 ml/min (column B). Elution of peptides was monitored at 220 nm and peptide fractions numbers 1–6 were collected manually. These peptide fractions were investigated by on-line ESI-MS on HPLC column C using the following conditions: eluent A: MeOH/water/MeCN 39:22:39; eluent B: MeOH/MeCN 50:50; gradient

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

program was 0 min 30% B, 30 min 100% B, 37 min 100% B; temperature 40°C, flow rate 0.65 ml/min.

Chiral AAA by GC-SIM-MS

Isolated peptaibol TV II 1–6 peptides (20–50 μg) were hydrolysed in 6 M HCl (200 μl) at 110°C for 24 h. After evaporation to dryness in a stream of nitrogen, 2.5 M HCl in 2-PrOH (100 μl) was added and the mixture was heated for 1 h at 110°C. After evaporation to dryness in a stream of nitrogen, acylation was carried out with PFPAA (for protein AA and Leuol) or Ac_2O (for Iva) (50 μl) in DCM (200 μl). Solvents were removed with a stream of nitrogen, DCM (200 μl) was added, samples were subjected to GC-MS instrument (B) and compared to a standard. Carrier gas was helium, split mode; temperature program: 75°C, 8.5 min, 2.5°C/min, 100°C, 3.5°C/min, 145°C, 6.5°C/min, 190°C, 11 min; pressure program: 5 kPa, 8.5 min, 0.5 kPa/min, 7.0 kPa, 0.3 kPa/min, 10.9 kPa, 0.6 kPa/min, 15 kPa, 1 min.

Dipeptide Analysis by GC-MS

Peptides (ca. 50 μg) in 4 M HCl in MeOH (200 μl) were heated for 8 h at 110°C. Reagents were removed in a nitrogen stream and the resulting dipeptide methyl esters were trifluoroacylated with TFAA (50 μl) in DCM (200 μl). After 1 h at 20°C reagents were removed in a stream of nitrogen and DCM (50 μl) was added. For GC-MS instrument A, carrier gas helium, and the following temperature program was used: 80°C, 1 min, 15°C/min, 140°C, 8°C/min, 160°C, 2 min, 25°C/min, 260°C, 2 min, 10°C/min, 280°C, 2 min. For the determination of the *N*-termini of the peptides the *N*-acetyl dipeptide methyl esters (Ac-Aib-Gly-OMe) released on partial methanolysis were directly analysed by GC-MS.

Antibiotic and Hemolytic Activity

Bacteria (*Bacillus subtilis* DSM 347, *Staphylococcus aureus* DSM 797, *Escherichia coli* DSM 498) were incubated for 24 h at 37°C in a test tube containing potato dextrose agar (Merck) and then suspended in 10 ml of sterile water. Aliquots of 1 ml were used to inoculate 25 ml sterile standard-1 medium (Merck) at 45°C on Petri dishes. Paper discs of 6 mm diameter (Schleicher & Schüll, Dassel, Germany) were distributed on the Petri dishes, aliquots (10, 20 and 50 μl) of a 1% methanolic solution of TV II were transferred onto the paper discs and the dishes were incubated for 12 h at 4°C to allow the peptaibols to diffuse into the agar. Then, the dishes were incubated at 37°C for 24 h and the inhibition zones were measured. Hemolysis of erythrocytes was tested on ready to use Petri dishes with sheep blood agar (Oxoid, Wesel, Germany). Aliquots (10, 20 and 50 μl) of a 1% methanolic solution of TV II were applied on 6 mm diameter filter discs which were spread out on the agar. The dishes were incubated at 37°C for 12 h and hemolysis zones were measured. Paracelsin was used as standard.

RESULTS AND DISCUSSION

As described for other peptaibols, submers fermentation of the fungus was followed by isolation of the peptide mixture from the culture broth by adsorption on XAD polystyrene resin. Further, purification was performed by chromatography on Sephadex LH-20. It was realized that under submers conditions two groups of microheterogeneous peptaibols were produced, i.e. 14-mer peptides named TV I and 18-mer peptides named TV II. Structures of TV I peptaibols have been reported previously [14,18,19]. Both groups could be separated and isolated by consecutive silica gel chromatography using TCM/MeOH 8:2 and 1:1, respectively, as eluents. TV I peptides were first eluted and TV II peptides were second eluted. Thus, use of only the first eluent would have resulted in loss of TV II peptides.

From a total of 16 l culture broth, 420 mg of the microheterogenous TV II peptide mixture, uniform on TLC, could be isolated by chromatography following the monitoring and isolation procedures described in 'Experimental'.

For the assignment of the configuration of D-Iva the *N*-acetyl 2-Prp esters of a total hydrolysate of TV II peptides were analysed by GC-SIM-MS on instrument (B). Enantiomers of Ac-DL-Iva-O-(2)-Prp, are baseline resolved on Chirasil-L-Val, in contrast to TFA- or PFP-DL-Iva-O-(2)-Prp esters. No L-Iva was detected. Thus, the D(=*R*)-configuration of Iva [22] in TV peptides was established. The L-configuration of the other chiral AA and Leuol and ratios of isomeric AA were determined by analysing the *N*-PFP-AA-(2)-Prp esters and *N*(*O*)-PFP-Leuol on Chirasil-L-Val.

The elution profile of TV II peptides from the analytical HPLC column A is shown in Figure 1. Repetitive chromatography (HPLC column B) provided six fractions named TV II 1–6; for HPLC see Figure 2. The peptides of these fractions could not

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

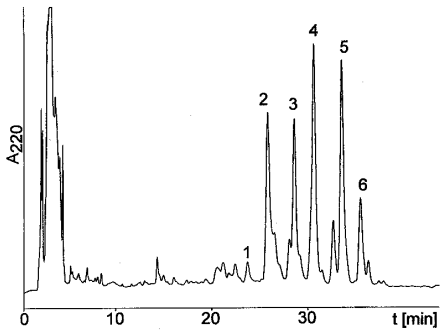


Figure 1 Analytical HPLC (fingerprint) of trichovirins II on column A. For chromatographic conditions of Figures 1–3 see 'Experimental'.

be further purified on this column by varying the chromatographic conditions. However, HPLC of the individual peptaibol fractions 1–6 on a special fluorocarbon-coated silica [23] (HPLC column C) made possible the further separation of peptides (see inserts of Figure 2). Therefore, on-line HPLC/ESI-MS using HPLC column C was used for the investigation of isolated peptides 1–6. As exemplified with the ESI-MS of TV II 5 peptide (Figure 3a; for structure see Figure 4) in all cases sodiated molecular ions were the most abundant, and characteristic fragment ions of the b_2–b_5 and b_7–b_{12} acylium ion series were observed. The b_6 fragment ion cannot be seen in the MS (but in MS-MS) as a result of the stability of the Gln^6-AA^7 bond. Typically, characteristic fragment ions of the b_{12}- and y_6-series arise from cleavage of the labile Aib^{12}-Pro^{13} bonds [4]. The fragment ions b_{12} and y_6 were subjected to MS-MS and sets of diagnostic product ions of the b_4–b_{11} series, including the b_6 fragment and internal fragments of y_6, were generated (Figure 3b,c) and provided sequence information of AA positions 4–12. The b_1 fragment ions, representing *N*-terminal acetylated Aib in all peptides, were not detected under the conditions of positive ESI-MS. The *N*-termini, however, were determined as Ac-Aib^1-Gly^2-OMe directly after acidic partial methanolysis in all peptides by GC-MS [*m/z* (%) 100 (100), 157 (73)] of the isolated TV II peptides 1–6. Partial methanolysis of individual peptides [24] was also used for the assignment of the positions of the isomeric AA Val and Iva which could not be distinguished by ESI-MS. Methanolysis of the TV peptides, followed by trifluoroacetylation of the dipeptide methyl esters released, furnished a mixture of TFA dipeptide methyl esters which were resolved on GC. Those containing isomeric AA, or being otherwise of diagnostic interest, were characterized by comparison with retention times of standard dipeptides and by their fragmentation pattern on MS. Analogously, reference dipeptides not available were generated by methanolysis from peptaibols of known sequences. For retention times and mass fragments of selected dipeptide derivatives used for sequencing see Table 2. Under the conditions of EI-MS at 70 eV most

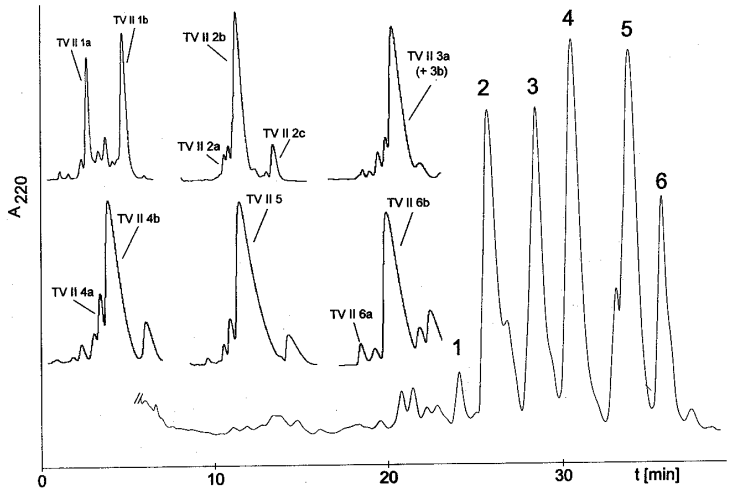


Figure 2 Semipreparative HPLC of trichovirins II on column B. Isolated peptaibol fractions 1–6 were subjected to column C. For resulting chromatograms see inserts.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

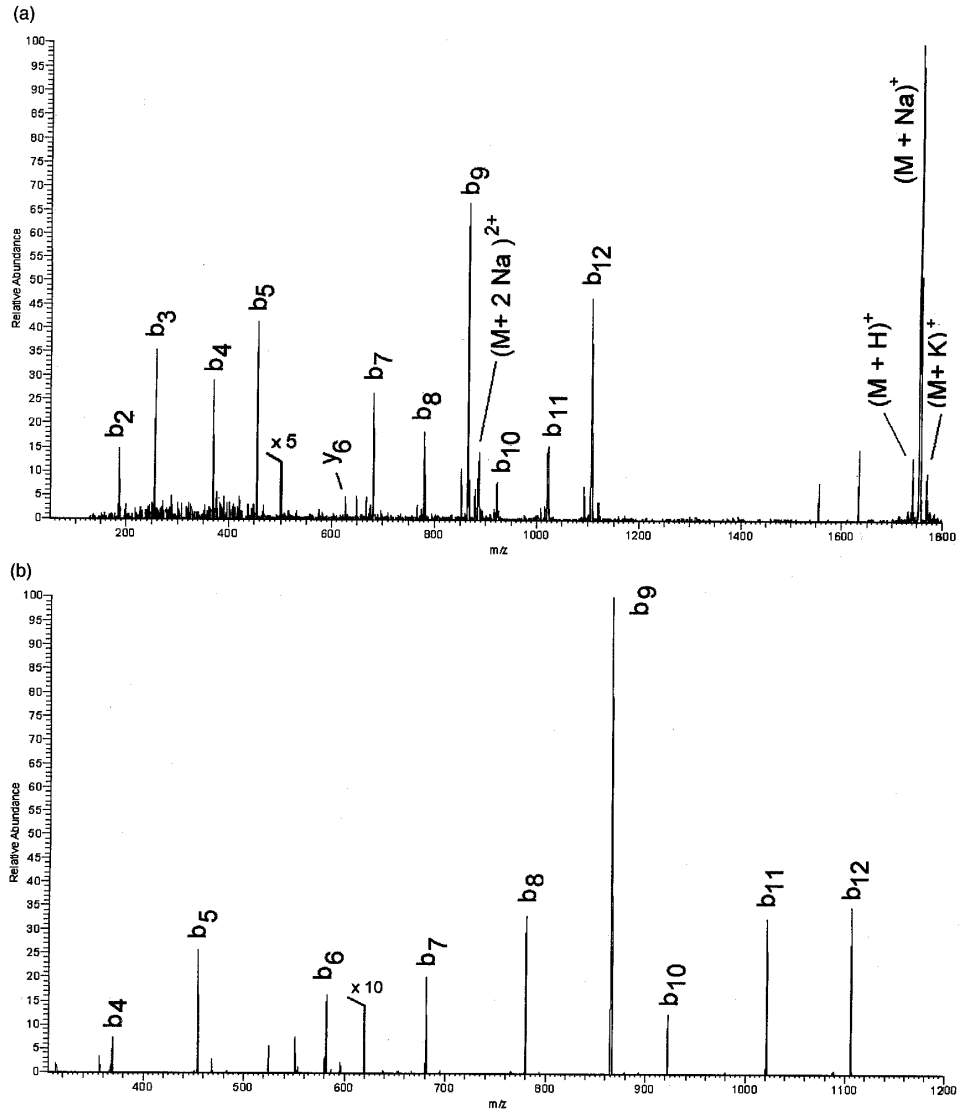


Figure 3 (a) On-line HPLC (column C, see insert in Figure 2) and ESI-MS of TV II 5. (b) ESI-MS-MS of the b_{12} fragment of TV II 5 at m/z 1106. (c) ESI-MS-MS of the y_6 fragment of TV II 5 at m/z 626. For mass spectrometry see 'Experimental'; for corresponding nominal masses and abbreviations see Table 1.

abundant fragments resulted from the cleavage of C^{α}–CO bonds of the peptide backbone and side chain cleavage. For example, according to AAA, the major peptide TV II 5 contains two residues of Iva and one residue of Val. According to ESI-MS these isomeric AA have to be located as Vxx in positions 7, 8 and 11. Analysis of the methanolysate via GC-MS revealed the release of the peptides Glu-Iva, Val-Aib and Gly-Iva. Consequently, Val had to be put in position 8 and Iva in positions 7 and 11 of TV II 5 (see Figure 4). As a result of the microheterogeneity of the other TV II peptides, ratios of Val and Iva were odd according to AAA, but dipeptide analysis could also be used for the assignment of their positions (see Figure 4). This method, however, did-not allow the unambiguous assignment of presence

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

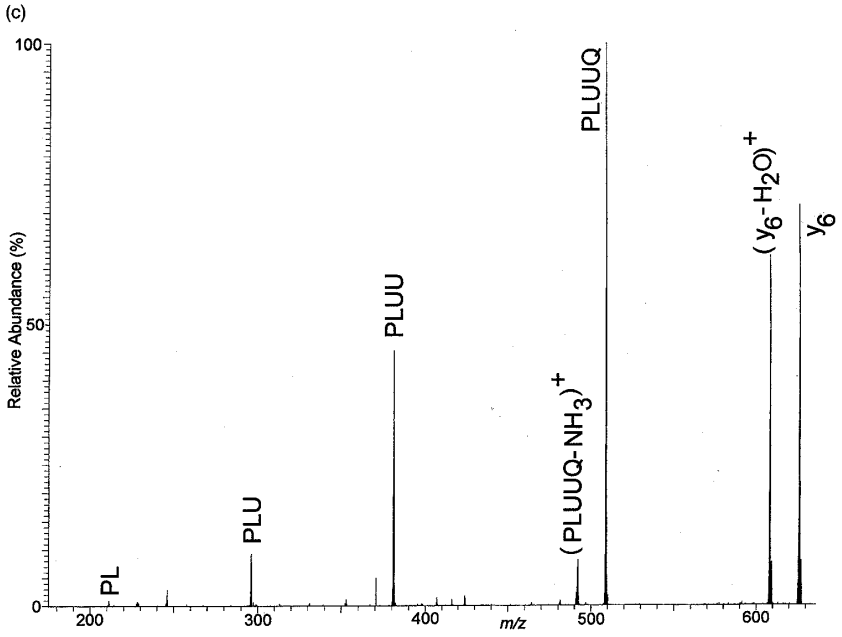


Figure 3 (*Continued*)

and position of Val or Iva in minor peptides TV II 1a and TV II 2c since the dipeptides Glu[6]-Val[7] and Glu[6]-Iva[7] were both detected in the methanolysates of the isolated fractions 1 and 2 of TV II peptides. These peptides were still microheterogeneous as revealed by HPLC on fluorocarbon column C (see inserts of Figure 2). Positions 7 are therefore denoted Vxx in these two sequences (see Figure 4). It should be mentioned that Gln residues in TV peptides are hydrolysed to Glu under the conditions of acidic methanolysis. The presence of two Gln moieties in native peptides was established by ESI-MS.

Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	(%)	MM
1a	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Ala	Gln	Vxx	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	0.9	1703
1b	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Ala	Val	Aib	Gly	Iva	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	1.6	1703
2a	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Iva	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	1.1	1703
2b	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	17.8	1703
2c	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Vxx	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	2.4	1717
3a	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Iva	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	17.9	1717
3b	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Iva	Gln	Iva	Aib	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	0.7	1717
4a	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Iva	Gln	Iva	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	2.0	1731
4b	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Iva	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	21.1	1717
5	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Iva	Val	Aib	Gly	Iva	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	24.6	1731
6a	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Aib	Gln	Iva	Leu	Aib	Gly	Iva	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	1.7	1745
6b	Ac	Aib	Gly	Ala	Leu	Iva	Gln	Iva	Val	Aib	Gly	Iva	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Leuol	8.2	1745

Figure 4 Sequences of the peptides of TV II; Pos., position of AA; (%), relative amounts of peptides in the natural microheterogeneous mixture; MM, nominal molecular masses; Leuol and chiral AA are of the L-configuration with the exception of D (=*R*)-Iva [22]; dipeptides used for the assignment of isomeric Val/Iva, generated by methanolysis, are underlined; Vxx means that dipeptides Glu-Val and Glu-Iva both were detected in the methanolysate as a result of microheterogeneity (Gln in natural peptides is hydrolysed to Glu).

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Table 1 Detected and Identified Diagnostic Nominal Mass Fragments and Adducts of Molecular Ions of Trichovirins (TV) II Deduced from ESI-MS; Values in *m/z*

Fragments[a]	TV II											
	1a	1b	2a	2b	2c	3a	3b	4a	4b	5	6a	6b
b_1[b]	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
b_2	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185
b_3	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
b_4	369	369	369	369	369	369	369	369	369	369	369	369
b_5	440	454	440	454	454	454	468	468	454	454	454	468
b_6[c]	568	582	568	582	582	582	596	596	582	582	582	596
b_7	667	653	653	667	681	681	695	695	667	681	681	695
b_8	766	752	752	766	780	780	780	794	766	780	794	794
b_9	851	837	837	851	865	865	865	879	851	865	879	879
b_{10}	908	894	894	908	922	922	922	936	908	922	936	936
b_{11}	993	993[c]	993[c]	993	1007	1007	1007	1021	1007[c]	1021	1035[c]	1035
b_{12}	1078	1078	1078	1078	1092	1092	1092	1106	1092	1106	1120	1120
y_6	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626	626
PL[d]	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211
PLU[d]	296	296	296	296	296	296	296	296	296	296	296	296
PLUU[d]	381	381	381	381	381	381	381	381	381	381	381	381
$(PLUUQ\text{-}NH)_3^+$[d]	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
PLUUQ[d]	509	509	509	509	509	509	509	509	509	509	509	509
$(M+H)^+$	1704	1704	1704	1704	1718	1718	1718	1732	1718	1732	1746	1746
$(M+Na)^+$	1726	1726	1726	1726	1740	1740	1740	1754	1740	1754	1768	1768
$(M+K)^+$	1742	1742	1742	1742	1756	1756	1756	1770	1756	1770	n.d	1784
$(M+2Na)^{2+}$	874.5	874.5	874.5	874.5	881.5	881.5	881.5	888.5	881.5	888.5	895.5	895.5

[a] Nomenclature according to Roepstorff and Fohlmann, modified by Biemann [32].
[b] b_1 identified by dipeptide analysis as Ac-Aib-Gly-OMe with GC-MS.
[c] Identification via direct injection of isolated TV II 1–6 fractions and MS-MS of the b_{12} fragment ion.
[d] Identification via direct injection of isolated TV II 1–6 fractions and MS-MS of the y_6 fragment ion.

Selective methanolysis has the advantage that only few micrograms of peptides are required for analysis. This method was also used for the assignment of positions of the isomeric AA Leu and Ile in hypomurocins [24]. In the cases of TV II peptides, however, no Ile was present according to AAA. Further, as demonstrated with Aib[1]-Gly[2] above, and Pro[13]-Leu[14] below, a methanolysate can be screened for any dipeptides suitable for further sequence informations.

The *C*-terminal positions of Leuol[18] were deduced from the differences of 117 mass units from y_6 (*m/z* 626) and the internal fragments PLUUQ (*m/z* 509) (Figure 3c). MS-MS of the y_6 fragments at *m/z* 626 provided a series of diagnostic ions, namely (PL), (PL)U, (PL)UU, and (PL)UUQ establishing AA positions 13–17 (*N*-terminal Pro is protonated). The lowest mass detectable in ESI/MS-MS of y_6 was (PL) at *m/z* 211, representing Pro[13]-Leu[14]. This was also confirmed by dipeptide analysis after derivatization to TFA-Pro-Leu-OMe [*m/z* (%) 166 (100), 280 (38), 279 (30), 194 (13), 237 (7)].

The detected and identified diagnostic mass fragments and adducts of molecular ions of TV II peptaibols deduced from ESI-MS are summarized in Table 1. The AA sequences are deducible from the differences of nominal masses between the consecutive ions of any particular series. The resulting sequences of TV II: 1a,b; 2a,b,c; 3a,b; 4a,b; 5; and 6a,b peptides, determined by on-line-HPLC/ESI-MS, direct injection ESI-MS, dipeptide analysis by GC-MS, and chiral AAA are shown in Figure 4. Relative amounts of peptaibols were calculated from their peak areas determined by HPLC. In principle, the HPLC elution pattern ('fingerprint') and relative amounts of individual peptaibols should be reported together with sequences.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2 Retention Times (t_R), Diagnostic Mass Fragments (m/z), and Relative Intensities (%) of Reference TFA-Dipeptide-Methyl Esters Used for the Assignment of Positions of Isomeric Val and Iva by GC-MS (See 'Experimental' for Conditions)

t_R (min)	Reference dipeptide derivatives	m/z (%)						
10.09	Val-Aib[b]	169 (100)	253 (37)	116 (17)	168 (10)	144 (3)	126 (2)	
10.15	Aib-Val[b]	154 (100)	253 (13)	169 (10)	130 (4)	210 (2)		
10.30	Gly-DL-Iva[a]	225 (100)	130 (45)	126 (40)	158 (6)	209 (4)	154 (4)	99 (4)
11.18	Gly-Val[a]	225 (100)	126 (31)	210 (18)	182 (4)			
11.43	Leu-DL-Iva[a]	140 (100)	183 (62)	168 (34)	281 (31)	102 (20)	130 (12)	253 (3)
11.67	Leu-Val[a]	140 (100)	183 (62)	168 (33)	281 (36)	283 (23)		
11.88	Val-Leu[a]	169 (100)	154 (52)	281 (33)	144 (20)	126 (10)	238 (8)	126 (8)
13.01	Glu-D-Iva[c]	213 (100)	152 (38)	311 (30)	181 (30)	279 (15)	115 (2)	
13.21	Glu-Val[a]	213 (100)	152 (94)	311 (47)	181 (45)	212 (34)	267 (3)	

[a] Synthetic dipeptides.
[b] Generated by methanolysis of paracelsin A [4].
[c] Generated by methanolysis of antiamoebin [5,22]; Gln in TV peptides is hydrolysed to Glu on methanolysis.
For diagnostic dipeptides Pro-Leu and Ac-Aib-Gly see 'Results and Discussion'.

The mixture of TV II peptides exerts antibiotic activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* and causes hemolysis of sheep erythrocytes (Table 3).

The TV II peptides are related to the 18-mer trichorzin HA peptaibols [25]. They differ by AA exchange mainly in positions 4 and 11. As a result of related structures the antibiotic and hemolytic properties of TV II are similar to 18-mer peptaibols trichotoxins containing Valol [2–4] and hypomurocins B [24]. The latter is a mixture of peptides containing either *C*-terminal Leuol or Valol.

Other microheterogeneous peptaibols containing *C*-terminal Leuol are, for example, the 20-mer hypelcins [26], the 14-mer harzianins [27] the 19- and 11-mer trikoningins [28], the 18-mer trichokindins [29], the 11-mer trichogin [16] and trichorozins [30], the 7-mer trichodecenins [31], and the 7- and 6-mers detected in the trichobrachin III mixture [19].

CONCLUSIONS

Using submerged fermentation, *Trichoderma viride* strain NRRL 5243 produces two groups of microheterogeneous peptaibol antibiotics, named trichovirins (TV) I and II. Under the conditions of static fermentation only TV I are produced. As demonstrated previously, TV I consist of 14-mer peptaibols, whereas TV II, as described here, represent a mixture of 18-mer peptaibols. For the separation of individual peptides of TV II, HPLC on an

Table 3 Antibacterial and Hemolytic Activities ($n = 2$) of the Trichovirin II Mixture in Comparison to the 20-mer Peptaibol Paracelsin (PC) [4]; $c = 1\%$ (MeOH); Inhibition Zones (mm) of Bacteria were Measured After 24 h, Hemolysis Zones of Erythrocytes (mm) were Measured After 12 h, Diameter of Discs were Subtracted in Both Cases

	Bacillus subtilis	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	Hemolysis
TV II (10 µl)	12	14	0	0
TV II (20 µl)	17	19	0	5
TV II (50 µl)	22	25	0	16
PC (20 µl)	12	14	0	11

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

octadecylsilyl (ODS) stationary phase, followed by the use of a special fluorocarbon stationary phase with different selectivity, was found to be highly suitable. The latter phase is also considered as being of advantage for the complementary resolution of other microheterogeneous peptaibols. This also demonstrates the limits of separating peptaibols on most frequently used ODS phases. TV II were subjected to partial methanolysis, and diagnostic dipeptides formed were characterized by GC-EI-MS. This method is capable of distinguishing positions of isomeric Val/Iva and Leu/Ile in peptaibols and can be used for the generation of any other dipeptides of interest. This approach can be used alternatively, or complementary, to multidimensional NMR techniques.

Acknowledgements

We thank Dr Michael Kieß (present address, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Germany) for isolating the mixture of TV II peptides. Initial work was partly supported by the BMFT/DECHEMA Biotechnology program. We also thank Dr M. Weidenbörner, Institute of Microbiology, Giessen University, for his support.

REFERENCES

1. Hou CT, Ciegler A, Hesseltine CW. New mycotoxin, trichotoxin A, from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. *Appl Microbiol* 1972; **23**: 183–185.
2. Irmscher G, Bovermann G, Boheim G, Jung G. Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part A. Isolation, characterization and conformation. *Biochim Biophys Acta* 1978; **507**: 470–484.
3. Brückner H, König WA, Aydin M, Jung G. Trichotoxin A 40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments. *Biochim Biophys Acta* 1985; **827**: 51–62.
4. Przybylski M, Dietrich I, Manz I, Brückner H. Elucidation of structure and microheterogeneity of the polypeptide antibiotics paracelsin and trichotoxin A-50 by fast atom bombardment mass spectrometry in combination with selective *in situ* hydrolysis. *Biomed Mass Spectrom* 1984; **11**: 569–582.
5. Pandey RC, Meng H, Cook JC, Rinehart KL. Structure of antiamoebin I from high resolution field desorption and gas chromatographic mass spectrometry studies. *J Am Chem Soc* 1977; **99**: 5203–5205.
6. Boheim G, Irmscher G, Jung G. Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part B. Voltage-dependent pore formation in bilayer lipid membranes and comparison with other alamethicin analogues. *Biochim Biophys Acta* 1978; **507**: 485–506.
7. Sansom MSP. Alamethicin and related peptaibols-model ion channels. *Eur Biophys J* 1993; **22**: 105–124.
8. Duclohier H, Snook CF, Wallace BA. Antiamoebin can function as a carrier or as pore-forming peptaibol. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1414**: 255–260.
9. Fox RO, Richards FM. A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature* 1982; **300**: 325–330.
10. Aubry A, Bayeul D, Brückner H, Schiemann N, Benedetti E. The crystal state conformation of Aib-rich segments of peptaibol antibiotics. *J Peptide Sci* 1998; **4**: 502–510.
11. Schirmböck M, Lorito M, Wang Y, Hayes C, Arisan-Atac I, Scala F, Harman G, Kubicek C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Enviro Microbiol* 1994; **60**: 4364–4370.
12. Solfrizzo D, Altomare C, Visconti A, Bottalico A, Perrone G. Detection of peptaibols and their hydrolysis products in cultures of *Trichoderma* species. *Natural Toxins* 1994; **2**: 360–365.
13. Brückner H, Maisch J, Reinecke C, Kimonyo A. Use of α-aminoisobutyric acid and isovaline as marker amino acids for the detection of fungal polypeptide antibiotics. Screening of *Hypocrea*. *Amino Acids* 1991; **1**: 251–257.
14. Brückner H, Kripp T, Kieß M. Sequencing of new Aib-peptides by tandem mass spectrometry and automated Edman degradation, in *Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium*. E Giralt, D Andreu, Eds, p. 347–349, ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1991.
15. Matha V, Jegorov A, Kiess M, Brückner H. Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, α-aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue Cell* 1992; **24**: 559–564.
16. Auvin-Guette C, Rebuffat S, Prigent Y, Bodo B. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Am Chem Soc* 1992; **114**: 2170–2174.
17. Gräfe U, Ihn W, Ritzau M, Schade W, Stengel C, Schlegel B, Fleck WF, Künkel W, Härtl A, Gutsche W. Helioferins; novel antifungal lipopeptides from *Mycogone rosea*: screening, isolation, structures and biological properties. *J Antibiotics* 1995; **48**: 126–133.
18. Kieß M, Brückner H. Trichovirin: fermentation, isolation and sequence determination of a polypeptide antibiotic, in *DECHEMA Biotechnology Conferences, 4B*, p. 1155–1158, VCH, Weinheim, 1990.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

19. Brückner H, Kripp T, Kieß M. Polypeptide antibiotics trichovirin and trichobrachin: sequence determination and total synthesis, in *Chemistry of Peptides and Proteins, Vol. 5/6, Part A*. D Brandenburg, V Ivanov, W Voelter, Eds, p. 357–373, DWI Reports TH Aachen, Verlag Mainz, Aachen, 1993.
20. Greenstein JP, Winitz M. *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 3, Chapter 47. Wiley, New York, 1961.
21. Prox A, Schmidt J, Ottenheym H. Die Struktur des Antamanids. *Liebigs Ann Chem* 1969; **722**:179–196.
22. Bosch R, Brückner H, Jung G, Winter W. (−)-Isovaline: confirmation of its D-(=*R*)-configuration by x-ray analysis of its *N*-chloroacetyl derivate. *Tetrahedron* 1982; **38:** 3579–3583.
23. Monde T, Kamiusuki T, Kuroda T, Mikumo K, Ohkawa T, Fukube H. High-performance liquid chromatographic separation of phenols on a fluorocarbon-bonded silica gel column. *J Chromatogr A* 1996; **722**: 273–280.
24. Becker D, Kieß M, Brückner H. Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Liebigs Ann/Recueil* 1997: 767–772.
25. Goulard C, Hlimi S, Rebuffat S, Bodo B. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiotics* 1995; **48**:1248–1253.
26. Matsuura K, Shima T, Takaishi Y, Nagaoka Y, Fujita T. Fungal metabolites XV. Primary structures of antibiotic peptides, hypelcins B-I, B-II, B-III, B-IV and B-V, from *Hypocrea peltata*. Application of electrospray mass spectrometry and electrospray mass spectrometry/mass spectrometry. *Chem Pharm Bull* 1994; **42**: 1063–1069.
27. Rebuffat S, Goulard C, Bodo B. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J Chem Soc Perkin Trans I* 1995: 1849–1855.
28. Auvin-Guette C, Rebuffat S, Vuidepot I, Massias M, Bodo B. Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*. *J Chem Soc Perkin Trans I* 1993: 249–255.
29. Iida A, Sanekata M, Fujita T, Tanaka H, Enoki A, Fuse G, Kanai M, Rudewicz PJ, Tachikawa E. Fungal metabolites XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I–VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem Pharm Bull* 1994; **42**: 1070–1075.
30. Iida A, Sanekata M, Wada SI, Fujita T, Tanaka H, Enoki A, Fuse G, Kanai M, Asami K. Fungal metabolites. XVIII. New membrane modifying peptides, trichorozins I-IV, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem Pharm Bull* 1995; **43**: 392–397.
31. Fujita T, Wada SI, Iida A, Nishimura T, Kanai M, Toyama N. Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and -II, from *Trichoderma viride*. *Chem Pharm Bull* 1994; **42**: 489–494.
32. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* 1992; **61**: 977–1010.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 862 (1999) 179–189

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry

Andreas Jaworski, Hans Brückner*

Department of Food Sciences, Institute of Nutritional Science, Justus-Liebig University of Giessen, Südanlage 6, D-35390 Giessen, Germany

Received 11 June 1999; received in revised form 23 August 1999; accepted 30 August 1999

Abstract

Using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) the sequences of the microheterogeneous peptide mixture of the 18-residue "peptaibol" antibiotics trichotoxins A-40, isolated from the mold *Trichoderma viride* strain NRRL 5242, were reinvestigated. The structures of two major and one minor component [J. Chromatogr., 296 (1984) 236] could be confirmed and hitherto not known sequences of a further major and two minor peptides could be determined. It is demonstrated that ESI-MS in the positive ionization mode is advantageously completed by applying negative ionization. The methods used make possible the sequence determination of components of peptaibols without previous isolation and allow, in certain cases, sequencing of peptides which are incompletely or not resolved by HPLC. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Mass spectrometry; *Trichoderma viride*; Trichotoxin; Antibiotics; Peptaibiotics; Polypeptide antibiotics; α-Aminoisobutyric acid; D-Isovaline

1. Introduction

The isolation and preliminary characterization of a peptide mycotoxin, named trichotoxin (TT) A, from strain NRRL 5242 of the mold *Trichoderma viride* was reported in 1972 [1]. This peptide was found, among other amino acids (AAs), to contain also the non-protein Aib (α-aminoisobutyric acid, 2-amino-2-methyl-propanoic acid), D-Iva (isovaline, 2-amino-2-methyl-butanoic acid) and the amino alcohol Valol (2-amino-3-methyl-1-butanol). The mixture consists of two groups of peptides each of which showed microheterogeneity. These groups were distinguished by an exchange of Glu and Gln as well as some other AAs, thus resulting in an acidic and neutral fraction with different polarity. The peptide mixtures were named TT A-40 and A-50, respectively, according to their different R_F values on thin-layer chromatography (TLC) [2]. Peptide groups TT A-40 and A-50 could also be separated by multiplicative counter-current distribution (CCD) [3–5]. The sequences of TT A-50 could be determined by fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) of individual peptides isolated by high-performance liquid chromatography (HPLC) [6].

*Corresponding author: Tel.: +49-641-9939-141; fax:+49-641-9939-149.

E-mail address: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de (H. Brückner)

0021-9673/99/$ – see front matter © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0021-9673(99)00931-0

Owing to the presence of several Aib-residues, a C-terminal bonded amino alcohol and their bioactivities, the polypeptides were placed in the group of "peptaibol" antibiotics [7–9], or, generally spoken, "peptaibiotics" [10].

The sequences of some peptides of the TT A-40 peptide mixture, after suitable derivatizations, had been determined by combined gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) of three isolated *N*-acetyl dodecapeptides and two *N*-prolylhexapeptides. These peptide fragments were obtained after selective trifluoroacetolysis of a still microheterogeneous TT A-40 mixture resulting from CCD. The sequences of these fragments, including AA exchange due to their natural microheterogeneity, were reported [3–5,11,12]. Definite arrangements of N- and C-terminal fragments were deduced from the molecular ions of the TT A-40 mixture and their intensities as determined by field desorption MS [13].

Fast screening for [14–16], and rapid sequencing of [6,17], peptaibols/peptaibiotics is of general interest owing to their wide range of bioactivities. They include bactericidal [1,9,10], fungicidal [18], weak antiprotozoal and anthelmintic [19], insecticidal [20,21] and, in part, cytotoxic [22] properties. Recently, antithrombic [23] and neuroleptic (antipsychotic) [24] activities of peptaibiotics were reported as well as uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria [25]. Some peptaibols attracted much attention as a result of their capability of forming voltage-gated ion channels in lipid bilayer membranes. Thus they might serve as structurally well characterized models for ion transport in excitable cells [26–30].

With the determination of new sequences, and confirmation of reported sequences of the original TT A-40 peptide mixture, in the following we demonstrate advantages and discuss limits of sequencing microheterogeneous peptaibol antibiotics using on-line HPLC–ESI-MS in the positive and negative ionization mode.

2. Experimental

2.1. Solvents and chemicals

Methanol (MeOH) and acetonitrile (MeCN) were of the gradient grade and purchased from Merck, trifluoroacetic acid (TFA) and trifluoroacetic acid anhydride (TFAA) were from Fluka (Buchs, Switzerland), dichlormethane (DCM) was from Roth (Karlsruhe, Germany); doubly distilled water from a quartz distill was used for preparing eluents. The synthetic dipeptide Pro–Leu, serving as standard, was from Sigma (Deisenhofen, Germany).

2.2. Source of TT A-40 used in this study

TT was isolated from the mycelium of *Trichoderma viride* NRRL 5242 as described [5] and peptide groups A-40 and A-50 were separated by CCD [5,13]. For HPLC of TT A-40 used for its previous sequencing see Ref. [13] and therein Fig. 3, fraction (C) III (570 mg). After partial trifluoroacetolysis of a 500-mg aliquot from totally 570 mg peptide, unreacted TT A-40 was separated from hydrolyzed material and recovered by silica gel chromatography [5]. This material, representing essentially the peptide mixture used originally for sequencing [5], was investigated in the study presented here. For a TLC of the unreacted material recovered see Ref. [5] and therein Fig. 2, fractions 6–10.

2.3. Instruments and chromatography

For HPLC a HP 1100 instrument (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) and HP ChemStation with binary pump were used and connected either to a UV detector of the same series or hyphenated to the mass spectrometer.

The stationary phase of the HPLC column was Superspher 100 RP-18, 250 mm×4 mm I.D. with 4 μm particle size (Merck, Darmstadt, Germany). Eluent A: MeOH–water–MeCN–TFA (39:22:39:0.1, v/v); eluent B: MeOH–MeCN–TFA (50:50:0.1, v/v); 0 min 10% B, 10 min 10% B, 30 min 50% B, 35 min 50% B, flow-rate 0.8 ml/min, temperature 40°C; injected amounts were 10 μl of 0.1% peptides in MeOH.

For ESI-MS a LCQ mass spectrometer (ThermoQuest, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) was used. Sheath gas was nitrogen (purity>99.5%) from a nitrogen generator Model 75-72 (Whatman, Balston, Haverhill, MA, USA) and the collision gas was

helium of 5.0 quality (Messer-Griesheim, Krefeld, Germany). Sequence analysis was carried out by positive- and negative-ionization, recorded in the centroid mode, providing m/z values having an accuracy of one decimal. Values of Table 1 are rounded up or down, respectively. Conditions for positive (negative)-ionization mode: spray voltage 4.25 (4.25) kV, heated capillary temperature 200 (200)°C, capillary voltage +44 (−27) V, tube lens offset +55 (−60) V, maximum ion time 1000 ms. For automatic calibration a mixture of caffeine, the tetrapeptide Met–Arg–Phe–Ala, and the perfluorinated mass spectrometric standard Ultramark 1621 was used. In the negative-ionization mode aqueous 4

Table 1
Nominal masses and adducts of molecular ions of trichotoxins A-40 and fragment ions determined by HPLC–ESI-MS performed in positive and negative ionization mode

Diagnostic ions[a]	Trichotoxin A-40 peptides (m/z)					
	1	2	3	4	5	5a
b_4[d]	383	383	383	383	383	397
b_5[d]	468	468	468	468	468	482
b_6[d]	596	596	596	596	596	610
b_7[b]	681	681	681	681	681	695
b_8[b]	766	766	766	766	766	780
b_9[b]	837	851	837	851	851	865
b_{10}[b]	908	922	908	922	922	936
b_{11}[b]	993	993	993	1007	1007	1021
b_{12}[b]	1078	1078	1078	1092	1092	1106
b_{15}[b]	1373	1373	1373	1387	1387	n.d.
b_{16}[b]	1458	1458	1472	1472	1486	n.d.
b_{17}[b]	1587	1587	1601	1601	1615	n.d.
$(M-H_2O)^+$[b]	1672	1672	1686	1686	1700	1700
$(M+H)^+$	1691	1691	1705	1705	1719	1719
$(M+Na)^+$	1713	1713	1727	1727	1741	1741
y_{6P}'[b]	613	613	627	613	627	613
$(y_{6P}'-H_2O)^+$[c]	595	595	609	595	609	609
1	510[c]	510[c]	n.d.	510[c]	n.d.	510[c]
2	n.d.	n.d.	524[c]	n.d.	524[c]	n.d.
3	n.d.	n.d.	395[c]	n.d.	395[c]	n.d.
4	381[c]	381[c]	n.d.	381[c]	n.d.	381[c]
5[c]	296	296	296	296	296	296
6[c]	211	211	211	211	211	211
y_{12N}[e]	1094	1094	1108	1108	1122	1108
y_{13N}[e]	1222	1222	1236	1236	1250	n.d.
$(y_{13N}-NH_3)^-$[e]	1205	1205	1219	1219	1233	1219
y_{14N}[e]	1307	1307	1321	1321	1335	1321
y_{15N}[e]	1420	1420	1434	1434	1448	1434
y_{16N}[e]	1505	1505	1519	1519	1533	1519
y_{17N}[e]	1562	1562	1576	1576	1590	1590
$(M)^-$	1690	1690	1704	1704	1718	1718
$(M-Ac)^-$[e]	1647	1647	1661	1661	1675	1675
$(M-H_2O)^-$[e]	1672	1672	1686	1686	1700	1700

[a] Nomenclature based on Refs. [33,34].
[b] Identified via MS–MS of $(M+H)^+$.
[c] Identified via MS–MS of the y_{6P}' fragment.
[d] Identified via MS^3 of b_{12}.
[e] Identified via MS–MS from $(M)^-$; 1=(Pro–Leu–Aib–Aib–Glu)′; 2=(Pro–Leu–Aib–D-Iva–Glu)′; 3=(Pro–Leu–Aib–D-Iva)′; 4=(Pro–Leu–Aib–Aib)′; 5=(Pro–Leu–Aib)′; 6=(Pro–Leu)′; n.d.=not detected; masses of AAs ($-H_2O$) are: Ala (71), Aib (85), Gln (128), Glu (129), Gly (57), Iva (99), Leu (113), Pro (97); amino alcohol Valol (103); Ac (43).

M ammonia was added to the HPLC eluate by a syringe pump at a flow-rate of 3 μl/min. The $(M+H)^+$ or $(M)^-$ ions and the internal fragments y'_{6P} of compounds were chosen as precursor for multi stage MS, i.e., (MS^n).

For GC–MS the instrument designated "A" was a HP 6890 GC (Hewlett-Packard) with a mass-selective detector equipped with a HP-5MS fused-silica column (crosslinked 5% diphenyl–95% dimethyl siloxane), column 30 m×0.25 mm I.D., film thickness 0.25 μm (Hewlett-Packard); instrument "B" was a Shimadzu 17A/QP 5000 mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Chirasil L-Val column, 25 m×0.25 mm I.D. (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) and run in selected ion monitoring (SIM) mode.

2.4. GC–MS experiments

2.4.1. Chiral amino acid analysis (AAA) by GC–SIM-MS

The mixture of TT A-40 peptides was hydrolyzed (6 *M* HCl, 110°C, 24 h). Composition and chirality of AAs and Valol were assigned after derivatization as *N*-pentafluoropropionyl-AA-(2)-propyl esters (*N*-acetyl 2-propyl ester for Iva) and *N*(*O*)-bis(pentafluoropropionyl)valol by GC–SIM-MS (instrument "B") similarly to procedures described previously [5,10].

2.4.2. Dipeptide analysis by GC–MS

The mixture of TT A-40 peptides (ca. 10 μg) in 4 *M* HCl in MeOH was heated for 8 h at 110°C. Reagents were removed in a nitrogen stream and the resulting dipeptide methyl esters were trifluoroacetylated with TFAA (50 μl) in DCM (200 μl). Reagents were removed in a stream of nitrogen, DCM (50 μl) was added and the resulting TFA–dipeptide-methyl esters were analyzed for the presence for TFA–Pro–Leu–OMe by comparison with retention times and fragmentation pattern of the standard dipeptide by GC–MS on instrument "A" as described previously [10].

3. Results and discussion

The elution profile of TT A-40 peptides resolved on an analytical Superspher column is shown in Fig. 1a. For comparison HPLC of TT A-40 using a semipreparative Nucleosil ODS stationary phase (taken from Ref. [13]) is shown as mirror image in Fig. 1b. Note that new numbering of peaks for Fig. 1a is used for simplicity. TT A-40 peptides were eluted from Nucleosil using a neutral eluent composed of MeOH–water (85:15, v/v) [13]. However, elution of peptides from Superspher using an eluent consisting of MeOH–water–MeCN required addition of 0.1% TFA. Omission of the acid from the eluent resulted in delayed elution of the mixture from the column as a broad peak of almost unresolved peptides. This indicates that the carboxyl group of Glu^{17} is protonated under the acidic conditions. It is assumed that peak 5 in the original chromatogram and not resolved on Nucleosil (see Fig. 1b) is separated into two peaks designated 3 and 4 in Fig. 1a, and that peak 7 in the original chromatogram corresponds to peak 5 in Fig. 1a. The Superspher stationary phase was used for on-line HPLC and ESI-MS in the positive- and negative-ionization mode for sequencing of TT A-40 components.

Chirality and AA ratios of the original TT A-40 mixture [5] were determined as Aib (9.23), Gly (0.93), L-Leu (2.09), L-Glx (2.00), L-Ala (1.82), L-Pro (1.15), D-Iva (0.5, corrected here based on GC–SIM-MS), L-Valol (1.15). Non-stoichiometry of some AAs are the result of AA exchange. Quantification of Aib and Iva suffered from low derivatization yields using the conventional ninhydrin method [31,32]. GC–SIM-MS of the TT A-40 mixture established that D-Iva and Leu were present, but not its isomers Val and Ile, respectively. Since it is not possible to distinguish between amounts of Glu and Gln originally present in peptides after total hydrolysis, the mass difference of 1 Da between Gln (*m/z* 128) and Glu (*m/z* 129), respectively, was used to determine AA at positions 6 and 17 of peptides. Thus the positions of Gln^6 and Glu^{17} residues, as determined previously by GC–MS [5,11], were confirmed.

Positive-ion MS–MS of $(M+H)^+$ precursor ions generated the b and y series of product ions. Notation of the b series, representing acylium ions, is according to Roepstorff and Fohlmann [33], modified by Biemann [34]. The resulting y series, however, are singly protonated internal fragments de-

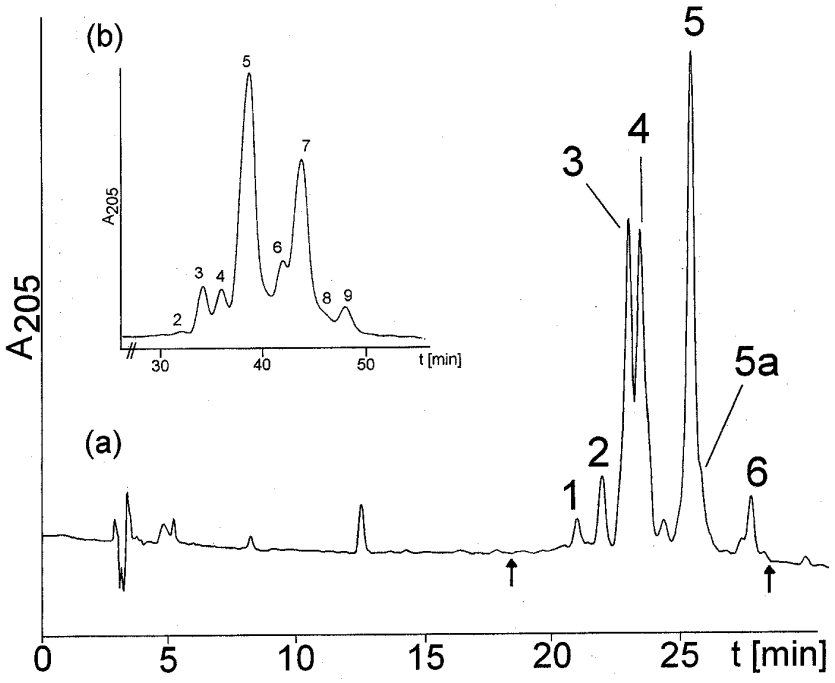


Fig. 1. (a) HPLC of trichotoxin A-40 peptides on Superspher (for chromatographic conditions see Experimental); arrows indicate elution time and sum of peak areas taken as 100%; (b) original elution profile of TT A-40 on a Nucleosil column shown for comparison (mirror image of Fig. 3C in Ref. [13]). Note that numbering of peaks is different for peptides eluting from (a) Superspher (used in this study) and (b) Nucleosil.

rived from Pro and, therefore, are marked y'_P (prime refers to single protonation, P to positive-ion mode). MS–MS of $(M)^-$ in negative-ion mode also formed the y series, but product ions were not protonated and, therefore, designated y_N (N refers to negative-ion mode).

The pseudomolecular ions $(M+H)^+$ and $(M+Na)^+$ as well as a series of characteristic fragment ions of the b_4–b_{17} acylium series were obtained using on-line HPLC–ESI-MS in the positive mode, and MS^n of $(M+H)^+$ of each compound. Adducts of molecular ions and diagnostic mass fragments of TT A-40 peptides are presented in Table 1.

The C-terminal sequences of the peptides were determined by MS–MS of the internal y'_{6P} fragments. These characteristic fragment-ions were formed as a result of the particular lability of Aib–Pro bonds [3–6,35]. For the C-terminal internal peptides y'_{6P} the lowest masses detectable by MS–MS were at m/z 211. This is in agreement with positions Pro^{13}–Leu^{14}. The sequence of this dipeptide, after methanolysis, was also determined as TFA–Pro–Leu–OMe by GC–MS and comparison with synthetic Pro–Leu [TFA–Pro–Leu–OMe; m/z (%) 166 (100), 86 (23), 279 (12), 194 (7)].

For ESI-MS in the negative ionization mode aqueous ammonia was added to the eluent before entering the MS interface in order to increase ionization of peptides. The adducts of $(M+TFA)^-$ (TFA from eluent) were most abundant under conditions of negative ionization. Adjusting the octapole region ion source collision induced energy at 35% (corresponding to +35 V d.c. of octapole offset voltage) resulted in displacement of TFA and formation of increasing amounts of $(M)^-$ ions. MS–MS of $(M)^-$ generated the y_{12N}–y_{17N} fragment-ion series, as well as the deacetylated molecular ion $(M-Ac)^-$ and established the sequences of the acetylated N-termini.

Applying these two ionization modes, together

with on-line HPLC–ESI-MS, made possible the assignment of AA positions Aib^{1}–Gln^{6} (negative ionization mode) and positions Aib^{5}–Glu^{17} (positive ionization mode) of three major and three minor peptides. For determination of C-terminal $Valol^{18}$ see below.

The nominal mass fragments and molecular ions of all peptides discussed in the following are compiled in Table 1 and the structures deduced therefrom are presented in Fig. 2.

As can be seen from the HPLC of TT A-40 (Fig. 1), peak 5 represents a major peptide of the TT A-40 mixture. Its structure was not determined in previous investigations. Therefore, on-line HPLC–ESI-MS and sequencing is demonstrated in detail with TT A-40/5 and the closely eluting minor component TT A-40/5a (Fig. 3a–d).

The positive ion ESI-MS of TT A-40/5 shows an intensive pseudomolecular ion $(M+H)^{+}$ at m/z 1719.1 and $(M+2H)^{2+}$ at m/z 860 of lower abundance (see Fig. 3a and insert upper left). In contrast, negative-ionization ESI-MS provided the molecular ion $(M)^{-}$ at m/z 1718.2 (Fig. 3a, insert upper right). Note that spectra shown in inserts were recorded in ZoomScan, i.e., a high-resolution MS scan mode. Further, an intensive acylium ion of the b_{12} series at m/z 1092 and the internal fragment y'_{6P} at m/z 627 are obtained as a result of the particularly labile Aib^{12}–Pro^{13} bond. Notably, this characteristic cleavage [6] was not observed in the negative ionization mode. Positive-ion MS–MS of $(M+H)^{+}$ generated the b_7–b_{12} acylium-ion series, as well as b_{16} and b_{17}, and established AA positions Aib^{8} to Aib^{12} and C-terminal Glu^{17}–$Valol^{18}$ of TT A-40/5 (Fig. 3b). Further, MS^{3} of the b_{12} fragment ion made possible determination of AA positions Aib^{5}–Aib^{12} (Fig. 3c). Negative-ion MS–MS of $(M)^{-}$ at m/z 1718 provided the y_{12N}–y_{17N} series of fragment ions, thus establishing sequence positions Aib^{1}–Gln^{6} of AA (Fig. 3d). Loss of NH_3 from y_{13N} lead to a fragment ion at m/z 1235 and also proved presence of Gln in position 6 of TT A-40/5. Negative-ion MS–MS furnished also the deacetylated molecular ion $(M-Ac)^{-}$ at m/z 1675, thus ascertaining Ac–Aib as N-terminal AA in TT A-40/5. It is assumed that an azaradinolate anion is formed accompanied by release of the acetylium ion. Formation of azaradinon fragments has been reported for positive-ion MS of peptaibols trichocellins [36]. The $(M-H_2O)^{-}$ at m/z 1700 is attributed to loss of water from the enolized Ac–Aib N-terminus (see proposed structures in Fig. 3d).

The sequence of the C-terminal prolylhexapeptide Pro^{13}–$Valol^{18}$ was deduced from the positive ESI-MS–MS of the y'_{6P} fragment ion at m/z 627. The N-terminal Pro of this fragment is singly protonated and thus neutral. The positive charge of the fragment results from protonation of the C-terminal Valol (see Fig. 3e). The C-terminal position of Valol was deduced from the difference of 103 Da from y'_{6P} (m/z 627) and Pro^{13}–Glu^{17} (m/z 524). A series of internal fragment ions at m/z 395 (Pro^{13}–Iva^{16}), m/z 296 (Pro^{13}–Aib^{15}), and m/z 211 (Pro^{13}–Leu^{14}) were obtained (Fig. 3e). An overview is presented in Fig.

TT A-40	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	NMM	(%)
1	Ac	Aib	**Gly**	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	**Ala**	Ala	**Aib**	Aib	Pro	Leu	Aib	**Aib**	Glu	Valol	1690	2.1
2	Ac	Aib	**Gly**	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	**Aib**	Ala	**Ala**	Aib	Pro	Leu	Aib	**Aib**	Glu	Valol	1690	4.3
3 *	Ac	Aib	**Gly**	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	**Ala**	Ala	**Aib**	Aib	Pro	Leu	Aib	**D-Iva**	Glu	Valol	1704	22.9
4 *	Ac	Aib	**Gly**	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	**Aib**	Ala	**Aib**	Aib	Pro	Leu	Aib	**Aib**	Glu	Valol	1704	24.3
5	Ac	Aib	**Gly**	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	**Aib**	Ala	**Aib**	Aib	Pro	Leu	Aib	**D-Iva**	Glu	Valol	1718	31.7
5a *	Ac	Aib	**Ala**	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	**Aib**	Ala	**Aib**	Aib	Pro	Leu	Aib	**Aib**	Glu	Valol	1718	5.7

Fig. 2. Sequences of trichotoxins A-40/1–5a; exchanged AA positions in bold letters; NMM, nominal (i.e., monoisotopic) molecular mass; (%), relative amount of peptides in the natural microheterogeneous mixture; Valol and chiral amino acids are of the L-configuration with the exception of D(=*R*)-Iva; sequences denoted with an asterisk were reported previously, but not characterized by numbers [12].

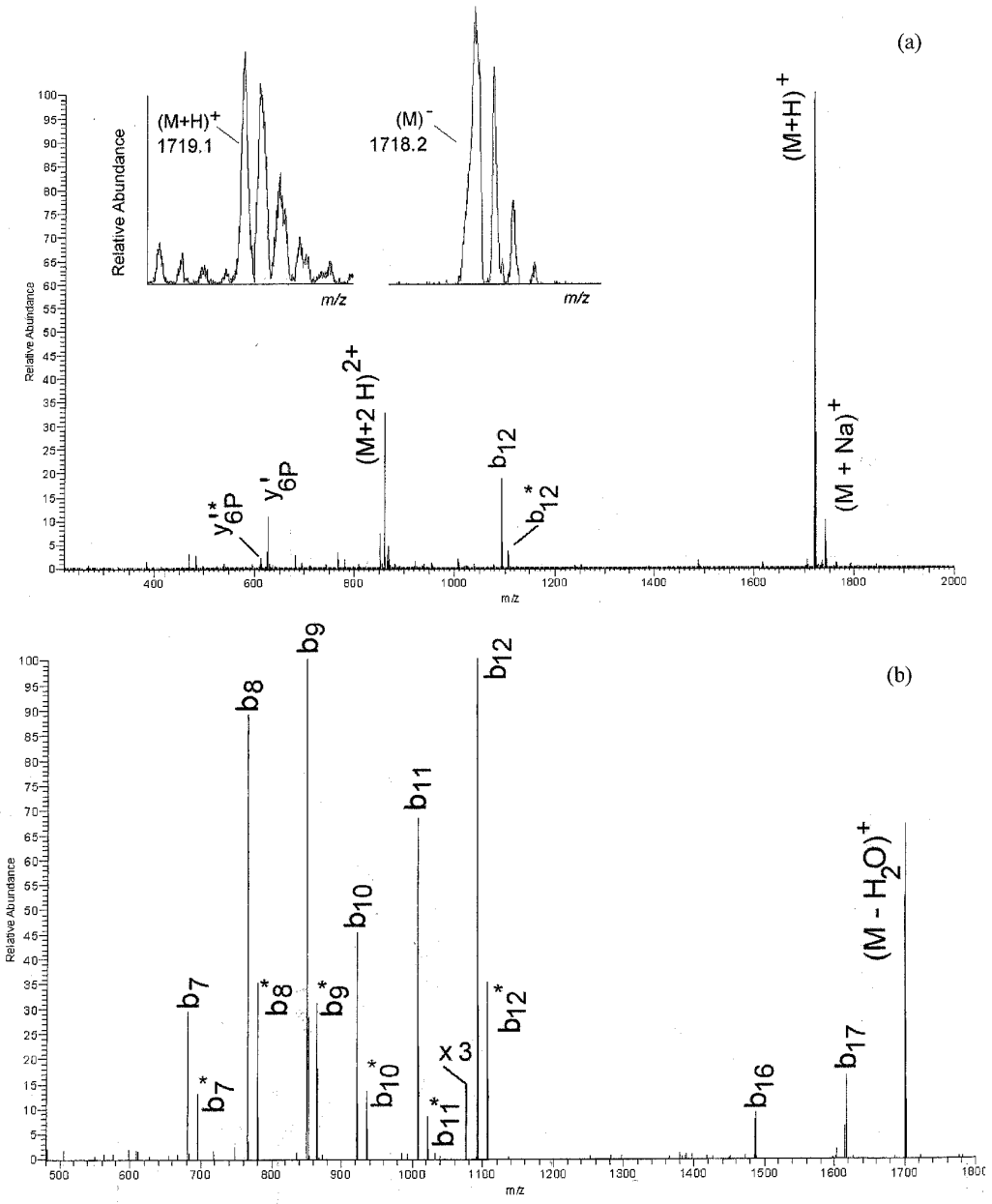


Fig. 3. On-line HPLC–ESI-MS of TT A-40/5; (a) positive-ion MS; insert upper left positive-ion ESI-MS of TT A40/5, insert upper right negative-ion ESI-MS of TT A40/5 (high resolution MS in inserts); (b) positive-ion ESI-MS–MS of $(M+H)^+$ (*m/z* 1719); (c) positive-ion ESI-MS^3 of b_{12} acylium ion (*m/z* 1092); (d) negative-ion ESI-MS–MS of $(M)^-$ (*m/z* 1718), inserts show proposed mechanisms for formation of y_N series and release of the acetyl group via azaradinolate anions (left), and the fragment resulting from loss of water via β-elimination from the enolized Ac–Aib bond of the $(M)^-$ precursor ion (right); (e) positive-ion ESI-MS–MS and fragmentation scheme of the y'_{6P} fragment (*m/z* 627). For chromatography and mass spectrometry see Experimental. For corresponding nominal molecular masses see Table 1. (*Continued on next page.*)

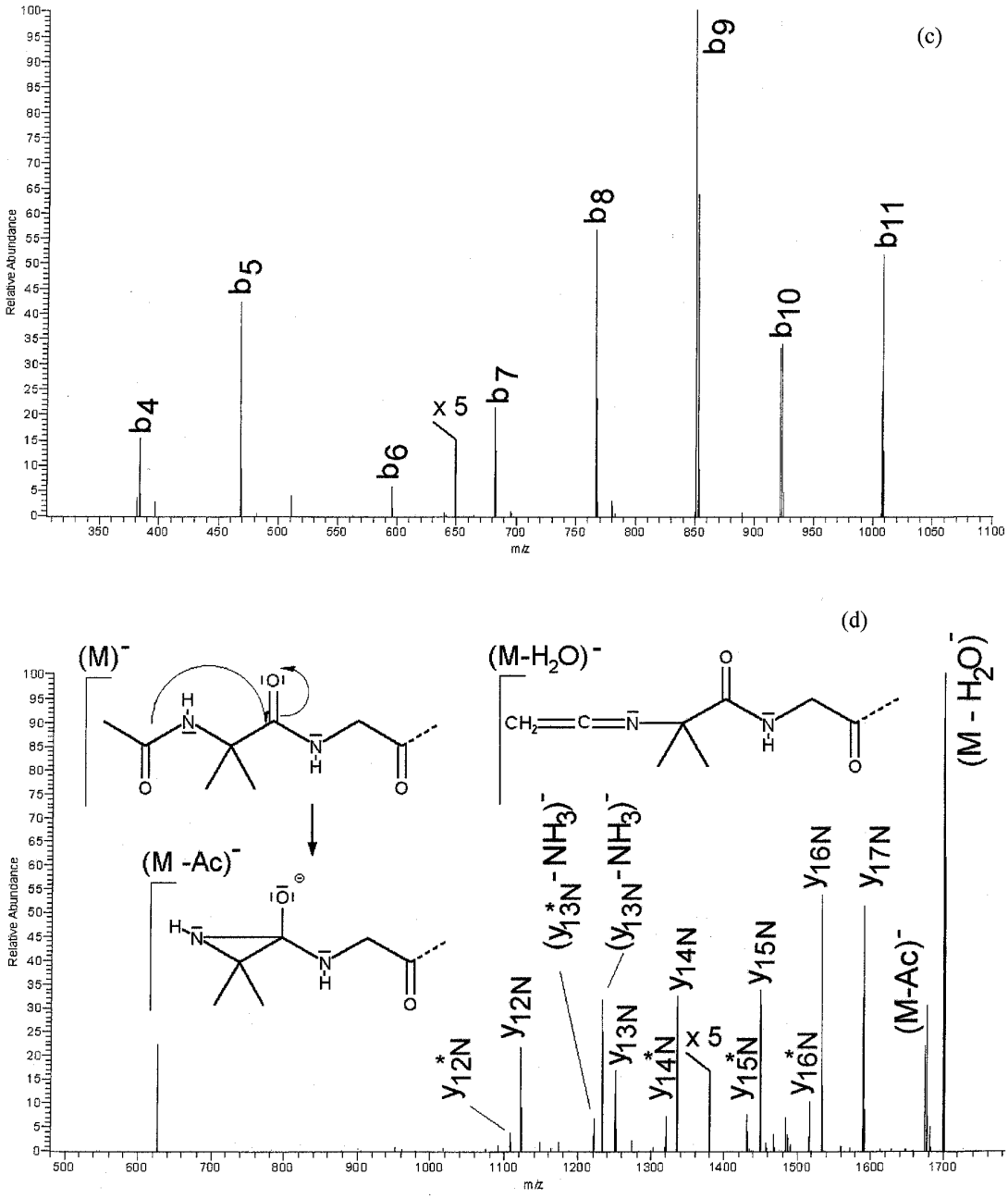


Fig. 3. (*continued*)

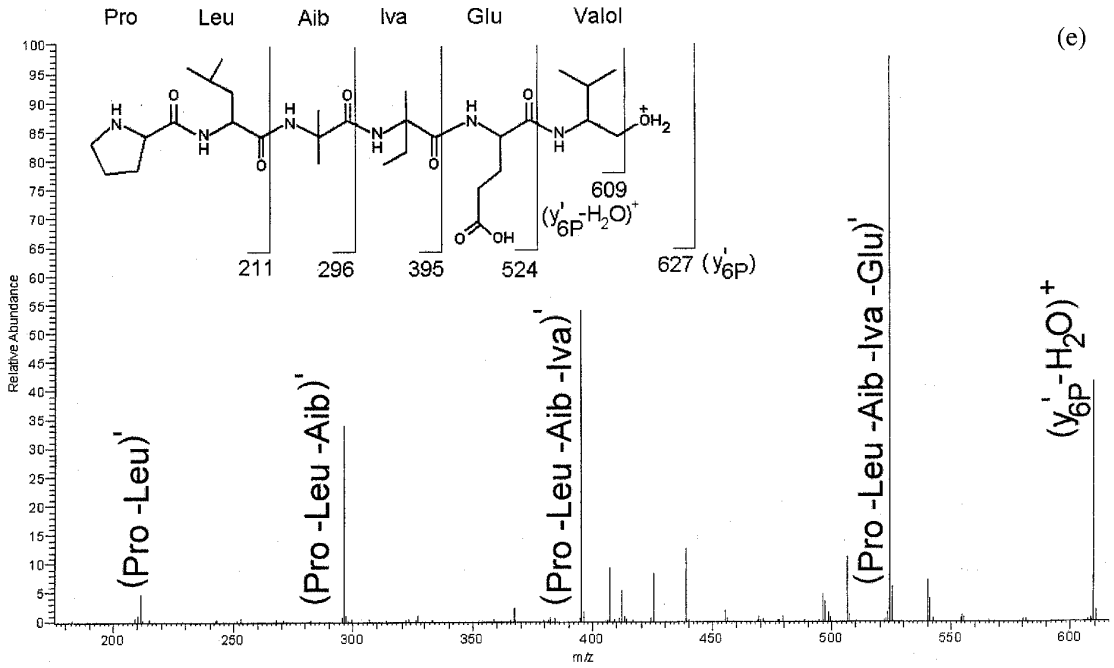


Fig. 3. (*continued*)

4 showing series of diagnostic ions and internal fragments in the positive and negative ionization mode used for the sequence determination of TT A-40/5. Analogously, the sequences of the other TT A-40 peptides presented in Fig. 2 were determined.

Inspection of the HPLC of the TT A-40 mixture (see Fig. 1a) shows a shoulder of peak 5 which is designated peak 5a. The on-line ESI-MS–MS taken from this peak shows a series of satellite acylium fragment-ions of low abundance, distinguished by an asterisk, and designated b^*_{12} and y'^*_{6P} in Fig. 3a, and b^*_7–b^*_{12} in Fig. 3b. Their mass differences to the abundant b_7–b_{12} series count for 14 u, thus suggesting AA exchange and presence of a peptide eluting almost together with the major peptide. Indeed, the exchange of Gly^2 of the major peptide by an Ala residue in the minor component was deduced from the negative ion ESI-MS–MS of the molecular ion $(M)^-$ resulting in formation of y_{16N} at m/z 1533 for peak 5, and y_{16N} at m/z 1519 for peak 5a.

The sequence of the corresponding C-terminal prolylpeptide of peak 5a was deduced from the y'_{6P} fragment at m/z 613.

Amounts of ca. 10% of this minor peptide (here designated TT A-40/5a) were estimated previously [5]. In this study relative amount of 5.7% were calculated from the intensity of the minor b^*_{12} fragment ion relative to b_{12} of TT A40/5 (see Fig. 3b).

The sequences of two minor peptides (peak 1 and 2 of HPLC, Fig. 1a) could be deduced directly from the b_5–b_{17} series of acylium ions in the positive ion mode, and from the y_{12N}–y_{17N} series in the negative ion mode, together with the internal fragments of the C-terminal prolylpeptide at m/z 613 as demonstrated above. These peptides were designated TT A-40/1 and TT A-40/2, respectively, and differ by an exchange of Ala^9/Aib^9. These minor sequences, counting for 2% and 4% of the TT A-40 peptides, were not yet known.

The sequence of peak 3 (designated TT A-40/3) could be deduced analogously from the b, y'_P and

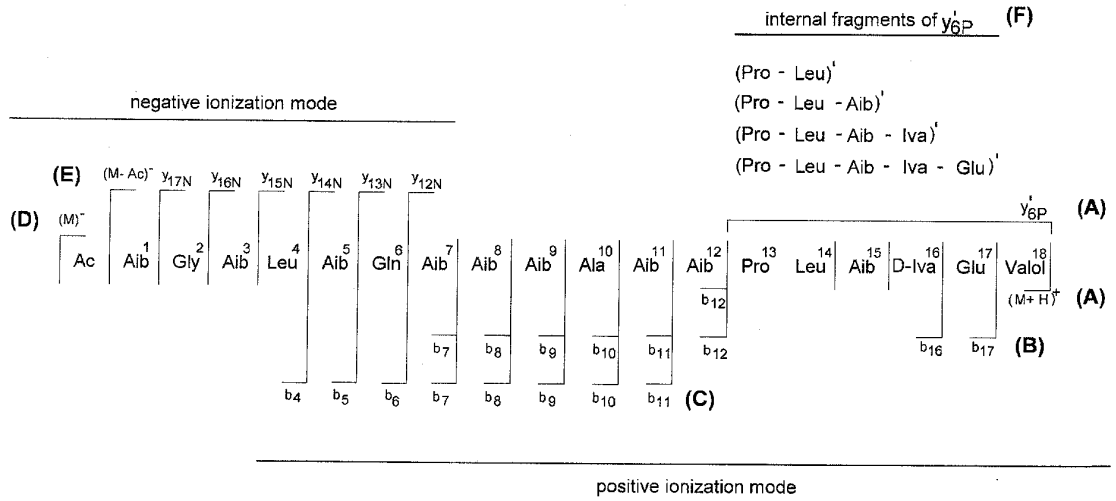


Fig. 4. Overview of sequencing, exemplified with TT A-40/5, using ESI-MS^n in positive- and negative-ionization mode. Mass fragments were generated by (A) positive-ion ESI-MS; (B) MS–MS of $(M+H)^+$; (C) MS^3 of b_{12}; (D) negative-ion ESI-MS; (E) MS–MS of $(M)^-$; (F) MS–MS of internal fragment y'_{6P}. Dipeptide Pro^{13}–Leu^{14} was also identified via GC–MS of a TT A-40 methanolysate [9].

y_N-series of fragment ions (see Table 1). The sequence of this peptide was reported previously [5] and thus is confirmed by the hyphenated technique described here.

The sequence of peak 4 (designated TT A-40/4) was also deduced from the fragment and molecular ions which are presented in Table 1. This peptide is distinguished from TT A-40/3 by an exchange of Aib^{16}/D-Iva^{16}. This also confirms a sequence reported previously [5].

Peak 6 of the chromatogram presented in Fig. 1a shows two closely eluting compounds. ESI-MS of the highest peak in this group revealed that actually two peptides at m/z 1719 and 1733 were eluting together. On-line sequencing of this group of peptides was ambiguous according to low abundances and interfering fragment ions. On-line sequencing of these minor peptides (altogether counting for approx. 3.8%) might be possible by use of a stationary phase of different selectivity as shown recently for trichovirins [10].

4. Conclusions

On-line HPLC–ESI-MS^n in the positive- and negative-ionization mode enables the fast and reliable sequence determination of peptaibol antibiotics. Ionization and fragmentation of peptaibols under these conditions show some characteristics in comparison to common peptides. From a structural point of view such peculiarities are also observed for the crystal state structures of Aib-peptides and peptaibols [37,38]. In some cases peptides which are not, or incomplete separated, can be sequenced. If isomeric AA Val/Iva and Leu/Ile occur in peptides, complementary methods such as methanolysis of peptides and assignment of characteristic dipeptides released have to be applied [10,35]. HPLC analysis of microheterogeneous mixtures of neutral and acidic peptaibols due to Gln/Glu exchange might require the use of an acidic eluent. Otherwise Glu containing peptides might be not detected.

Further, use of a stationary phase exerting different selectivity towards peptides in comparison to common octadecylsilyl columns might be of advantage for on-line sequencing of peptaibols. Such a phase, for example, is fluorocarbon-coated silica, as recently demonstrated with paracelsins [39] and the sequencing of trichovirins [10] and antiamoebins [40].

As for other peptaibols, the HPLC elution profile

("fingerprint") together with relative amounts of peptaibols in heterogeneous mixtures should be reported. This is required in order to judge the relevance of structural variations of individual peptides in particular when bioactivities are discussed. For example, compound Nos. 3, 4 and 5 in the mixture of TT A-40 represent 84% of the peptides.

Acknowledgements

One of us (H.B.) is very grateful to Professor Günther Jung, University of Tübingen, in whose laboratory many years ago the interest in peptaibols developed.

References

[1] C.T. Hou, A. Ciegler, C.W. Hesseltine, Appl. Microbiol. 23 (1972) 183.
[2] G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim, G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 507 (1978) 470.
[3] H. Brückner, W.A. König, M. Greiner, G. Jung, Angew. Chem. 91 (1979) 508.
[4] H. Brückner, W.A. König, M. Greiner, G. Jung, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18 (1979) 476.
[5] H. Brückner, W.A. König, M. Aydin, G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 827 (1985) 51.
[6] M. Przybylski, I. Dietrich, I. Manz, H. Brückner, Biomed. Mass Spectrom. 11 (1984) 569.
[7] R.C. Pandey, J.C. Cook, K.L. Rinehart, J. Am. Chem. Soc. 99 (1977) 5205.
[8] E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, G.M. Bonora, Proc. Natl. Acad. Sci. 79 (1982) 795.
[9] H. Brückner, H. Graf, Experientia 39 (1983) 528.
[10] A. Jaworski, J. Kirschbaum, H. Brückner, J. Peptide Sci. 5 (1999) 347.
[11] M. Aydin, D.H. Bloss, W.A. König, H. Brückner, G. Jung, Biomed. Mass Spectrom. 9 (1982) 39.
[12] W.A. König, H. Krohn, M. Greiner, H. Brückner, G. Jung, in: A. Quayle (Ed.), Adv. Mass Spectrometry, Vol. 8, Heyden, London, 1980, pp. 1109–1115.
[13] H. Brückner, M. Przybylski, J. Chromatogr. 296 (1984) 263.
[14] D. Solfrizzo, C. Altomare, A. Visconti, A. Bottalico, G. Perrone, Natural Toxins 2 (1994) 360.
[15] H. Brückner, C. Reinecke, J. High Resolut. Chromatogr. 12 (1989) 113.
[16] H. Brückner, K. Nuber, C. Reinecke, Fresenius Z. Anal. Chem. 333 (1989) 777.
[17] H. Brückner, M. Przybylski, Chromatographia 19 (1984) 188.
[18] K.J. Dornberger, W. Ihn, M. Ritzau, U. Gräfe, B. Schlegel, W.F. Fleck, J. Antibiotics 48 (1995) 977.
[19] R.E. Kohls, R.E. Bradley, J. Parasitol. 56 (1970) 615.
[20] J. Weiser, V. Matha, Z. Zizka, A. Jegorov, Cytobiosis 69 (1992) 179.
[21] V. Matha, A. Jegorov, M. Kiess, H. Brückner, Tissue Cell 24 (1992) 559.
[22] G. Irmscher, G. Jung, Eur. J. Biochem. 80 (1977) 165.
[23] T. Chikanishi, K. Hasumi, T. Harada, N. Kawasaki, A. Endo, J. Antibiotics 50 (1997) 105.
[24] M. Ritzau, S. Heinze, K.J. Dornberger, A. Berg, W. Fleck, B. Schlegel, A. Härtel, U. Gräfe, J. Antibiotics 50 (1997) 722.
[25] S. Gupta, S.B. Krasnoff, D.W. Roberts, J.A.A. Renwick, L.S. Brinen, J. Clardy, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 707.
[26] G. Boheim, G. Irmscher, G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 507 (1987) 485.
[27] M.S.P. Sansom, Quart. Rev. Biophys. 26 (1993) 365.
[28] M. Lucaciu, S. Rebuffat, C. Goulard, H. Duclohier, G. Molle, B. Bodo, Biochim. Biophys. Acta 1323 (1997) 85.
[29] H. Duclohier, C.F. Snook, B.A. Wallace, Biochim. Biophys. Acta 1415 (1998) 225.
[30] I. Karle, M.A. Perozzo, V.K. Mishra, P. Balaram, Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (1998) 5501.
[31] H. Brückner, I. Bosch, T. Graser, P. Fürst, J. Chromatogr. 386 (1987) 251.
[32] H. Brückner, I. Bosch, T. Graser, P. Fürst, J. Chromatogr. 395 (1987) 569.
[33] P. Roepstorff, J. Fohlmann, Biomed. Mass Spectrom. 11 (1984) 601.
[34] K. Biemann, Annu. Rev. Biochem. 61 (1992) 977.
[35] D. Becker, M. Kiess, H. Brückner, Liebigs Ann./Recueil, (1997) 767.
[36] M. Kanai, A. Iida, Y. Nagaoka, S. Wada, T. Fujita, J. Mass Spectrom. 31 (1996) 177.
[37] A. Aubry, D. Bayeul, H. Brückner, N. Schiemann, E. Benedetti, J. Peptide Sci. 4 (1998) 502.
[38] R. Gessmann, P. Benos, H. Brückner, M. Kokkinidis, J. Peptide Sci. 5 (1999) 83.
[39] A. Jaworski, H. Brückner, A. Maisch, GIT Fachz. Labor. 18 (1998) 86.
[40] A. Jaworski, H. Brückner, J. Peptide Sci. (1999) in press.

Journal of Peptide Science
J. Peptide Sci. **00**: 00–00 (1999)

Korrekturfahne

New Sequences and New Fungal Producers of Peptaibol Antibiotics Antiamoebins

ANDREAS JAWORSKI and HANS BRÜCKNER*

Department of Food Sciences, Institute of Nutritional Science, University of Giessen, Giessen, Germany

Received 31 August 1999
Accepted 7 September 1999

Abstract: Mixtures of the microheterogeneous 16-mer peptaibol antibiotics called antiamoebins (AAM) have been isolated from the culture broths of strains of the filamentous fungi *Stilbella erythrocephala* ATCC 28144, *Stilbella fimetaria* CBS 548.84 and *Gliocladium catenulatum* CBS 511.66. Sequences were determined using on-line HPLC together with positive- and negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. Some characteristic features are recognized in the mass spectrometric fragmentation pattern of AAM. From a sample originally used for sequencing AAM (from Hindustan Antibiotics, Ltd., Pimpri, Poona-411018, India), and a sample of AAM commercially available (from Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) HPLC elution profiles and sequences were assigned. Further, sequences of AAM previously isolated from *Emericellopsis synnematicola* CBS 176.60 and *Emericellopsis salmosynnemata* CBS 382.62 were determined. The peptide designated AAM I was the most abundant in all isolates and its structure could be confirmed. AAM II was detectable as a minor component (1.9%) only in the original sample of AAM, but not in the other isolates. The structures of AAM III, IV and V, which had previously been partly assigned, were definitely established, and the new sequences AAM VI–XVI were elucidated. AAM showing Phe^1/Leu^1 or Phe^1/Val^1 exchange, respectively, are produced in amounts only by *S. erythrocephala*. Sequences, HPLC elution profiles ('fingerprints') and relative amounts of peptides of all isolates were correlated. Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: electrospray ionization mass spectrometry; sequence analysis; peptide antibiotics; microheterogeneous peptides; α-aminoisobutyric acid (Aib); D-isovaline (Iva)

INTRODUCTION

The peptide antibiotic antiamoebin was reported to be produced by the filamentous fungi *Emericellopsis poonensis* Thirumalachar, *Emericellopsis synnematicola* Mathur and Thirumalachar and *Cephalosporium pimprina* Thirumalachar [1]. It was realized that this peptide contains, among other amino acids (AA), a high proportion of the non-protein AA α-aminoisobutyric acid (Aib) as well as the amino alcohol Pheol. A proposed cyclic structure [2] was revised using mainly GC-MS and GC-HREIMS, and sequences were reported for a major and a minor component named antiamoebin (AAM) I and II, accounting for 98 and 2%, respectively [3,4]. Based on these structures for peptides containing Aib and a *C*-terminal Pheol the name 'pep-

Abbreviations: AAA, amino acid analysis; AA, amino acid(s); AAM, antiamoebin(s); Ac, acetyl; Aib, α-aminoisobutyric acid, $H_2NCH(CH_3)_2COOH$; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelkultures; DCM, dichlormethane; ESI, electrospray ionization; FAB, fast atom bombardment; GC, gas chromatography; HPLC, reversed phase high-performance liquid chromatography; HREIMS, high resolution electron impact mass spectrometry; Hyp, *trans*-4-hydroxy-L-proline; Iva, D-isovaline, $H_2NC(CH_3)(C_2H_5)COOH$; MeCN, acetonitrile; MeOH, methanol; MPLC, medium pressure liquid chromatography; MS, mass spectrometry; MS-MS, tandem mass spectrometry; Pheol, phenylalaninol, $H_2NCH(CH_2C_6H_5)CH_2OH$; SIM, selected ion monitoring; TCM, trichloromethane; TDM (reagent), chlorine/4,4'-bis(dimethylamino)diphenylmethane; TFA, trifluoroacetic acid; TFAA, trifluoroacetic acid anhydride; TLC, thin-layer chromatography; u, mass units; common AA are abbreviated according to three-letter nomenclature.

* Correspondence to: Department of Food Sciences, Institute of Nutritional Science, Justus-Liebig-University of Giessen, Südanlage 6, 35390 Giessen, Germany. E-mail: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.
CCC 1075-2617/99/000000-00$17.50

taibophols' [3], or, 'peptaibols', was proposed and is now generally accepted. A positive-ion FAB-MS and sequence assignment of a peptide named AAM III were reported [5], without presenting details on relative amounts or isolation procedures of the peptide. AAM III was reported to differ from AAM I by replacing Iva^5/Aib^5, and Gln^{11}/Glu^{11} (for sequences of all AAM peptides discussed in the following see Figure 2). The latter exchange, however, is neither supported by the mass differences reported in [5], nor by our data presented here. Thus, the Gln^{11}/Glu^{11} exchange is assumed to be a printing error and this exchange is not taken into consideration in this paper. Further, investigation by on-line LC-FAB-MS of a trifluoroacetic acid (TFA) partial hydrolysate of AAM I, resulting in a mixture of tetra- and nonapeptides, revealed at least three other AAM to be present, although initially the AAM I sample was assumed to be pure [6]. These three peptides (named AAM III, IV, and V) differ from AAM I by an exchange of Iva^5/Aib^5 (AAM III; corresponding to the structure reported in [5]), Aib^4/Ala^4 (AAM IV), or Gly^6/Ala^6 (AAM V). This work was carried out with original AAM supplied by Hindustan Antibiotics, Ltd, Pimpri, Poona-411018, India. A series of sequence ions for AAM III–V were obtained, however, only for parts of the *N*-terminal sequences. No relative amounts of AAM III–V were reported [6]. Notably, the originally proposed configuration of L-Iva [3–5,7], another non-protein AA residue of AAM, was recognized as D-Iva [8,9]. This was also confirmed recently by X-ray analysis of AAM I [10].

It should be pointed out that sequencing of AAM and related peptaibols zervamicins and emerimicins [11], together with alamethicins [12], was pioneering work, demonstrating convincingly the suitability of mass spectrometric methods for the structure determination of peptaibol antibiotics.

AAM, as well as other peptaibols, attract much attention as a result of their broad range of bioactivities which include inhibition of bacteria, fungi, protozoa and helminths [1]. Broad spectrum anthelmintic activity, however, was not confirmed [13]. Further, insecticidal action on mosquito larvae was reported for AAM and related peptaibols (peptaibiotics) [14].

Notably, the hemolytic action of AAM on erythrocytes is weaker than those of 18-mer trichotoxins and 20-mers alamethicins and paracelsins [15,16]. Membrane channel forming properties and the uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria by AAM and the membrane modifying action of individual AAM isolated by HPLC from the natural mixture were recognized [17,18]. There is experimental evidence that AAM is capable of forming ion-gating pores in black bilayer membranes as well as having ion carrier properties [19]. Syntheses of segments of AAM [20–22] and their investigation by X-ray analysis [20,22] and NMR-spectroscopy [17,22] and use for secondary structure predictions [23,24], culminated in the chemo-enzymatic total synthesis of AAM I [25]. Recently pure AAM I, isolated by HPLC from the natural mixture, could be crystallized. Investigation by X-ray crystallographic analyses revealed the particular crystal structure of AAM I, representing a bent molecule, consisting of an *N*-terminal α-helical part, followed by a 3_{10} helix and ending in a series of *C*-terminal β-turns [10,26]. Helical structures (α, 3_{10}, or mixed) are characteristic of natural or synthetic peptides rich in sterically-constrained Aib [27–29]. This bent structure also results in the molecule having a lower dipole moment [10]. The particular structural features, together with the shorter chain length in comparison to 18- to 20-mer peptaibols, might explain the distinct behaviour in interacting with lipid bilayer membranes as well as the characteristic circular dichoism spectra of AAM [10,16].

Application of selective and sensitive screening procedures for peptaibol antibiotics [30–32] on *Stilbella erythrocephala* (Ditm.) Lindau, strain ATTC 28144, *Stilbella fimetaria* (Pers.) Lindau, strain CBS 548.84 [31,33,34], and *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abott, strain CBS 511.66 [35] had already revealed the production of peptaibols, which were assumed to be identical or closely related to AAM. The coprophilous fungus *S. erythrocephala*, which is considered as a synonym of *S. fimetaria* [36], had been reported to produce an antibiotic that causes significant inhibition of the growth of many other coprophilous fungi and dung bacteria [37].

In the following we describe the fermentation, isolation and purification of AAM from the culture broths of these fungi and the determination of their microheterogeneous sequences employing almost exclusively on-line LC-ESI-MS. Further, we determine new, and confirm known, sequences of AAM, correlate structures with HPLC elution profiles and determine relative amounts of peptides in the microheterogeneous mixtures.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

EXPERIMENTAL

Material and Methods

Solvents were of the gradient grade and were from Merck (Darmstadt, Germany). For amino acid analysis (AAA), an AA standard solution (no. AA-S-18) (Sigma, St. Louis, Mo, USA) was used and appropriate amounts of Aib (Sigma), DL-Iva (synthesized in our laboratory by the Strecker procedure), *trans*-4-hydroxy-L-Proline (Sigma) and L-Pheol (Sigma) were added. For TLC, pre-coated plates with silica gel 60 F 254, thickness 0.25 mm (Merck), were used. The mobile phase was TCM-MeOH 8/2 (v/v); ratios of solvent mixtures are by volume throughout text. Peptaibols were detected by spraying with water and, after drying, with TDM reagent. For column chromatography, Servachrom XAD-2 polystyrene adsorber resin, particle size 100–200 μm (Serva, Heidelberg, Germany), Sephadex LH-20, particle size 25–100 μm (Pharmacia, Freiburg, Germany) and LiChroprep RP-8, particle size 40–63 μm (Merck) were used.

For malt medium, 30 g malt extract (Serva) and 3 g soy peptone (Oxoid, Wesel, Germany) were dissolved in 1 l demineralized water (final pH 6–6.5). For preparing malt agar medium, 15 g agar (Fluka, Buchs, Switzerland) was added to the malt medium.

Sources of antiamoebins. An original AAM sample, probably isolated from *E. poonensis* ATCC 16411 [1], was from Hindustan Antibiotics. Reference AAM from Sigma (product no. A 8302, lot. 89F4011) was, according to the suppliers declaration, isolated from *E. synnematicola* ATCC 16540 [18]. Another sample of AAM (identical to peptide antibiotic Tü 165) was isolated from *E. synnematicola* CBS 382.62 [8,38]. AAM was also isolated in our laboratory from the culture broth of *E. synnematicola* CBS 176.60 [39]. Isolation of AAM from submers fermenter cultures of the moulds *S. erythrocephala* ATCC 28144, *S. fimetaria* CBS 548.84 and *G. catenulatum* CBS 511.66 is described below.

INSTRUMENTAL

Chromatography. For HPLC a HP 1100 instrument (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) comprising a binary pump, autosampler and HP ChemStation connected to an UV-detector of the same series was used. HPLC columns employed were: (I) Superspher® 100 RP-18, 250 mm × 4 mm i.d., 4 μm particle size (Merck); (II) Spherisorb ODS-2, 250 × 8 mm i.d. 3 μm particle size (Grom, Herrenberg, Germany).

Eluents for column (I): eluent A, MeOH/water/MeCN 1/1/1; eluent B, MeOH/MeCN 1/1; gradient program 0 min 0% B; 5 min 0% B, 15 min 30% B, 25 min 50% B, 35 min 100% B; flow-rate 0.8 ml/min; temperature 35°C; injected amounts 10 μl of a 0.1% methanolic solution of peptides. Eluents for column (II), used for the micropreparative isolation of peptides from *S. erythrocephala*: eluent A, MeOH/water/MeCN 39/22/39; eluent B, MeOH/MeCN 1/1; gradient program 0 min 0% B, 9 min. 0% B, 12 min. 5% B, 20 min. 15% B, 24 min. 15% B, 25 min. 30% B, 30 min. 70% B, 34 min. 70% B; flow rate 2.7 ml/min; temperature 40°C; injected amounts 100 μl of a 0.1% methanolic solution of peptides.

For MPLC, an MD 80/100 pump, controller PS 1 (Labomatic, Sinsheim, Germany) and a Model FRAC-100 fraction collector (Pharmacia) were used.

Mass spectrometry. For ESI-MS an LCQ™ MS (ThermoQuest, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) was used. Peptaibols were analysed by on-line coupling of the HPLC instrument, equipped with column (I), and the LCQ instrument. The sheath gas was nitrogen (purity > 99.5%) from a nitrogen generator Model 75-72 (Whatman, Balston Inc., Haverhill, Mass., USA); collision gas was helium (Messer-Griesheim, Krefeld, Germany). Sequence analysis was carried by positive- and negative-ionization, recorded in the centroid mode, providing m/z values having an accuracy of one decimal. Values of Table 3 are round up or down, respectively. Conditions for positive (negative) ionization mode were: spray voltage 4.25 (4.25) kV, heated capillary temperature 200 (200)°C, capillary voltage +3 (−27) V, tube lens offset +55 (−60) V, maximum ion time 1000 ms. For automatic calibration a mixture of caffeine (m/z 195.1), the tetrapeptide Met-Arg-Phe-Ala (m/z 524.3) and the perfluoronated mass spectrometric standard Ultramark 1621 (m/z 1022.0, 1122.0, 1222.0, 1322.0, 1422.0, 1522.0, 1622.0, 1722.0, 1822.0, 1921.9) was used. In negative-ion mode aqueous 4 M ammonia was added to the HPLC eluate by a syringe pump at a flow rate of 5 μl/min.

The notation used for sequence determination in the positive-ion mode, refering to a, b and c acylium ions, is based on the suggestions of Roepstorff and Fohlman [40], modified by Biemann [41]. MS-MS in the negative-ion mode produced the y series without protonation (Jaworski A, Brückner H. Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, 1999, submitted) which is denoted y_N in the spectra.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Sequences of AAM peptides from *E. poonensis* ATCC 16411, *E. synnematicola* ATCC 16540 and *S. erythrocephala* ATCC 28144 were investigated by on-line HPLC ESI-MS in positive- and negative-ionization mode. The ions $(M+Na)^+$ and $(M)^-$ of compounds were chosen as precursor ions for MS-MS. The peptides produced by the other fungi investigated were identified by corresponding retention times in HPLC, identical pseudomolecular masses and characteristic fragmentation patterns resulting from labile AA–Hyp(Pro) bonds in positive-ion on-line HPLC-ESI-MS.

For chiral AAA the GC-MS instrument (A) used was a Shimadzu 17A/QP 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Chirasil-L-Val (*N*-propionyl-L-valine-*tert*-butylamide polysiloxane) quartz capillary column, 25 m × 0.25 mm i.d. (Chrompack, Middelburg, The Netherlands). For quantitative AAA and dipeptide analysis the GC-MS instrument (B) was a HP 6890 (Hewlett-Packard) with mass selective detector equipped with a Heliflex® AT-5 column (crosslinked 5% diphenyl–95% dimethyl siloxane), 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm (Alltech Associates, Deerfield, USA). EI mass spectra on instruments (A) and (B) were recorded at an ionization energy of 70 eV.

Fermentation Procedures for new Fungal Antiamoebin Producers

S. erythrocephala ATCC 28144, *S. fimetaria* CBS 548.84 and *G. catenulatum* CBS 511.66 were obtained as lyophilized cultures from the respective culture collections. The lyophilizates were suspended in sterile water (1.5 ml) and, after soaking for 15 min, transferred to Petri dishes (9.5 cm diameter) with malt-agar medium. After 12 days at 21°C intensive growth was observed. Agar discs (1 cm diameter) were used for the inoculation of 11 Erlenmeyer flasks (2-l) (24 Erlenmeyer flasks for *S. erythrocephala*) each containing 400 ml of malt-medium. The flasks were shaken at 100 rpm at room temperature (25°C). For *S. erythrocephala*, the fermentation procedure was carried out using a rotary shaker Model G 25 (New Brunswick, Edison, USA). For *S. fimetaria* and *G. catenulatum*, a Model SM-30A rotary shaker (Johanna Otto GmbH, Hechingen, Germany) was used. For daily monitoring of peptaibol production, aliquots (20 ml) of filtered culture broths were passed through Sep-Pak® C-18 cartridges (Waters, Milford, USA) and the peptides absorbed were eluted with MeOH. The eluates were evaporated to dryness and dissolved in MeOH (0.5 ml). Aliquots of 20 μl were investigated by TLC (see Material and Methods) and peptaibols visualized by spraying with water and, after drying, with TDM reagent. The R_f of AAM was 0.42; the internal standard peptaibol paracelsin [16] had an R_f of 0.13.

Isolation and Purification of Antiamoebins

After shaking for 13 days (*S. erythrocephala*), 5 days (*S. fimetaria*) or 3 days (*G. catenulatum*), intensive peptide production in the fermentation broths was detected by TLC. Culture broths were separated from mycelia by filtration under reduced pressure, and filtrates were pumped through a MPLC-column (38 cm × 3.7 cm) filled with XAD-2 resin. The resin was washed with water (1 l) and 40% MeOH (0.5 l). Then the adsorbed peptides were eluted with a linear gradient from 40 to 100% MeOH and fractions (20 ml) were collected. Elution of peptides was monitored by TLC. Fractions containing peptaibols were combined and evaporated to dryness yielding 4.63 g of a dark brown oil (*S. erythrocephala*), 0.88 g pale yellow powder (*S. fimetaria*) and 0.69 g pale yellow powder (*G. catenulatum*).

The peptidic raw material (4.63 g) produced by *S. erythrocephala* was treated with 1:1 TCM–MeOH (50 ml), filtered and evaporated to dryness. The remaining residue (3.15 g) was dissolved in MeOH (12 ml). Peptides were purified in two portions (6 ml each) by chromatography on a MPLC-column (36 cm × 2.0 cm) filled with LiChroprep RP-8 (40–63 μm particle size, Merck) using a linear gradient from 50 to 100% MeOH at a flow rate of 5 ml/min. Fractions (approx. 12 ml) were collected and the elution of peptides was monitored by TLC. Appropriate fractions were combined and evaporated to dryness, providing a total of 1.61 g of colourless crystalls. Microgram amounts of individual peptides were isolated by repetitive HPLC on column (II) (see Chromatography). Elution of peptides was detected at 205 nm and peptide fractions were collected manually. Semipreparative isolation of certain peptides from *S. erythrocephala* was carried out in order to separate and identify those peptides containing isomeric Val and Iva (see Table 2).

Further purification of the peptides isolated from *S. fimetaria* and *G. catenulatum* was carried out by chromatography on a Sephadex LH-20 column (100 cm × 3.1 cm) using MeOH as eluent. Peptides were dissolved in 10 ml MeOH and subjected to LH-20 chromatography in two portions of 5 ml each. Fractions were collected and elution of peptides was

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

monitored by TLC. The fractions containing peptaibols were combined and evaporated to dryness. Amounts of 0.80 g (from *S. fimetaria*), and 0.55 g (from *G. catenulatum*) of colourless peptides were obtained, which had already started to crystallize on evaporation.

Amino Acid Analysis by GC-SIM-MS

The microheterogeneous mixture of peptides (20–50 μg) and fractions of *S. erythrocephala*, obtained from semipreparative HPLC, were hydrolysed (6 M HCl, 110°C, 24 h). Chirality of AA and Pheol were determined after derivatization as *N*-pentafluoropropionyl-AA-(2)-propyl esters (*N*-acetyl 2-propyl esters for Iva) and *N*(*O*)-bis(pentafluoropropionyl)pheol by GC-SIM-MS on instrument (A) as previously described [42]. Stoichiometry of AA and Pheol were determined after derivatization as *N*-trifluoroacetyl-AA-*n*-butyl esters and *N*(*O*)-bis(trifluoroacetyl)pheol on instrument (B); the stoichiometry is normalized on Pheol (1.00) since this amino alcohol is not exchanged in AAM.

Dipeptide Analysis by GC-MS

For acidic methanolysis aliquots (ca. 30 μg) of peptides of *S. erythrocephala* containing Val and Iva in 4 M HCl in MeOH (200 μl) were heated for 6 h at 100°C. Reagents were removed in a nitrogen stream and the remaining methyl esters were trifluoroacetylated with TFAA (50 μl) in DCM (100 μl). After 15 min at 70°C reagents were removed in a stream of nitrogen and DCM (50 μl) was added. Dipeptide derivates of interest were analysed on GC instrument (B), and positions of isomeric AA assigned as previously described [42,43].

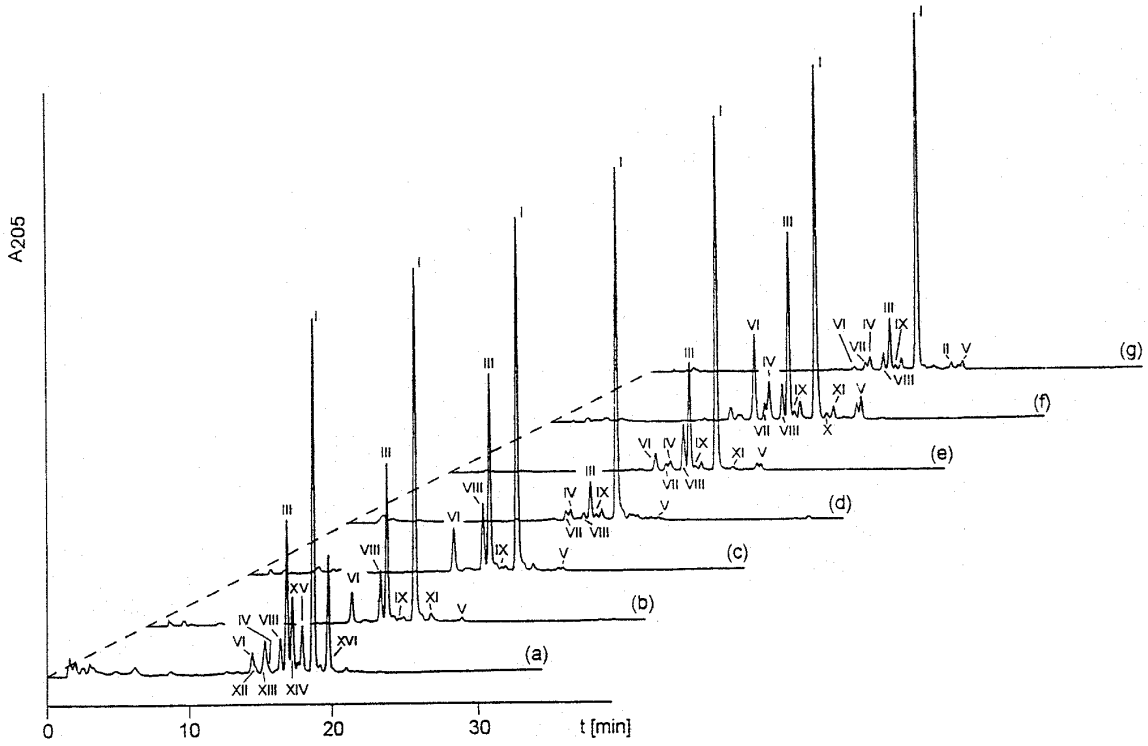


Figure 1 HPLC fingerprints of AAM isolates from (a) *S. erythrocephala* ATCC 28144; (b) *S. fimetaria* CBS 548.84; (c) *G. catenulatum* CBS 511.66; (d) *E. salmosynnemata* CBS 382.62; (e) *E. synnematicola* CBS 176.60 in comparison to (f) AAM from Sigma (isolated from *E. synnematicola* ATCC 16540) ans (g) AAM from Hindustan Antibiotics (isolated from *E. poonensis* ATCC 16411); the major peak in all chromatograms refers to AAM I; A_{205}, absorption at 205 nm; for chromatographic conditions see Experimental; for relative amounts see Table 1; for correlation of roman numbers of peptides and their sequences see Figure 2.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

AAM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	NMW
I*	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1670
II*	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Pro**	Aib	Pro	Pheol	1654
III*	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1656
IV*	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Ala**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1656
V*	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**D-Iva**	**Ala**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1684
VI	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**Aib**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1642
VII	Ac	**Phe**	**Ala**	**Aib**	**D-Iva**	**Aib**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1656
VIII	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**Aib**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1656
IX	Ac	**Phe**	**Aib**	**Ala**	**Aib**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1656
X	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**D-Iva**	Aib	Hyp	Gln	**Aib**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1670
XI	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Ala**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1670
XII	Ac	**Phe**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Gly**	Leu	**Ala**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1642
XIII	Ac	**Val**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1608
XIV	Ac	**Val**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Val**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1622
XV	Ac	**Leu**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1622
XVI	Ac	**Leu**	**Aib**	**Aib**	**Aib**	**D-Iva**	**Gly**	Leu	**Aib**	Aib	Hyp	Gln	**D-Iva**	**Hyp**	Aib	Pro	Pheol	1636

Figure 2 Sequences of AAM; exchanged positions in bold characters; NMW, nominal molecular weight; Pheol and chiral amino acids are of the L-configuration with the exception of D(= R)-Iva; Hyp refers to trans-4-hydroxy-L-proline; sequences of AAM I–V, denoted with an asterisk, were reported partly previously [3–6]; dipeptides used for the assignment of isomeric Val/Iva, generated by methanolysis [42], are underlined; for relative amounts of peptides in various isolates of AAM see Table 2.

Table 1 Relative Amounts (%) of AAM Peptides I–XVI in the Natural Microheterogeneous Mixtures Isolated from Fungi (a)–(g)

AAM	Fungal producers						
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
I*	37.4	52.9	48.9	70.2	60.2	41.6	70.4
II*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.9
III*	16.2	24.1	27.4	8.0	18.5	21.3	9.6
IV*	1.8	n.d.	n.d.	2.7	2.2	5.4	2.9
V*	n.d.	0.9	0.5	1.0	1.1	2.7	1.9
VI	2.6	5.6	6.9	n.d.	3.5	10.8	1.0
VII	n.d.	n.d.	n.d.	2.3	1.3	2.0	1.5
VIII	4.0	8.4	9.6	2.0	8.1	4.3	3.4
IX	n.d.	1.4	1.1	1.6.	0.9	1.0	1.0
X	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.9	n.d.
XI	n.d.	2.5	n.d.	n.d.	1.1	1.7	n.d.
XII	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIII	4.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIV	9.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XV	5.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XVI	13.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ	95.4	95.8	94.4	87.8	96.9	91.7	93.6

Fungal producers are (a) *S. erythrocephala* ATCC 28144; (b) *S. fimetaria* CBS 548.84; (c) *G. catenulatum* CBS 511.66; (d) *Emericellopsis salmosynnemata* CBS 382.62 (producer of antibiotic Tü 165); (e) *E. synnematicola* CBS 176.60; (f) *E. synnematicola* ATCC 16540 (producer of AAM supplied by Sigma); and (g) *E. poonensis* ATCC 16411 (producer of AAM supplied by Hindustan Antibiotics); n.d., not detected; asterisks indicate previously reported complete or partial sequences of (g) [3–6].

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Microheterogeneous Antiamoebins

Fermentation of *S. erythrocephala*, *S. fimetaria* and *G. catenulatum*, solid-phase extraction of peptides from the culture broths and purification of AAM by chromatographic methods followed the protocols which had been shown to be reliable and effective methods for the isolation other peptaibols [30,43]. These procedures provided several hundred milligrams of microheterogeneous peptide mixtures from individual fungi.

Previous investigations had suggested that the peptides produced are identical, or closely related, to AAM [34]. Therefore, the HPLC elution profiles of the isolated peptides were compared with reference AAM isolated from *E. salmosynnemata* CBS 382.62 [8] and *E. synnematicola* CBS 176.60 [39]. Further, commercially available AAM, isolated from *E. synnematicola* ATCC 16540 according to the suppliers declaration, and an original sample of AAM from *E. poonensis* ATCC 16411 [1] were investigated.

The HPLC fingerprints, taken under identical chromatographic conditions, are presented in Figure 1 and demonstrate the microheterogeneity (i.e. exchange of AA) of AAM. The microheterogeneity of AAM had been previously recognized [18] and is a characteristic of most peptaibols. The use of an analytical Supersphere® stationary phase, together with a mixture of MeCN, MeOH and water as eluent, made possible an excellent high performance resolution of the peptide mixtures. As can be seen, the established peptide denoted AAM I [3] is the most abundant, and AAM III [6] is the second most abundant in all isolates (for correlation of roman numbers and sequences cf. Figure 2; for relative amounts of peptides cf. Table 1). The peptide designated AAM II [4] is detectable in low amounts (ca. 2%) only in the original isolate of AAM (cf. Figures 1 and 3).

The chiral and non-chiral AAA of total hydrolysates of individual peptide mixtures provided the configuration and approximate ratios of AA and the amino alcohol in AAM (Table 2). Ratios are normalized on Pheol since the amino alcohol is not the subject of exchange in AAM. Ratios are odd for some AA as a result of microheterogeneities. Chiral AAA established the L-configuration of Pheol and chiral AAA, with the exception of D(= *R*) Iva as previously reported [8]. Hyp in AAM is present as *trans*-4-hydroxy-L-proline. Notably, all possible stereoisomers of 3- and 4-hydroxyproline are separable on Chirasil-L-Val [44].

AAA also made the assignment of the presence of Val or Leu and the absence of isomeric AA possible, these are not distinguishable under our routine conditions of ESI-MS as applied. Ile is not present in AAM, whereas Val was detectable only in AAM XIII and XIV produced by *S. erythrocephala*. Since D-Iva is also present in these peptides, methanolysis of Val containing fractions followed by trifluoroacetylation of the dipeptide methyl esters was carried out. The presence of exclusively Glu-Iva and Val-Aib in AAM XIII (Glu-Iva, Val-Aib, Val-Gly and Aib-Val in AAM XIV) was established by GC-MS of TFA-dipeptide methylesters on instrument (B) analogous with procedures previously described [42,43].

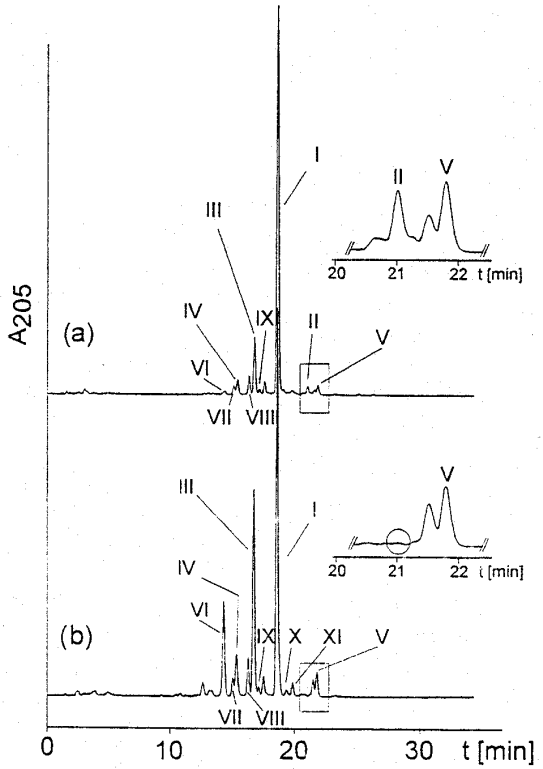


Figure 3 HPLC elution profile of antiamoebins (AAM) I–XI on Superspher®; AAM isolated from (a) *E. poonensis* ATCC 16411 (AAM from Hindustan Antibiotics); and (b) *E. synnematicola* ATCC 16540 (AAM from Sigma); inserts in (a) and (b) are expanded sections of regions framed in chromatograms, circle in (b) shows position at which AAM II should elute; A_{205}, absorption at 205 nm; for chromatographic conditions see Experimental.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2 Chirality of AA and Pheol and their Ratios in Total Hydrolysates of Microheterogeneous Antiamoebins Isolated from Fungi (a)–(g); Stoichiometry Determined as *N(O)*-trifluoroacetyl-*n*-butyl esters by GC-SIM-MS on GC Instrument (B)

AA	Fungal producers						
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
Aib	5.82	6.61	6.18	6.13	6.72	6.45	6.39
Gly	1.22	1.05	1.14	1.16	1.00	0.92	0.97
D-Iva	2.00	1.45	1.58	1.84	1.69	1.60	1.75
L-Leu	1.45	1.16	1.14	0.95	1.09	1.00	0.92
L-Pheol[1]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-Pro	1.26	1.07	1.09	1.10	1.00	1.11	0.87
L-Hyp[2]	2.00	2.02	2.06	2.31	1.89	2.18	2.17
L-Phe	0.63	0.91	0.90	0.91	0.96	0.93	0.93
L-Glu[3]	1.01	0.90	0.92	0.91	0.94	0.94	0.88
L-Ala	0.20	0.10	0.16	0.07	0.21	0.19	0.05
L-Val	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

For names of fungal producers (a)–(g) see Table 1; n.d., not detected (<0.05).
[1] Stoichiometry based on Pheol (1.00).
[2] *trans*-4-Hydroxy-L-proline.
[3] Gln, actually present in AAM, hydrolyses to Glu.

The AAA of micropreparatively-isolated peptides AAM XV and XVI show exchange of Phe[1]/Leu[1] (cf. Table 2), which was confirmed by LC-MS. These exchanges are detectable only in AAM isolated from *S. erythrocephala*.

The excellent separation by HPLC and the availability of reference peptides made the confirmation of known, or partly known, and determination of new sequences of AAM possible, using highly sensitive on-line LC-MS-MS as described in the following.

Sequence Determination of Antiamoebins

Expanded plots of the HPLC elution profiles of AAM peptides (cf. Figure 1) from an original isolate of AAM (from Hindustan Antibiotics) and from a commercially available sample (from Sigma) are shown in Figure 3(a and b), respectively. Using on-line HPLC ESI-MS in positive- or negative-ionization mode and selecting $(M+Na)^+$ or $(M)^-$ as precursor ions for MS-MS, the reported sequences [3,4] of AAM I and II could be confirmed, and sequences of AAM III-V could be completely and definitely established in the original isolate of AAM from Hindustan Antibiotics. As can be seen in the expanded sections of Figure 3(a and b), AAM II occurs only in the original isolate, but not in the commercially available AAM isolated from *E. synnematicola* ATCC 16540. The presence of AAM II in the original isolate, and its absence in all other isolates of AAM investigated, was also corroborated by LC-MS. Application of LC-MS also made the determination of six further peptides possible, designated AAM VI–XI in Figure 3(a and b) (as well as Figure 1). Investigation of all peptide isolates by LC-MS, together with their characterization as described above, made the correlation and assignment of HPLC elution profiles and sequences of AAM possible. Further, the production of (Leu[1])-AAM I and (Leu[1]) AAM III by *S. erythrocephala* was detected.

Corresponding nominal masses of adducts of molecular ions and generated ion fragments used for sequence determination are compiled in Table 3. Note that not all observed characteristic fragment ions are listed. The minor peaks not denoted in Figure 3, the sum of which account for differences of 100% in Table 1, are still mixtures of coeluting components. On-line sequencing of these compounds was ambiguous due to low abundances and interfering fragment ions. On-line sequencing of these minor peptides might be possible by using a stationary phase of different selectivity as shown recently for trichovirins [42].

The following sequencing of peptides exemplarily demonstrates the suitability and sensitivity of on-line LC-MS, with the hitherto unreported structure of AAM VI, isolated from the mould

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Table 3 Nominal Molecular Weights of Adducts of Molecular Ions and Diagnostic Fragment Ions of AAM I–XVI Deduced from ESI-MS; Values in *m/z*

Ions[a]	AAM															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
$(M+Na)^{+}$[b]	1693	1677	1679	1679	1707	1665	1679	1679	1679	1693	1693	1665	1631	1645	1645	1659
$(M+H)^{+}$[b]	1671	1655	1657	1657	1685	1643	1657	1657	1657	1671	1671	1642	1609	1623	1623	1637
$a^{\#}_{15}$[c]	1514	1498	1500	1500	1528	1486	1500	1500	1500	1514	1514	1486	1452	1466	1466	1480
$a^{\#}_{14}$[c]	1417	1401	1403	1403	1431	1389	1403	1403	1403	1417	1417	1398	1355	1369	1369	1383
$a^{\#}_{13}$[c]	1332	1316	1318	1318	n.d.	1304	1318	1318	1318	n.d.	n.d.	1304	1270	1284	n.d.	1298
$a^{\#}_{12}$[c]	1219	1219	1205	1205	1233	1191	1205	1205	1205	1219	1219	1191	1157	1171	1171	1185
$a^{\#}_{11}$[c]	1120	1120	1106	1106	1134	1106	1106	1120	1106	1134	1120	1092	1058	1072	1072	1086
$c^{\#}_{10}$[c]	1037	1037	1023	1023	1051	1023	1023	1037	1023	1051	1037	1009	975	989	989	1006
$a^{\#}_{9}$[c]	879	879	865	865	893	865	865	879	865	893	879	851	817	831	831	845
$a^{\#}_{8}$[c]	794	794	780	780	808	780	780	794	780	808	794	766	732	746	746	760
$a^{\#}_{7}$[c]	709	709	695	695	723	695	695	709	695	709	709	695	647	661	661	675
$a^{\#}_{6}$[c]	596	596	582	582	610	582	582	596	582	596	596	582	n.d.	548	n.d.	562
$a^{\#}_{5}$[c]	539	n.d.	525	n.d.	539	525	n.d.	539	525	n.d.	525	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	505
$(M)^{-}$[d]	1670	1654	1656	1656	1684	1642	1656	1656	1656	1670	1670	1642	1608	1622	1622	1636
$(M-Ac)^{-}$[e]	1627	1611	1613	1613	1641	1599	1613	1613	1613	1627	1627	1599	1565	1579	1579	1593
$y^{\#}_{15}$[c]	1480	1464	1466	1466	1494	1452	1466	1466	1466	1480	1480	1452	1466	1480	1466	1480
$y^{\#}_{14}$[c]	1395	1379	1381	1381	1409	1367	1395	1381	1381	1395	1395	1367	1381	1395	1381	1395
$y^{\#}_{13}$[c]	1310	1294	1296	1296	1324	1282	1310	1296	1310	1310	1310	1282	1296	1310	1296	1310
$y^{\#}_{12}$[c]	1225	1209	1211	1225	1239	1197	1211	1211	1225	1225	1225	1197	1211	1225	1211	1225
$y^{\#}_{11}$[c]	1126	1110	1126	1126	1140	1112	1126	1112	1126	1126	1140	1112	1126	1126	1126	1126
$y^{\#}_{10}$[c]	1069	1053	1069	1069	1069	1055	1069	1055	1069	1069	1069	1055	1069	1069	1069	1069
$y^{\#}_{9}$[c]	956	940	956	n.d.	n.d.	942	n.d.	942	n.d.	956	956	n.d.	956	956	956	956
$y^{\#}_{8}$[c]	871	n.d.	871	871	871	857	871	857	871	857	871	n.d.	n.d.	n.d.	871	871
$y^{\#}_{7}$[c]	786	770	786	786	786	772	786	772	786	772	786	786	786	786	786	786

[a] Notation of series *a*, *b*, *c* and *y* is based on the literature [40,41] (Jaworski and Brückner, submitted).

[b] Identified by positive-ion on-line ESI-MS

[c] Identified via MS-MS of $(M+Na)^{+}$

[d] Identified via negative-ion (N) on-line ESI-MS.

[e] Identified via MS-MS from $(M)^{-}$.

[#] Fragment ions are sodium adducts; n.d, not detected; masses of AA ($-H_2O$) are: Ala (71), Aib (85), Gln (128), Gly (57), Hyp/Leu (113), Iva/Val (99), Pro (97), Phe (147); amino alcohol Pheol (151); Ac (43). Sequences can be deduced from mass differences of ions. For a scheme of fragmentation see also Figure 5.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

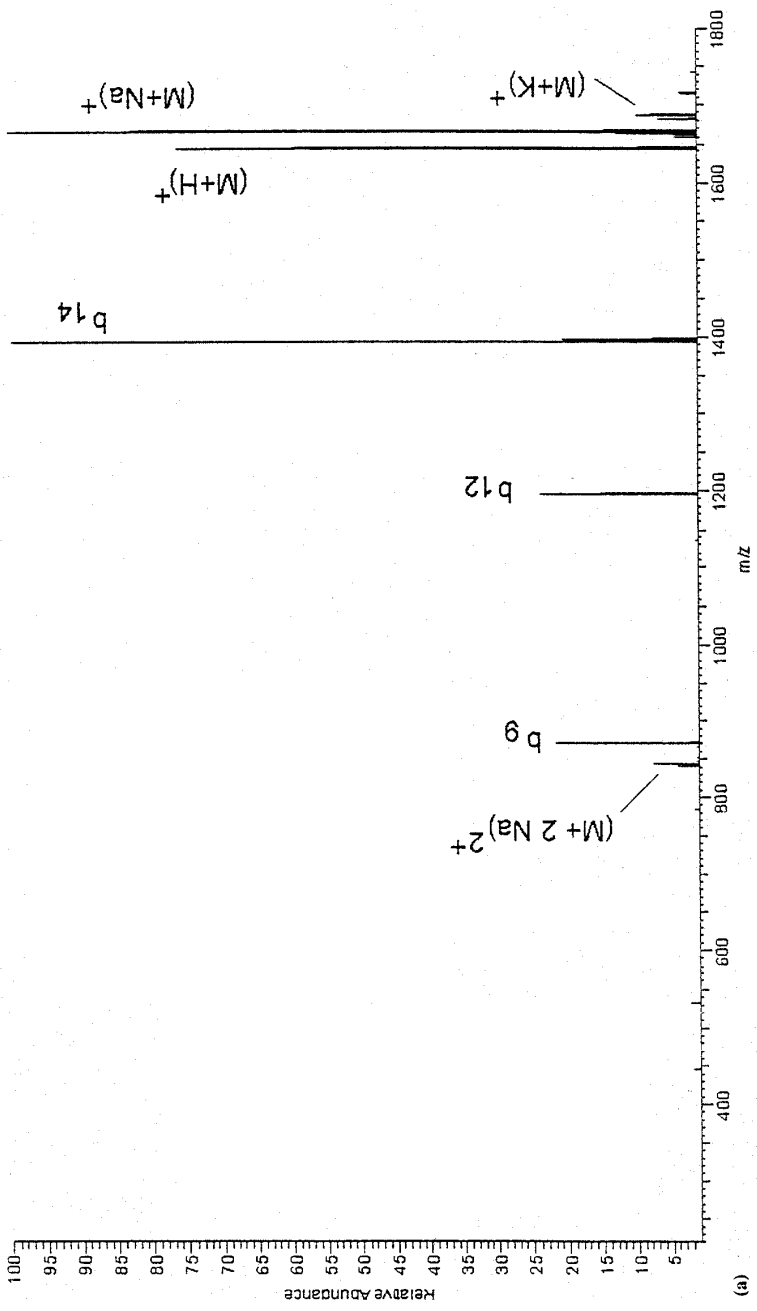


Figure 4 On-line HPLC-ESI-MS of (a)–(d) AAM VI (from AAM supplied by Sigma and isolated from *E. synnematicola* ATCC 16540); (a) positive-ion MS; (b), positiv-ion ESI-MS-MS of $(M + Na)^+$ (*m/z* 1665); note that a and *b* series are sodiated ions (marked #) resulting from precursor ion $(M + NA)^+$; (c) negative-ion MS; (d) negative-ion ESI-MS-MS of $(M)^-$ (*m/z* 1642) and, for comparison, (e) negative-ion ESI-MS-MS of $(M)^-$ (*m/z* 1636) of AAM XV (isolated from *S. erythrocehala* ATCC 28144) demonstrating the Phe[1]/Leu[1] exchange, Δ refers to mass differences establishing the exchange. For corresponding nominal molecular weights see Table 3, for chromatography and mass spectrometry see Materials and Methods.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

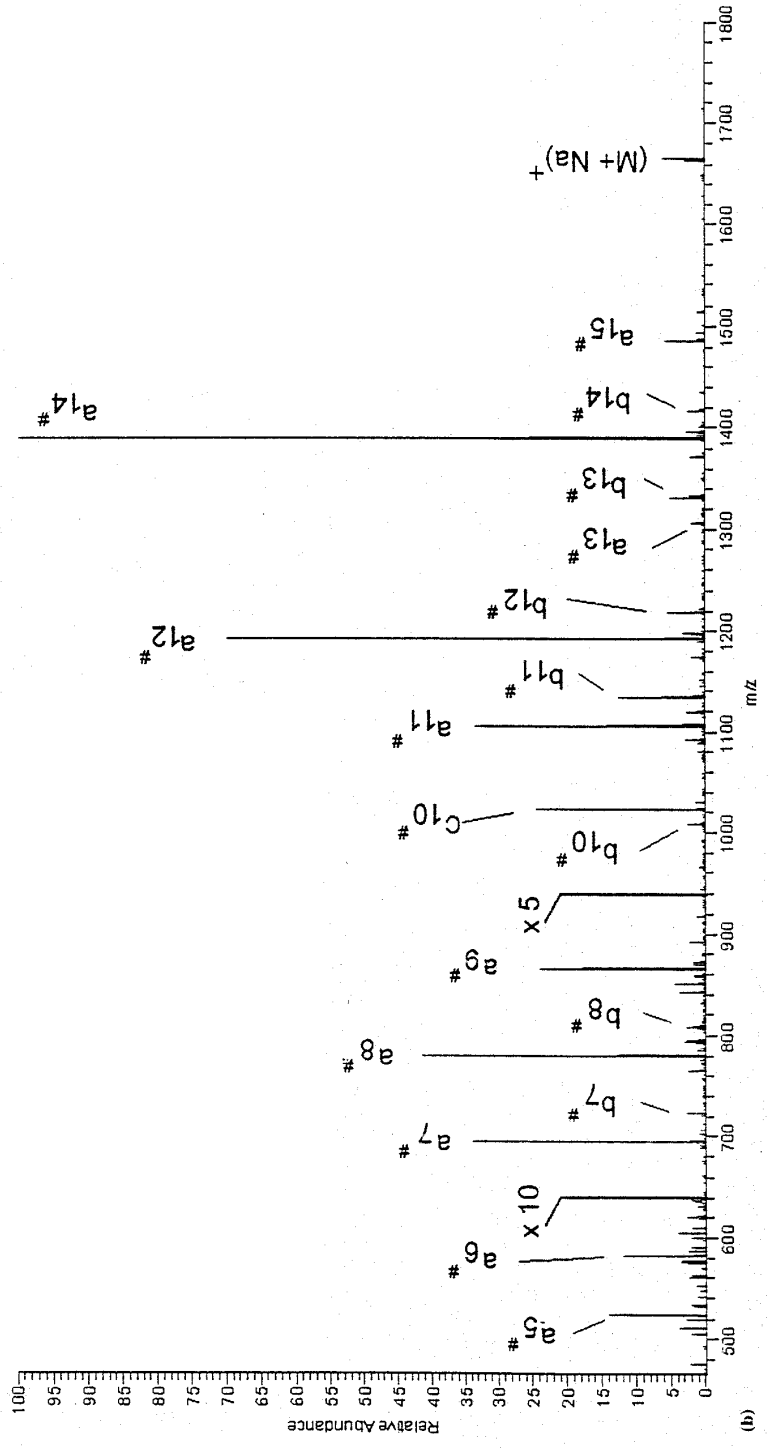


Figure 4 (*Continued*)

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons. Ltd.

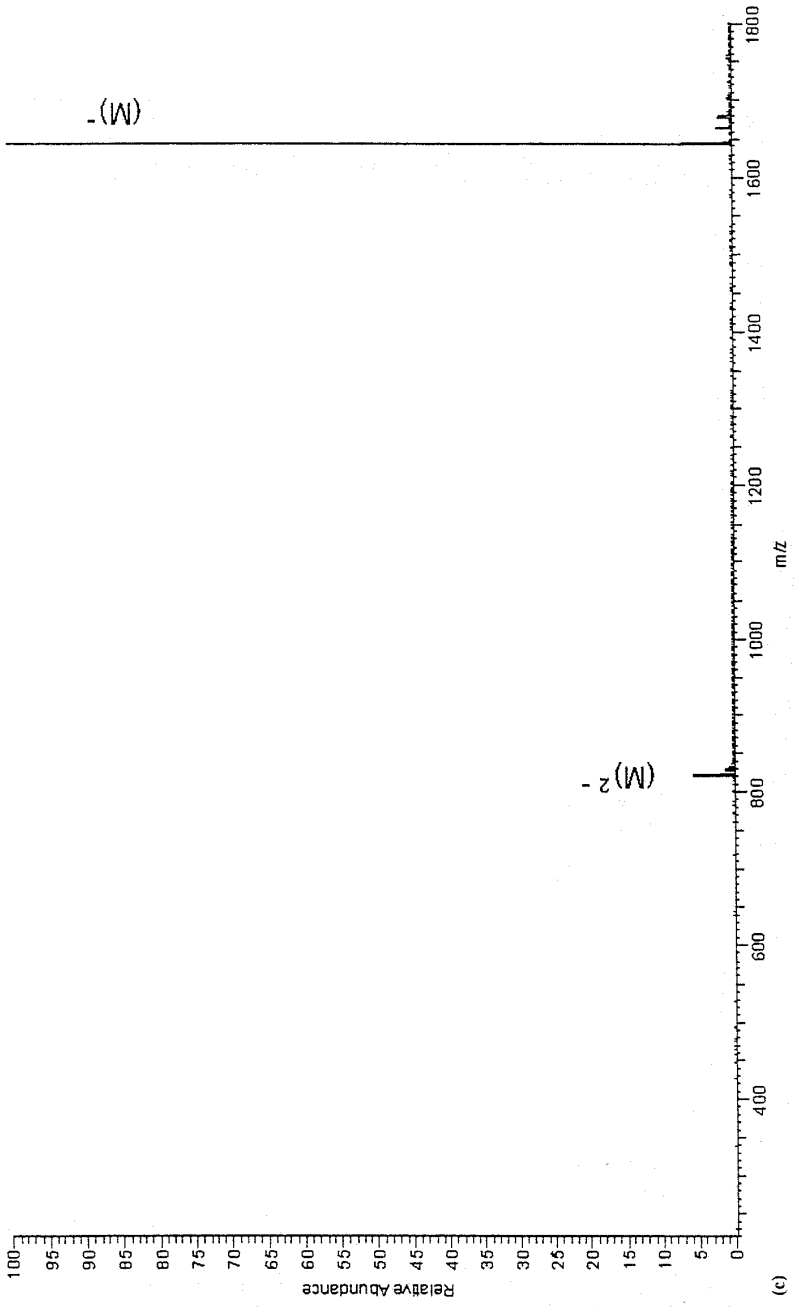


Figure 4 (*Continued*)

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons. Ltd.

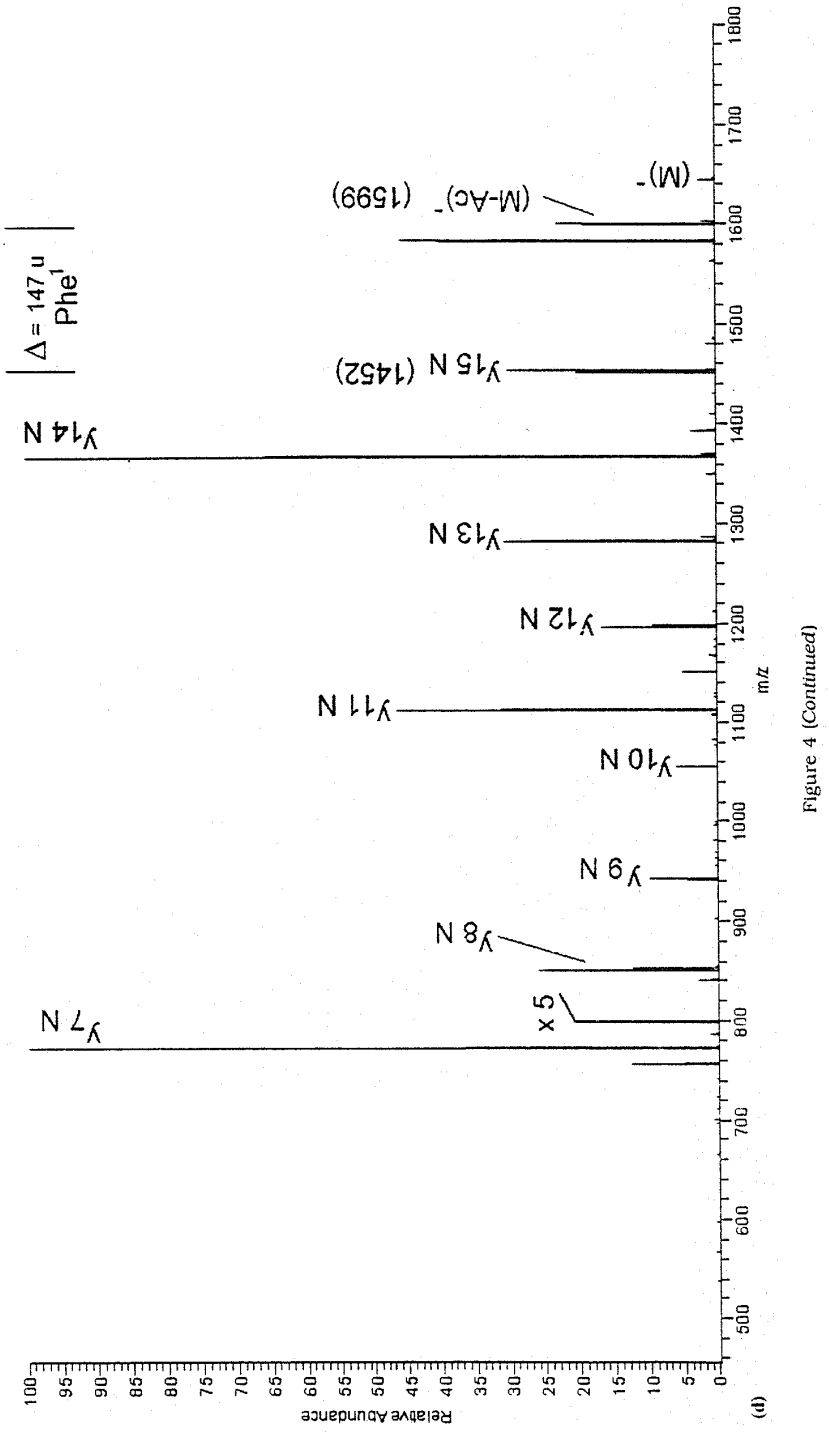


Figure 4 (*Continued*)

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons. Ltd.

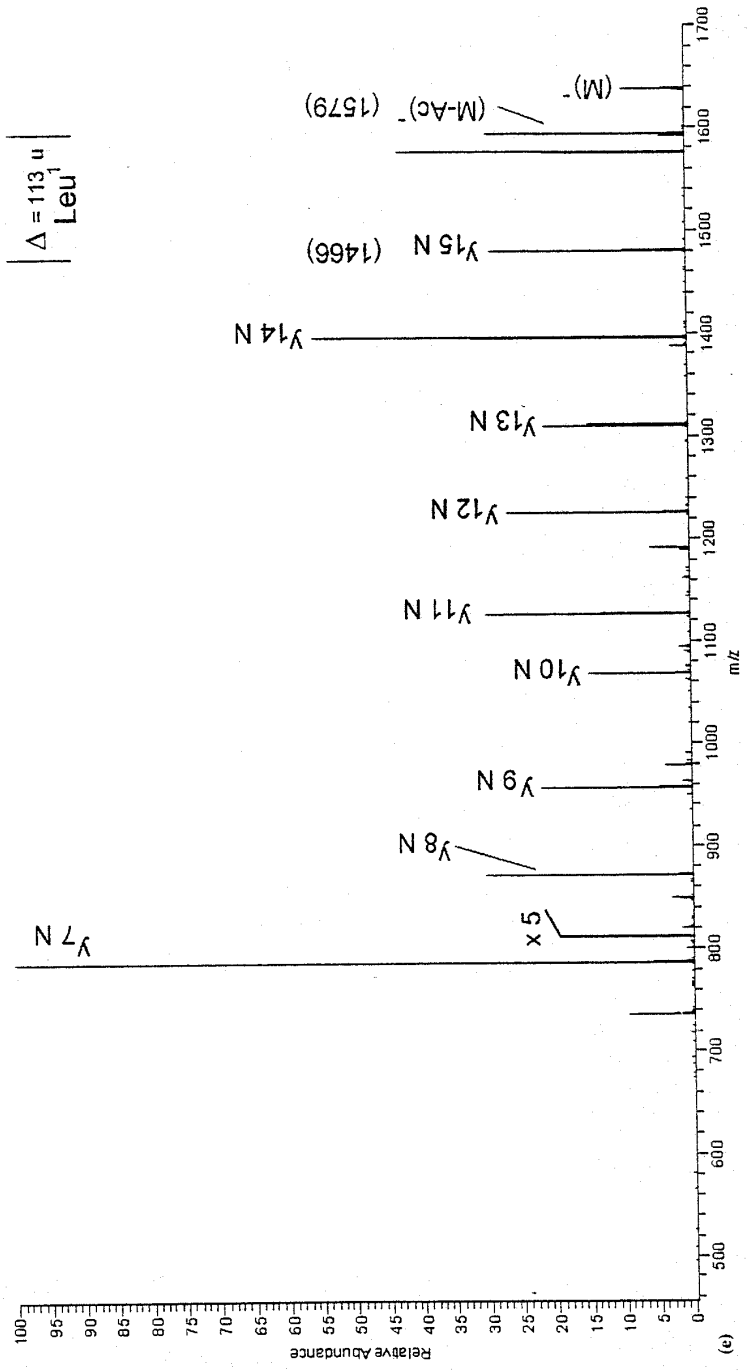


Figure 4 (*Continued*)

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

E. synnematicola. On-line HPLC ESI-MS and MS-MS in the positive- and negative-ion mode were used. Analogously, the sequences of the AAM peptides presented in Figure 2 were determined.

The pseudomolecular ion $(M+Na)^+$ at *m/z* 1665 is most abundant in the positive-ion spectrum, accompanied by $(M+H)^+$ and $(M+K)^+$. In addition, some characteristic fragment ions of the *b* series, resulting from labile Aib^9-Hyp^{10} (b_9), Aib^{11}-Hyp^{12} (b_{12}) and Aib^{14}-Pro^{15} (b_{14}) bonds (Jaworski and Brückner, submitted) can be seen (Figure 4(a)). As a precursor ion for MS-MS the most abundant $(M+Na)^+$ was chosen. High-collision energy MS-MS (86%, relative collision energy corresponding to 4.27 V peak-to-peak of resonance excitation radio frequency voltage applied at mass analyzer) resulted in generation of the more abundant a series of ions accompanied by the lesser abundant *b* series of ions, and made the sequence determination of AA positions Gly^6 to Pheol^{16} possible (Figure 4(b)). Regular series of $b_7^{\#}$ to $b_{15}^{\#}$ were generated which did not show the characteristic and complete cleavage of Aib(Iva)-Pro(Hyp) bonds (Jaworski and Brückner, submitted) [42] in positive-ion MS (see Figure 4(a)). Remarkably, all generated ions of the a and *b* series were sodium adducts, and are indicated by # in Figure 4(b). Notably, the abundant sodiated fragment ions of the a series were interrupted at AA position 10. At this position, and as an exception, only the $c_{10}^{\#}$ ion at *m/z* 1023 was detected arising from cleavage of the Hyp^{10}-Gln^{11} bond. It is of interest to note that the fragmentation pattern in positive-ion mode of AAM is different as compared to those observed at sequencing trichtoxin A-40 peptides (Jaworski and Brückner, submitted). These peptides, which contain Glu residues, required acidification of the HPLC eluent in order to be eluted from the column. Use of this acidic eluent resulted in the formation of most abundant $(M+H)^+$ pseudomolecular ions. In trichotoxins A-40, MS-MS of $(M+H)^+$ generated an intensive series of *b* ions proceeding to, and ending with, the Aib–Pro bond (Jaworski and Brückner, submitted).

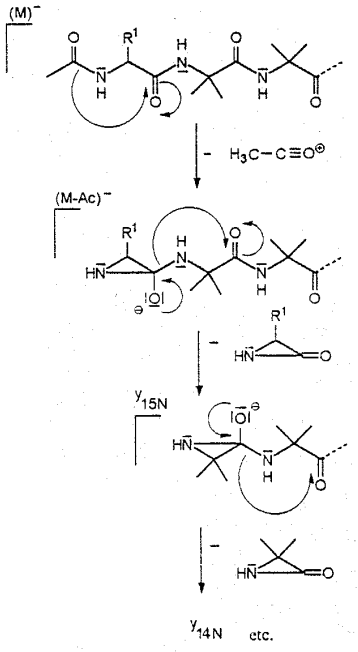


Figure 5 Proposed mechanism for the formation of the y_{15N} to y_{7N} series (negative-ion mode) via deacetylation of $(M)^-$ and release of an acetylium ion, followed by repetitive formation of aziridinolate anions and release of aziridinolones (R^1, benzyl for Phe^1).

In order to increase ionization of peptides for ESI-MS, in the negative-ion mode aqueous ammonia was added to the eluate before entering the MS interface. A most intensive $(M)^-$ ion at *m/z* 1642, together with $(M)^{2-}$ at *m/z* 821.5 of low intensity, were detected (Figure 4(c)). It is assumed that the negative charge is the result of the capture of one or two electrons, respectively, since AAM do not contain acidic AA which can form anions via dissociation. Notably, the characteristic fragmentation pattern as observed in positive-ion mode, was not abundant. MS-MS of $(M)^-$ provided the y_N series of fragment ions (Jaworski and Brückner, submitted). At a relative collision energy of 64% of the instrument (corresponding to 3.24 V applied at mass analyzer) the regular series, starting with y_{15N} and ending at y_{7N}, were detected (see Figure 5) and established AA positions Phe^1 to Aib^9 (Figure 4(d)). Acetylation of peptides was deduced from the differences of 43 mass units from $(M)^-$ (*m/z* 1642) and y_{15N} (*m/z* 1599). The *N*-terminal exchange of Phe^1/Leu^1 is demonstrated with AAM XV, detectable only in the MS of the peptide mixture of *S. erythrocephala* ATTC 28144 (cf. Figure 4(e)). It is supposed that deacetylation is followed by formation of an aziridinolate anion, as also postulated for the peptaibols trichotoxins (Jaworski and Brückner, submitted). For a proposed mechanism showing the formation of the y_N fragment series see Figure 5. Loss of 3-alkylaziridinones from peptides in positive-ion mode has been reported [45,46]. Sequence determination of AAM peptides in the positive- and negative-ion mode, showing series of diagnostic ions

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

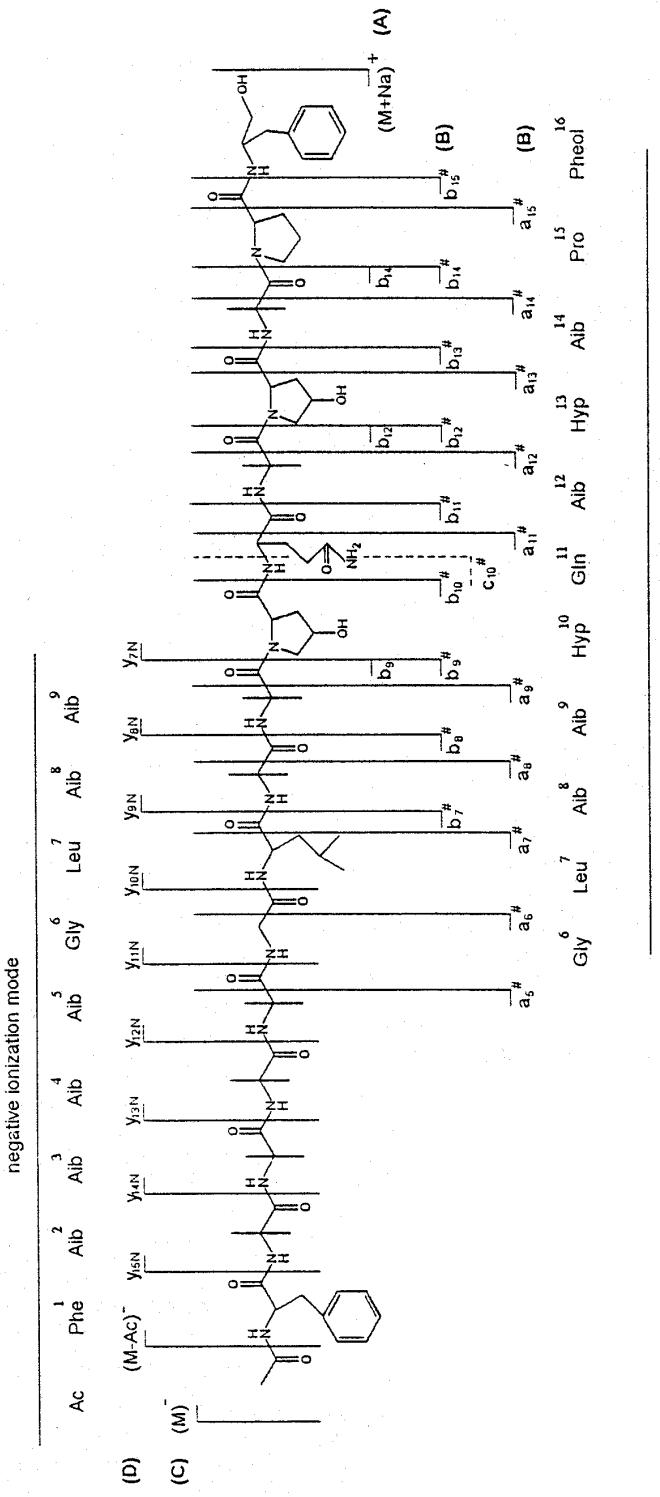


Figure 6 Overview of sequencing AAM, demonstrated with the example AAM VI, using positive- and negative-ion ESI-MS; mass fragments were generated by (A), positive ion ESI-MS; (B) MS-MS of $(M + Na)^+$; (C) negative ion ESI-MS; and (D) MS-MS of $(M)^-$. y_N refers to negative-ion mode; # indicates sodium adducts of a and b series.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

used for the sequence determination of AAM VI, is summarized in Figure 6.

CONCLUSIONS

It is demonstrated that species of the filamentous fungi *Stilbella* and *Gliocladium*, beside *Emericellopsis* and *Cephalosporium*, are capable of producing microheterogeneous mixtures of AAM. On-line LC-ESI-MS run in the positive- and negative-ion mode is well suited for the rapid and sensitive determination of sequences of these peptaibol antibiotics. Some specific features are recognized in their mass spectrometric fragmentation pattern in comparison to peptides having exclusively proteinogenic AA as constituents. The most abundant peptides in all AAM are components I and III, which are accompanied by varying amounts of AAM IV–XI. Low amounts (1.9%) of AAM II occur only in a sample of AAM distributed originally by Hindustan Antibiotics, whereas AAM XV and XVI, showing a characteristic Phe^1/Leu^1 exchange, are only produced by *S. erythrocephala*. Establishing HPLC fingerprints, individual sequences and relative amounts of AAM isolated from various fungi is of importance since experiments described in the literature were partly carried out with microheterogeneous mixtures of AAM from various sources.

Proof of the production of relatively high amounts of AAM by *Stilbella* and *Gliocladium*, or the telomorph *Trichoderma* of the latter, are of interest since their use for the biocontrol of phytopathogens is the subject of intensive investigations [47–49]. As synergistic actions of peptaibols and fungal cellulases in this context have been postulated [50], the bioactive AAM produced might be involved in the mode of action.

Acknowledgements

The authors thank Dr Christine Reinecke and Dr Michael Kieß, who were involved some time ago in the isolation procedures of peptides from *S. erythrocephala* and *E. salmosynnemata* at Hohenheim University. The authors also thank Svenja Nanninga, Giessen University, for assistance in parts of the work.

REFERENCES

1. Thirumalachar MJ. Antiamoebin, a new antiprotozoal-anthelmintic antibiotic. Part I. Production and biological studies. *Hindustan Antibiot. Bull.* 1968; **10**: 287–289.
2. Vaidya MG, Deshmukh PV, Chari SN. Amino acid sequence in antiamoebin. *Hindustan Antibiot. Bull.* 1968; **11**: 81–89.
3. Pandey RC, Meng H, Cook JC, Rinehart KL. Structure of antiamoebin I from high resolution field desorption and gas chromatographic mass spectrometry studies. *J. Am. Chem. Soc.* 1977; **99**: 5203–5205.
4. Pandey RC, Cook JC, Rinehart KL. Structure of the peptide antibiotic antiamoebin II. *J. Antibiot.* 1978; **31**: 241–243.
5. Rinehart KL. Fast atom bombardment mass spectrometry; a promising tool for structural studies. *Trends Anal. Chem.* 1983; **2**: 10–14.
6. Stroh JG, Cook JC, Milberg RM, Brayton L, Kihara T, Huang Z, Rinehart KL. On-line liquid chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1985; **57**: 985–991.
7. Rinehart KL. Newer methods for characterization of antibiotics II. Antibiotic structure studied by mass spectrometry. *Bio/Technolgy* 1983; **1**: 581–588.
8. Brückner H, Nicholson GJ, Jung G. Gas chromatographic determination of the configuration of isovaline in antiamoebin, samarosporin (emerimicin IV), stilbellin, suzukacilins and trichotoxins. *Chromatographia* 1980; **13**: 209–214.
9. Bosch R, Brückner H, Jung G, Winter W. (−)-Isovaline: confirmation of its D-(= *R*)-configuration by X-ray analysis of its *N*-chloroacetyl derivate. *Tetrahedron* 1982; **38**: 3579–3583.
10. Snook CF, Woolley GA, Oliva G, Pattabhi V, Wood SP, Blundell TL, Wallace BA. The structure and function of antiamoebin I, a proline-rich membrane-active polypeptide. *Structure* 1998; **6**: 783–792.
11. Rinehart KL, Gaudioso LA, Moore ML, Pandey RC, Cook JC. Structures of eleven zervamicin and two emerimicin peptide antibiotics studied by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 1981; **103**: 6517–6520.
12. Pandey R, Cook JC, Rinehart KL. High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II. 1977; **99**: 8469–8483.
13. Kohls RE, Bradley RE. Antiparasitic evaluation of a new antibiotic. *J. Parasitol.* 1970; **56**: 615–616
14. Matha V, Jegorov A, Kieß M, Brückner H. Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, α-aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue and Cell* 1992; **24**: 559–564.
15. Irmscher G, Bovermann G, Boheim G, Jung G. Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part A. Isolation, characterization and conformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1978; **507**: 470–484.
16. Brückner H, Graf H, Bokel M. Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

the cellulytically active mold *Trichoderma reesei*. *Experientia* 1984; **40**: 1189–1197.
17. Das MK, Raghothama S, Balaram P. Membrane channel forming polypeptides. Molecular conformation and mitochondrial uncoupling activity of antiamoebin, an α-aminoisobutyric acid containing peptide. *Biochemistry* 1986; **25**: 7110–7117.
18. Das MK, Krishna K, Balaram P. Membrane modifying action of four peptide components of antiamoebin, a microheterogeneous fungal antibiotic. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1988; **25**: 560–565.
19. Duclohier H, Snook CF, Wallace BA. Antiamoebin can function as a carrier or as a pore-forming peptaibol. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; **1415**: 255–260.
20. Valle G, Crisma M, Toniolo C, Beißwenger R, Riecker A, Jung G. Molecular and crystal structures of two terminally blocked tripeptides corresponding to the 3-5 sequence of the peptaibol antibiotics antiamoebins. *Liebigs Ann. Chem.* 1989; 337–343.
21. Altherr W, Heimgartner H. Synthesis of segments of the peptaibol antiamoebin I. *Peptides* 1992, *Proceedings of the 22nd European Peptide Symposium*. Schneider CH, Eberle AN (eds), Escom Science: Leiden, The Netherlands, 1992; 387–388.
22. Bardi R, Piazzesi AM, Toniolo C, Raj PA, Raghothama S, Balaram P. Conformations of the amino terminal tetrapeptide of emerimicins and antiamoebins in solution and in the solid state. *Int. J. Biol. Macromol.* 1986; **8**: 201–206.
23. Krishnaswamy S, Vasantha Pattabhi. Studies on the secondary structure of the peptide antibiotic antiamoebin I. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 1987; **24**: 1–5.
24. Krishna K, Sukumar M, Balaram P. Structural chemistry and membrane modifying activity of the fungal polypeptides zervamicins, antiamoebins and efrapeptins. *Pure Appl. Chem.* 1990; **7**: 1417–1420.
25. Leplawy MT, Beusen DD, Slomczynska U, Zabrocki J, Olejniczak B, Hutton WC, Marshall GR. Antiamoebin I. Synthesis *via* enzymatic segment condensation and its solution structure. *Peptides* 1996, *Proceedings of the 24th European Peptide Symposium*. Ramage R, Epton R (eds), ESCOM Science: Leiden, The Netherlands, 1998; 579–580.
26. Karle IL, Perozzo MA, Mishra VK, Balaram P. Crystal structure of the channel-forming polypeptide antiamoebin in a membrane-mimetic environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; **95**: 5501–5504.
27. Toniolo C, Benedetti E. The polypeptide 3_{10}-helix. *TIBS* 1991; **16**: 350–353.
28. Geßmann R, Kokkinidis M, Currie M, Brückner H. Unusal conformations adopted by standard amino acids in Aib-containing oligopeptides. *Zeit. Kristallographie* 1997; **212**: 819–825.
29. Aubry A, Bayeul D, Brückner H, Schiemann N, Benedetti E. The crystal state conformation of Aib-rich segments of peptaibol antibiotics. *J. Peptide Sci.* 1998; **4**: 502–510.
30. Brückner H, Przybylski M. Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of 'peptaibols' and other Aib-containing peptides of fungal origin. I. Gliodeliquescin A from *Gliocladium deliquescens*. *Chromatographia* 1984; **19**: 188–199.
31. Brückner H, Reinecke C. GC-MS detection of Aib-containing polypeptide mycotoxins (antibiotics) in *Penicillium roqueforti* and other filamentous fungi. *J. High. Resol. Chrom.* 1988; **11**: 735–738.
32. Brückner H, Maisch J, Reinecke C, Kimonyo A. Use of α-aminoisobutyric acid and isovaline as marker amino acids for the detection of fungal polypeptide antibiotics. Screening of *Hypocrea*. *Amino Acids* 1991; **1**: 251–257.
33. Brückner H, Nuber K, Reinecke C. Chromatographic detection of bioactive Aib-peptides in moulds of the genus *Stilbella*. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1989; **333**: 777–778.
34. Brückner H, Reinecke C. Chromatographic assay for the rapid and sensitive detection of peptaibol mycotoxins (antibiotics) in filamentous fungi. *J. High Resol. Chrom.* 1989; **12**: 113–116.
35. Brückner H, Wunsch P, Kussin C. Production of polypeptide antibiotics by molds of the genus *Gliocladium*. In *Second Forum on Peptides*, Aubry A, Marraud M, Vitoux B (eds), Colloque INSERM, vol. 174, John Libbey Eurotex: London, UK, 103–106.
36. Seifert KA. A monography of *Stilbella* and some allied hyphomycetes. In *Studies in Mycology*, vol. 37, Centralbureau voor Schimmelcultures: Baarn, The Netherlands, 1985.
37. Singh B, Webster J. Antagonism between *Stilbella erythrocephala* and other coprophilous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1973; **61**: 487–495.
38. Brückner H, Jung G, Przybylski M. Chromatographic and mass spectrometric characterization of the structure of the polypeptide antibiotics samarosporin and stilbellin and identity with emerimicin. *Chromatographia* 1983; **17**: 679–685.
39. Kieß M, Brückner H. Scaled-up fermentation of the polypeptide antibiotic antiamoebin. In *DECHEMA Biotechnology Conferences*, vol. 3b, VCH: Weinheim, 1989; 579–582.
40. Roepstorff P, Fohlmann J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984; **11**: 601.
41. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1992; **61**: 977–1010.
42. Jaworski A, Kirschbaum J, Brückner H. Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mould *Trichoderma viride* NRRL 5243. *J. Peptide. Sci.* 1999; **5**: 341–351.
43. Becker D, Kieß M, Brückner H. Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Liebigs Ann./Recueil* 1997: 767–772.
44. Erbe T, Brückner H. Microwave treatment of dietary gelatin does not generate *cis*-4-hydroxy-L-proline, an

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

inhibitor of collagen biosynthesis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1999; **208**: 424–428.
45. Cordero MM, Wesdemiotis C. Tandem mass spectrometry of peptides: Mechanistic aspects and structural information based on neutral losses. II- Tri- and larger peptides. *Org. Mass Spectrom.* 1994; **29**: 382–390.
46. Kanai M, Iida A, Nagaoka Y, Wada S, Fujita T. Fungal metabolites. XXI. Characteristics of low energy collision induced dissociation of $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ and $[M+2Na]^{2+}$ of peptaibols using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1996; **31**: 177–183.
47. Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1985; **23**: 23–54.
48. Köhl J, Belanger RR, Fokkema NJ. Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: A comparative microscopic and ultrastructural study. *Phytopathology* 1997; **6**: 634–642.
49. Lewis JA, Papavizas GC. *Stilbella aciculosa*: a potential biocontrol fungus against *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol Sci. Technol.* 1993; **3**: 3–11.
50. Schirmböck M, Lorito M, Wang Y, Hayes C, Arisan-Atac I, Scala F, Harman G, Kubicek C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; **60**: 4364–4370.

Copyright © 1999 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Hans Brückner für die Überlassung des Themas, sowie die engagierte Förderung der vorliegenden Arbeit. Seine konstruktive Diskussionsbereitschaft hat maßgeblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen.

Herrn Prof Dr. Hans Hummel danke ich herzlich für die Zweitkorrektur.

Herrn Dr. Jochen Kirschbaum gilt mein Dank für die Einführung am ESI-MS und die Hilfsbereitschaft beim Interpretieren der Massenspektren.

Herrn Dr. Martin Weidenbörner danke ich für die Möglichkeit, einen Teil der mikrobiologischen Arbeiten am Institut für Angewandte Mikrobiologie durchzuführen.

Frau Heike tom Dieck, Svenja Nanninga und Sonya Henze danke ich für die im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführten Arbeiten.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor, insbesondere Frau Angelika Schneidewind, Herrn Dipl. oec. troph. Thorsten Erbe und Herrn Dr. Klaus-Jürgen Moch danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern und meiner Großmutter, die durch ihre ständige Unterstützung meine Ausbildung erst ermöglicht haben, sowie meiner Lebensgefährtin Frau Dipl. oec. troph. Daniela Breßlein, die die Höhen und Tiefen dieser Dissertation miterleben mußte!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Andreas Jaworski
Bodenstr. 21
35606 Solms
geb. am 13.12.1970
in Ehringshausen-LDK
ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulausbildung:

1977 - 1981	Grundschule in Solms-Niederbiel
1981 - 1987	Gesamtschule in Solms
1987- 1990	Goetheschule in Wetzlar
	Abitur: 06/1990

07/1990-09/1992 Wehrdienst

Hochschulausbildung:

10/1992 - 09/1996	Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/1996	Studienabschluß*:* Diplom Oecotrophologe

12/1996- 01/2000 Dissertation am Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Lebensmittelwissenschaften, der Justus-Liebig-Universität Gießen,
betreut durch Prof. Dr. Hans Brückner