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

Isolierung, Sequenzierung und Wirkungsprüfung von bioaktiven Peptid-Antibiotika aus Schimmelpilzen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.) am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement

vorgelegt von

Dipl. oec. troph.

Corina Krause

aus Jena

Gießen 2006

Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 17. Juli 2006

Prüfungskommission: Vorsitzende: Prof. Dr. K. Becker 1. Gutachter: Prof. Dr. H. Brückner 2. Gutachter: PD Dr. G. Benckiser Prüfer: Prof. Dr. E. Weigand Prüfer: Prof. Dr. K. Mühling Meinen Eltern und Jens

Liste der Original-Publikationen

Diese Dissertation basiert auf folgenden Original-Publikationen:

- [A] Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H (2003) Sequences of alamethicin
 F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J. Peptide Sci.* 9: 799-809.
- **[B]** Krause C, Kirschbaum J, Jung G, Brückner H (2006) Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold *Trichoderma viride*. *J. Peptide Sci.* **12**: 321-327.
- [C] Krause C, Kirschbaum J, Brückner H (2006) Peptaibiomics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. *Amino Acids*. 30: 435-443.
- [D] Krause C, Kirschbaum J, Brückner H (2006) Peptaibiomics: Microheterogeneity, Kinetics and Sequences of Peptaibiotics Trichobrachins from *Trichoderma* parceramosum BISSETT (syn. *T. longibrachiatum* RIFAI). Entwurf.

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

Die Arbeiten werden, mit freundlicher Genehmigung der entsprechenden Verlage, im Anhang als Originale dargestellt, soweit bei Drucklegung der Dissertation die im Verlagslayout gesetzten Versionen vorlagen.

Inhaltsverzeichnis

Liste der Original-Publikationen	I
Inhaltsverzeichnis	II
Verzeichnis der Abbildungen	IV
Verzeichnis der Tabellen	V
Verzeichnis der Abkürzungen	VI

1	Einleitung	1
2	Peptaibiotika – Definition, Einteilung und Eigenschaften	1
	2.1 Definitionen	1
	2.2 Einteilung der Peptaibiotika	2
	2.3 Besonderheiten der Sekundärstruktur	4
	2.4 Biosynthese	4
	2.5 Biologische Aktivitäten	5
	2.5.1 Membranmodifikation	5
	2.5.2 Physiologische Aktivitäten	6
	2.5.3 Antibiotische und antagonistische Aktivitäten	7
	2.5.4 Studien zur Wirksamkeit der Peptaibiotika	8
	2.5.4.1 Vergleich natürlicher Peptaibole in ihrer Wirksamkeit	8
	2.5.4.2 Vergleich natürlicher und synthetischer Alamethicine in	
	ihrer Wirksamkeit	11
	2.6 Schimmelpilze im biologischen Pflanzenschutz	14
3	Massenspektrometrische Methoden zur Strukturaufklärung	
	von Peptaibiotika	15
	3.1 Einsatz der Massenspektrometrie in der Strukturaufklärung	
	von Peptiden	15
	3.2 Fragmentierungsverhalten von Peptiden	16

4	Struk	turaufklärung von Alamethicin F30, Suzukacillin A, Trichobrachin I-III	
	und I	Entwicklung einer Screeningmethode auf Peptaibiotika	18
	4.1 S	Sequenzierung des Peptaibols Alamethicin F30, isoliert aus Trichoderma	
	1	viride NRRL 3199	18
	4.2 S	equenzierung der Peptaibol-Antibiotika Suzukacillin A	20
	4.3 S	equenzierung der Trichobrachin-Peptaibiotika und kinetische	
	I	Untersuchungen zur Bildung der Trichobrachine	22
	4.4 P	Peptaibiomics – eine schnelle und selektive Screeningmethode auf die	
]	Bildung von Peptaibiotika	25
5	Zusar	nmenfassung der Untersuchungsergebnisse	28
A	nhang		30
	I Lit	eratur	30
	II Ex	xperimenteller Teil	41
	шо	riginal-Publikationen und Entwurf	49

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 2-1	Einteilung der Peptaibiotika	2
Abb. 2-2	α -helikale Alamethicin-Sekundärstruktur	4
Abb. 2-3	Modell einer Trichotoxinpore	6
Abb. 2-4	Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte von der Konzentration	
	der Proben (ALM F50, ALM F30, Suzukacillin A, Trichobrachin)	9
Abb. 2-5	Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte von der Konzentration	
	der Proben (ALM F50, Trichobrachin, TB I, TB II, TB III)	10
Abb. 2-6	Struktur von A-Lys 65 und A-Lys 108	11
Abb. 2-7	Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte von der Konzentration	
	der Proben (Derivate des ALM 17, ALM 17, ALM F50)	12
Abb. 2-8	Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte von der Konzentration	
	der Proben (Derivate des ALM 20, ALM 20, ALM F50)	13
Abb. 3-1	Nomenklatur für die Bezeichnung der Fragmentionen	16
Abb. 4-1	Strukturen von Alamethicin I und II	18

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 2-1	Biologische Wirkungen verschiedener Peptaibiotika	7
Tab. 2-2	Derivate von ALM 17 und ALM 20	11
Tab. II-1	Ion-Sets und Massenfragmente	44

Verzeichnis der Abkürzungen

AA	Aminoalkohol(e)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CID	Collision Induced Dissociation
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
EI	Electron Impact
ESI	Electrospray-Ionisierung
eV	Electronen Volt
FAB-MS	Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie
FD-MS	Feld-Desorption-Massenspektrometrie
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
i.D.	innerer Durchmesser
МеОН	Methanol
MPLC	Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MS^n	multiple Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRPS	nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen
OD	Optische Dichte
R_{f}	Relative to Front (Dünnschichtchromatographie)
RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
S1	Standard-1-Nährbouillon
SIM	Selected Ion Monitoring
Tab.	Tabelle
TDM	4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan

VI

TFA	Trifluoressigsäure
TFA-	Trifluoracetyl-
UV	Ultraviolett
Δm	Differenz der Massenzahlen

Schimmelpilze

Нур.	Hypocrea
Tr.	Trichoderma

Peptaibole

ALM	Alamethicin
SZ	Suzukacillin
ТВ	Trichobrachin

Aminosäuren

Aib	α-Aminoisobuttersäure, U
Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
Нур	Hydroxyprolin
Iva	Isovalin, J
Gaba	γ-Aminobuttersäure
Glx	Glutamin oder Glutaminsäure
Lxx	Leucin oder Isoleucin
Nle	Norleucin
Orn	Ornithin
Pip	Pipecolinsäure
Vxx	Valin oder Isovalin

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

Aminoalkohole

Alaol	Alaninol
Ileol	Isoleucinol
Leuol	Leucinol
Lxxol	Leucinol oder Isoleucinol
Pheol	Phenylalaninol
Prolol	Prolinol
Tyrol	Tyrosinol
Valol	Valinol

1 Einleitung

Schimmelpilze sind aktive Produzenten von Sekundärmetaboliten, welche unter anderem in der Agrar- und Umweltbiotechnologie sowie in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie Anwendung finden. So werden Schimmelpilze bzw. deren Sekundärmetaboliten für die Bekämpfung von Pflanzenpathogenen als biologisches Mittel und Alternative zu chemischen Produkten im Pflanzenschutz eingesetzt [1-4] und finden teilweise in kommerziellen Biofungiziden Verwendung [5, 6]. Zudem bilden einige der Stoffwechselprodukte eine der Grundlagen diverser heute eingesetzter Antibiotika [7].

Schimmelpilze der Gattungen *Emericellopsis*, *Hypocrea*, *Paecilomyces*, *Samarospora*, *Stilbella*, *Tolypocladium* und *Trichoderma* produzieren eine Gruppe von Polypeptid-Antibiotika, die als Peptaibiotika oder Peptaibole bezeichnet werden [8, 9].

Seit der Isolierung des Peptaibols Suzukacillin aus *Trichoderma viride*, strain 63C-I, im Jahre 1966, wird die Gruppe der Peptaibiotika ständig erweitert, und der Bedarf an einer schnellen Strukturaufklärung und Bestimmung des Wirkungsspektrums steigt [10, 11]. Die Strukturen und Eigenschaften von mehr als 300 Peptaibolen sind dabei in der "Peptaibol - Database" hinterlegt [12, 13].

2 Peptaibiotika – Definition, Einteilung und Eigenschaften

2.1 Definitionen

Die wesentlichen Merkmale der <u>Peptaibiotika</u> lassen sich vom Namen ableiten und sind definiert als natürlich vorkommende <u>Pept</u>ide, welche die nicht-proteinogene Aminosäure (AS) α -Aminoisobuttersäure (2-Methylalanin, <u>Aib</u>) enthalten und anti<u>biotische</u> Wirkung zeigen. Es handelt sich dabei um lineare, lipophile Peptide bestehend aus 5 (Peptaibolin [14]) bis 20 AS (z.B. Alamethicin, Suzukacillin, Paracelsin [15, 16]) mit Molmassen zwischen 500 und 2200 Dalton.

Die in den Peptaibiotika enthaltenen AS liegen mit Ausnahme von Isovalin (2-Ethylalanin, Iva) in L-Konfiguration vor. Iva tritt meist in D-Konfiguration auf [17, 18], wobei z.B. in Efrapeptin und Bergofungin auch L-Iva nachgewiesen [19, 20] und bei Clonostachin beide Iva-Antipoden festgestellt wurden [21].

2.2 Einteilung der Peptaibiotika

Für die Einteilung der Peptaibiotika werden zwei Varianten in der Literatur beschrieben. Zum einen werden Peptaibiotika aufgrund ihrer verschiedenen *C*- und *N*-Termini in mehrere Gruppen eingeteilt [22, 23]. Chugh und Wallace [24] unterteilen die Peptaibiotika zum anderen anhand ihrer Sequenzen in Unterfamilien.

Einteilung der Peptaibiotika in Gruppen

Die Gruppe der Peptaibiotika lässt sich in die Untergruppen der Peptaibole [10] und der Aminolipopeptide [22] klassifizieren (vgl. Abb. 2-1).



Abb. 2-1 Einteilung der Peptaibiotika

Die meisten der bis heute bekannten Peptaibiotika gehören zur Gruppe der Peptaibole. Die Bezeichnung <u>Peptaibol</u> wurde unabhängig voneinander von den Arbeitsgruppen Brückner et al. [25] und Benedetti et al. [26] aus dem <u>Aib</u> im <u>Pept</u>idverbund und einem Aminoalkoh<u>ol</u> am *C*-Terminus abgeleitet. Diese Peptaibole zeichnen sich durch eine oder mehrere säurelabile AS-Pro-Bindungen, einem lipophilen *N*-Terminus und einen hydrophilen *C*-Terminus in der Sequenz aus [27, 28]. Für Peptaibole mit *C*-terminalem Phenylalaninol (Pheol) wird der Begriff Peptaibophole verwendet [29].

Die Gruppe der Peptaibole wird unterteilt in kurzkettige (11-16 AS) und langkettige (18-20 AS) Peptaibole sowie in die Gruppe der Lipopeptaibole (7-11 AS), welche am *N*-Terminus an Stelle eines Acetylrestes mit einer längerkettigen Fettsäure (z.B. Octanoyl- oder *Z*-4-Decenoyl-Gruppen) acyliert sind [23, 29, 30]. Lipopeptaibole sind zudem gekennzeichnet durch das Fehlen der Aib-Pro-Bindungen und einem hohen Anteil an Glycin in der Sequenz [31-33]. Die Aminolipopeptide stellen die zweite Untergruppe der Peptaibiotika dar [34]. *C*- und *N*-Termini der aus 7 - 9 AS bestehenden Peptide sind durch meist zyklische Verbindungen gebildet, wobei der *N*-Terminus dabei oft durch eine methylverzweigte Fettsäure substituiert ist [15, 35, 36]. Neben Aib und Iva können weitere nicht-proteinogene AS wie z.B. β -Hydroxy-L-leucin, β -Alanin, α -Ethylnorvalin und Pipecolinsäure, sowie zumeist eine Lipoaminosäure, die 2-Amino-6-hydroxy-4-methyl-8-oxodecansäure (AHMOD), enthalten sein [37, 38].

In der Literatur gibt es keine scharfe Abgrenzung zwischen der Gruppe der Lipopeptaibole und der Gruppe der Aminolipopeptide, da manche Peptaibiotika, wie z.B. die Helioferine, anhand ihrer chemischen Eigenschaften beiden Gruppen zugeordnet werden können [31, 34].

Einteilung der Peptaibiotika in Unterfamilien

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung, die Einteilung in 9 Unterfamilien, erfolgte durch Chugh und Wallace [24] nach Homologien in der Aminosäuresequenz und der Länge der Peptaibiotika.

Unterfamilie 1 mit etwa 120 Sequenzen beinhaltet die langkettigen Peptaibole mit großen Anteil an Aib wie Alamethicin oder Paracelsin [16, 39]. Typischerweise tragen sie in Position sechs oder sieben einen Glutaminrest und im *C*-terminalen Bereich weitere Gln- oder Glu-Reste sowie Pro an Position 13 oder 14.

Die Unterfamilien 2 und 3 sind der ersten Familie sehr ähnlich und sind mit 14 bis 16 AS deutlich kürzer. In beiden Unterfamilien finden sich an beiden Termini aromatische AS, außerdem tritt neben Prolin auch Hydroxyprolin auf. Der Unterschied ist an Position sechs, hier finden sich in Familie 2 Gly oder Gln, in Familie 3 Threonin. Beispiele für Unterfamilie 2 sind Samarosporin [40] und die Bergofungine [20], zu Unterfamilie 3 gehört z.B. Zervamicin [41].

Unterfamilie 4 unterscheidet sich stark von den anderen Unterfamilien. Die Kettenlänge beträgt entweder 11 oder 14 AS. Sie enthält weder aromatische noch geladenen AS. Hierzu gehören beispielsweise Harzianin [42] und Trichorovin [43].

Die Unterfamilien fünf bis neun sind sehr viel kleiner. Unterfamilie 5 beinhaltet bisher fünf Peptaibiotika aus sieben oder elf AS, die von drei verschiedenen Pilzen produziert werden. Die Vertreter dieser Familie haben einen hohen Anteil an Gly, es fehlen jedoch Pro, Gln oder geladene AS, wie bei Trichogin [32]. Peptaibiotika der Unterfamilie 6 haben eine Kettenlänge von 15 AS. Beispiele sind Ampullosporin [44] und Tylopeptin [45]. Typisch ist Tryptophan an Position 1.

Unterfamilie 7 besteht aus drei Lipopeptaibolen mit 11 AS, *C*-terminalem Leuol, welche von *Tolypocladium geodes* gebildet werden [38]. Die beiden letzten Unterfamilien 8 und 9 bestehen jeweils aus einer Sequenz; zum einen dem Clonostachin [21] und dem Peptaibolin, dem kürzesten derzeit bekannten Peptaibiotikum [14].

2.3 Besonderheiten der Sekundärstruktur

Peptaibiotika zeigen aufgrund des hohen Anteils der sterisch anspruchsvollen AS Aib, welche durch die zweite Methylgruppe am α -C-Atom die Bildung von helikalen Strukturen fördert, eine große Tendenz zur Ausbildung amphipatischer Helix-Strukturen [46-48]. Kurze Aib-haltige Peptide (fünf bis sieben AS) tendieren in ihrer Sekundär-Struktur zu einer 3₁₀-helikalen Form mit β -Turns, während längerkettige Aib-haltige Peptide eine α -helikale Form mit Krümmung der Helixachse annehmen (siehe Abb. 2-2) [49-52]. Bei längerkettigen Lipopeptaibolen wurde eine Mischform aus 3₁₀-Helix und α -Helix beobachtet, während kürzere Lipopeptaibole zu der β -Faltblattstruktur tendieren [31].



Abb. 2-2 α-Helikale Alamethicin-Sekundärstruktur mit acht Aib-Resten (modifiziert nach [12])

Die für die Gruppe der Peptaibiotika charakteristische Mikroheterogenität, die sich aus dem Austausch von homologen AS ergibt, ist das Ergebnis der speziellen Biosynthese der Peptaibiotika.

2.4 Biosynthese

Das Vorkommen von nicht-proteinogenen Aminosäuren wie Aib, Iva und weiteren ungewöhnlichen Substituenten, wie z.B. D-AS und zyklischen Komponenten und die große Strukturvielfalt lassen den Schluss zu, dass Peptaibiotika nicht über die für Peptide übliche ribosomale Biosynthese gebildet werden.

Die Synthese der Peptaibiotika wird von hochmolekularen Multienzymkomplexen (bis zu 1,5 MDa), den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) übernommen [53]. Die NRPS versetzen die Produzentenstämme in die Lage Peptide zu synthetisieren, die sich bei der ribosomalen Synthese nicht oder nur unter hohem posttranslationalem Aufwand bilden [54]. Derartige Synthetasen (NRPS) konnten aus *Trichoderma virid*e [53] und *Sepedonium ampullosporum* [55] isoliert und aufgeklärt werden.

Die NRPS tragen die Strukturinformationen für die Peptaibiotika auf ihren Oberflächen, die bei der Biosynthese wie von einer Matrize kopiert werden [56-58]. Die NRPS setzen sich aus einzelnen Modulen zusammen, welche jeweils eine separate katalytische Einheit darstellen und die Substrataminosäuren erkennen, selektieren, binden und verknüpfen. Diese Module sind wiederum in Domänen unterteilt [59-62]. Details des Syntheseweges über NRPS sind in [55, 63-65] beschrieben.

Aus der weit weniger spezifischen Substraterkennung an den Domänen, im Vergleich zur ribosomalen Peptidsynthese, und dem damit einhergehenden Einbau verschiedener AS und deren Analoga resultiert die Mikroheterogenität der Peptide [23]. Der Austausch einzelner oder mehrerer AS wie z.B. Ala/Aib, Aib/Iva oder Glu/Gln in der Sequenz führt zu einer komplexen Mischung von Homologen und Positionsisomeren [23, 42], wobei meist ein oder zwei Sequenzen dominieren [57]. Mittels HPLC erhält man aus diesen mikroheterogenen Peptidgemischen charakteristische Elutionsprofile ("fingerprints"), die mittels massenspektrometrischer Methoden sequenziert werden können [25, 66].

2.5 Biologische Aktivitäten

Peptaibiotika zeigen in Abhängigkeit von Art und Anzahl der AS sowie spezieller *N*- und *C*-Termini vielfältige Bioaktivitäten, von denen membranporenbildende Eigenschaften und biozide Wirkungen (bakterizide, fungizide, amoebizide, anthelmintische) am besten untersucht sind [31, 32].

2.5.1 Membranmodifikation

Der amphipatische Charakter der Peptaibiotikahelices ermöglicht ihnen in lipophiler Umgebung die Bildung helikaler Bündel mit einem hydrophoben Außen- und einem hydrophilen Innenteil [67-72]. Die Integration erfolgt sowohl spannungsabhängig (z.B. bei Alamethicin [73, 74], Trichosporin [75] und Trichotoxin [76, 77]) als auch ohne Anlegen einer Spannung (Chrysospermin [78]).

Durch Konformationsänderungen in der Membran und als Folge der Ausbildung von oligomeren Aggregaten zu transmembranen Poren werden selektive [78] oder unspezifische Ionenkanäle [79] gebildet. Dies bewirkt eine Änderung des Ionengradienten und letztendlich eine Störung des Ionenhaushaltes der Zelle, was sich in den verschiedensten Wirkungen der Peptaibiotika zeigt [42, 69, 79]. Auch für Lipopeptaibole wie z.B. Texenomycin konnten Membranmodifikationen nachgewiesen werden [80].

Abbildung 2-3 zeigt beispielhaft das Modell einer aus acht Trichotoxinhelices gebildeten Pore.



Abb. 2-3 Modell einer Trichotoxinpore bestehend aus acht Trichotoxinhelices; (A) Aufsicht auf das *C*-terminale Ende, (B) Seitenansicht [76]

Aufgrund dieser Eigenschaften wurden in den letzten Jahren Vertreter dieser so genannten "channel-forming peptides" (CFPs) synthetisiert oder durch den Austausch verschiedener AS-Reste Analoga hergestellt, welche als Modell zum Studium der Funktion dieser Ionenkanäle dienen [69, 73, 81, 82].

2.5.2 Physiologische Aktivitäten

Bei den Peptaibiotika sind eine Reihe physiologischer Effekte zu beobachten.

So haben verschiedene Peptaibiotika eine lysierende Wirkung auf Erythrozyten, Leukozyten und Lymphozyten [34, 83-85], während für Clonostachin eine Inhibierung der reversiblen und irreversiblen Thrombozytenaggregation nachweisbar war [21].

Weiterhin bewirken Alamethicin, Trichosporin und Trichokindin durch Bildung von Calcium-Ionenkanälen eine Catecholamin-Sekretion aus adrenergen Rinderchromaffinzellen [86, 87].

Ferner wurde eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien [87, 88] und eine Hemmung der mitochondrialen ATPasen festgestellt [19, 37, 89]. Auch die im Falle von Antiamoebin, Zervamicin und Efrapeptin bestehende Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* beruht auf einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung [90].

Eine verbesserte Rumenfermentation bei Wiederkäuern, durch Steigerung der Propionatproduktion und Zelluloseverdauung, wurde beim Einsatz von Aibellin beobachtet [16, 91, 92].

Neuroleptische Aktivitäten, wie das Auslösen einer dosisabhängigen Hypothermie und einer parallel verlaufenden Einschränkung der Bewegungsaktivität bei Mäusen, wurden ebenso beschrieben [44, 71, 93] wie immunosuppressive Wirkungen [94] und Antitumor-Eigenschaften [22].

2.5.3 Antibiotische und antagonistische Aktivitäten

Während hemmende Effekte auf gram-negative Bakterien nicht oder nur mit sehr hoher Konzentration erzielt werden konnten, zeigen Peptaibiotika bakterizide oder bakteriostatische Wirkungen gegen ein breites Spektrum gram-positiver Bakterien, wobei langkettige Peptaibole wie z.B. Alamethicin die höchste Wirksamkeit aufweisen [34, 42, 95]. Ein Überblick über derartige biologische Wirkungen verschiedener Peptaibiotika ist beispielhaft in Tabelle 2-1 aufgezeigt.

Biologische Eigenschaften	Peptaibiotika	Literatur
Bakterizide und bakteriostatische Wirkung	Alamethicin, Antiamoebin, Emerimicin, Boletusin, Chrysospermin, Helioferin, Leucinostatin, Paracelsin, Zervamicin, Longibrachin	16, 22, 23, 34, 42, 66, 95, 96, 97, 98
Fungizide Wirkung gegen Pilze und Hefen	Trichopolyn, Leucinostatin, Helioferin, Bergofungin, Boletusin, Leucinostatin, Chrysospermin	20, 22, 34, 66, 95, 97, 99
Antiprotozoale Wirkung	Trichorzianin, Emerimicin, Zervamicin, Antiamoebin	96, 98, 100, 101
Anthelmintische Aktivität	Antiamoebin, Aibellin, Leucinostatin	91, 100, 102
Antivirale Wirkung gegen den Tabakmosaikvirus	Peptaivirin, Chrysospermin	103, 104

 Tab. 2-1
 Biologische Wirkungen verschiedener Peptaibiotika

Ferner sind für einzelne Peptaibole eine Reihe weiterer Wirkungen beschrieben.

Die kurzkettigen Peptaibole Ampullosporin und Trichofumin induzieren eine Pigmentbildung bei *Phoma destructiva* [66, 105-107], welche von Ritzau et al. [44] zum Screening nach biologisch aktiven Schimmelpilz-Stämmen verwendet wurde.

Efrapeptin, isoliert aus *Tolypocladium*-Spezies, entfaltet unter Laborbedingungen toxische Aktivität gegen verschiedene Insekten, wie Spinnmilben, Kartoffelkäfer, Tabakmotten und Stubenfliegen [19, 37, 108]. Für *Tolypocladium cylindrosporum* zeigten sich erste Einsatzmöglichkeiten zur biologischen Kontrolle gegen Moskitos [1, 109, 110].

Von Interesse sind ebenso Wirkungen gegen Mycoplasmen, da einige derselben pathogen gegen Menschen, Tiere und Pflanzen sowie resistent gegen viele Antibiotika sind [111]. Dabei konnten hemmende Effekte sowohl bei Alamethicin als auch bei Trichorzin PA ermittelt werden [23, 112, 113].

2.5.4 Studien zur Wirksamkeit der Peptaibiotika

Die nachfolgenden Peptaibole und synthetischen Alamethicine wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre antibiotische Aktivität gegen *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* getestet. Alle Ergebnisse sind Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen.

Die Erstellung einer Wachstumskurve diente der Bestimmung der verschiedenen Wachstumsphasen des *Bacillus subtilis*. Für den Einsatz des *Bacillus* für die antibiotischen Tests muss dieser in der "log-Phase", d.h. in der exponentiellen Wachstumsphase sein, um optimale und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Der Beginn dieser Wachstumsphase von *Bacillus subtilis* lag bei 3 Stunden Inkubation bei 36 °C. Die optische Dichte (OD) bei 600 nm betrug zu diesem Zeitpunkt 0,3 und diente für jeden Versuchsansatz als Absicherung des richtigen Inkubations-zeitraums und der Zellzahl.

Bei der Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Kolonien der 10^6 - und 10^7 -fachen Verdünnung ausgezählt, die Ergebnisse gemittelt und auf 1 ml Medium hochgerechnet. Dadurch ergab sich eine Lebendzellzahl von 10^7 Bakterien/ml bei einer OD = 0,3 (600 nm).

2.5.4.1 Vergleich natürlicher Peptaibole in ihrer Wirksamkeit

Mittels Mikrotiter-Tests konnten in einer Konzentrationsreihe (1,63 µg/ml bis 833 µg/ml) die antibiotischen Aktivitäten der Substanzen ermittelt werden. Getestet wurden die im Rahmen dieser Arbeit in ihrer Struktur aufgeklärten Peptaibole Alamethicin F30 und F50 [A], Suzukacillin A [B], Trichobrachin [D] sowie dessen Einzelfraktionen TB I, TB II und TB III [D].

Zu Vergleichszwecken wurden die Δ OD-Werte (Δ OD = OD_{t=5h} - OD_{t=0h}) für das Lösungsmittel Methanol bestimmt, um eventuelle Hemmwirkungen des Methanols auf das Bakterienwachstum zu erkennen und bei der Auswertung zu berücksichtigen. Hierbei konnte nur ein sehr geringer, zu vernachlässigender hemmender Effekt festgestellt werden. Die Hemmwirkungen der untersuchten Substanzen waren in allen Fällen deutlich stärker.

Die zu Kontrollzwecken bestimmte ΔOD eines optimalen Bakterienwachstums, bestehend aus 100 µl Standard-1-Nährbouillon und 50 µl Bakteriensuspension, lag im Durchschnitt bei 0,341.

In Abbildung 2-4 sind die Δ OD-Werte von Alamethicin F50 und F30, Suzukacillin A und Trichobrachin gegen die Konzentration aufgetragen. Dabei gilt, dass je niedriger der Δ OD-Wert ist, desto besser ist die Hemmung der Peptaibole auf das Bakterienwachstum. Die Konzentrationsangaben beziehen sich dabei auf 1 ml der eingesetzten Peptaibol-Stammlösung.



Abb. 2-4Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte ($\Delta OD = OD_{t=5h} - OD_{t=0h}$)
von der Konzentration ($\mu g/ml$) der Proben (ALM F50, ALM F30,
Suzukacillin A, Trichobrachin)

Alamethicin F50 zeigte einen deutlichen Übergang zwischen ungehemmtem Wachstum und nahezu vollständiger Hemmung schon bei geringen Konzentrationen. Erst unterhalb einer Konzentration von 26,0 µg/ml war ein deutliches Bakterienwachstum erkennbar. Eine starke Hemmwirkung beim ALM F30 war oberhalb einer Konzentration von 104,2 µg/ml messbar. Ab einer Konzentration von 208,3 µg/ml wies ALM F30 die stärkste Hemmwirkung von allen untersuchten Substanzen auf. Suzukacillin A, von der Struktur dem Alamethicin F50 ähnlich [A, B], zeigte auch in der Wirkung gegen *Bacillus subtilis* ein ähnliches Verhalten, allerdings war die Hemmung in hohen Konzentrationen nicht so stark wie beim ALM F50. Trichobrachin hatte unter den hier gezeigten Substanzen die geringste Hemmwirkung, ab einer Konzentration von 416,7 µg/ml war die Wirkung dem Suzukacillin A gleich.

Abb. 2-5 stellt die Hemmwirkung von Trichobrachin und der einzelnen Trichobrachin-Gruppen TB I, TB II und TB III dar. Vergleichend wurde auch die Hemmwirkung von ALM F50 beurteilt.



Abb. 2-5Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte ($\Delta OD = OD_{t=5h} - OD_{t=0h}$)
von der Konzentration ($\mu g/ml$) der Proben (ALM F50, Trichobrachin,
TB I, TB II, TB III)

Ein Vergleich der Hemmwirkung der Trichobrachine I-III (Strukturen siehe [D]) mit dem ursprünglichen Gemisch der Trichobrachine zeigte, dass TB II mit dem *C*-terminalen Pheol die höchste Wirkung gegen *Bacillus subtilis* aufwies. Eine starke Wirkung hatten auch die kurzkettigen TB III, welche die Aminoalkohole L-Leuol, L-Ileol und L-Valol besitzen, während die Peptide der TB I-Gruppe, die in ihren Sequenzen keinen Aminoalkohol aufweisen, eine geringe Hemmung bewirkten. Die Gesamtprobe Trichobrachin lag von der Wirkung gegen *Bacillus subtilis* erwartungsgemäß im mittleren Bereich. Ab einer Konzentration von 208,3 µg/ml zeigte TB III die gleiche Hemmwirkung wie ALM F50. Die Peptaibole von TB II waren ab dieser Konzentration noch stärker in ihrer Hemmwirkung gegen *Bacillus subtilis*.

So kann postuliert werden, dass das Vorhandensein eines Aminoalkohols in der Struktur der Hemmsubstanzen in einer besseren Wirkung gegenüber *Bacillus subtilis* resultiert. Des Weiteren scheinen kurzkettige Peptaibole eine verstärkte Hemmwirkung auf *Bacillus subtilis* zu haben.

Eine Ausweitung der Bioaktivitätsprüfungen auf weitere in ihrer Struktur bekannte Peptaibiotika, die Verwendung weiterer gram-positiver Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* sowie Untersuchungen mit gram-negativen Bakterien könnten die gezeigten Resultate untermauern.

2.5.4.2 Vergleich natürlicher und synthetischer Alamethicine in ihrer Wirksamkeit

Neben der antibiotischen Aktivität des natürlichen Alamethicin F50 wurden auch verschiedene synthetische Alamethicin-Analoga auf ihre antibakterielle Wirkungen gegen *Bacillus subtilis* untersucht.

Die von Duclohier et al. [114, 115] synthetisierten Alamethicine ALM 17 und ALM 20 entsprechen den Sequenzen von ALM F50/5 bzw. ALM F30/3 [A]. Für ALM 17 (Alamethicin 1-17) wurde der *C*-terminale Rest Glx-Gln-Pheol entfernt, während bei ALM 20 (Alamethicin (1-17)-AUA) der *C*-terminale Rest Glx-Gln-Pheol durch Ala-Aib-Ala ersetzt wurde. Die Derivate von ALM 17 und ALM 20 wurden anschließend *C*-terminal an die ε-Aminogruppe eines Lysin-haltigen Linker-Peptides gekoppelt (vgl. Tab. 2-2 und Abb. 2-6).

Ac-K-A-K-OCH₂C₆H₄-CH₃-
$$p$$

 $\begin{pmatrix} I & I \\ I & I \\ I & I \\ ALM 20 \end{pmatrix}$

Abb. 2-6 Struktur von A-Lys 65 (Derivat von ALM 17) und A-Lys 108 (abgeleitet von ALM 20), K = Lys, A = Ala, Ac = Acetyl (modifiziert nach [114, 115])

ALM 17- Derivat	ALM 17- Anzahl	gekoppelt an	ALM 20- Derivat	ALM 20- Anzahl	gekoppelt an
A-Lys 50	Monomer	K	A-Lys 74	Monomer	K
A-Lys 51	Dimer	KK	A-Lys 108	Dimer	KAK
A-Lys 65	Dimer	KAK	A-Lys 110	Trimer	KAKAK
A-Lys 52	Trimer	ККК	A-Lys 106	Tetramer	KAKAKAK
A-Lys 53	Tetramer	KKKK	A-Lys 111	Tetramer	KAKPGKAK

Tab. 2-2Derivate von ALM 17 und ALM 20, Strukturbeispiel siehe Abb. 2-6, K = Lys,
A = Ala, P = Pro, G = Gly, Ac = Acetyl, (modifiziert nach [114, 115]

Mit diesen modifizierten Alamethicinen wurden bereits Studien zu Leitfähigkeitseigenschaften und Ionenkanalbildungen durchgeführt [114, 115]. Die dabei ermittelten Reaktionen von ALM 17 und ALM 20 waren typisch für Alamethicin. Die drei hydrophoben Reste von ALM 20 steigerten ferner die Membranaffinität im Vergleich zu ALM 17.

Für die mit ALM 17 gekoppelten Oligomere konnte bei A-Lys 50 (Monomer) die gleiche Leitfähigkeit der Poren wie bei ALM 17 festgestellt werden, allerdings bewirkte die Kopplung eine erhöhte Membranaffinität. Das A-Lys 65, ein Dimer an eine Lys-Ala-Lys-Matrize gekoppelt, zeigte das für natürliche Alamethicine übliche Verhalten mit einer hohen Spannungsabhängigkeit.

Bei A-Lys 51 (Dimer) und A-Lys 53 (Tetramer) war eine reduzierte Spannungsabhängigkeit zu beobachten [114, 115].

Auch für die Oligomere von ALM 20 konnten ähnliche Ergebnisse dokumentiert werden, wobei beim A-Lys 108 (Dimer) das Ala zwischen zwei aufeinander folgenden Lys-Resten den Zustand der offenen Kanäle stabilisierte [114, 115].

Für einen weiteren Vergleich der modifizierten Alamethicine sollten diese auf ihre Hemmwirkung in Abhängigkeit der Konzentration (1,63 μ g/ml bis 833 μ g/ml) gegen *Bacillus subtilis* getestet werden.

Als Referenzsubstanz wurde das natürliche ALM F50 verwendet. Dieses zeigte eine der stärksten Hemmwirkungen der getesteten natürlichen Peptaibole gegenüber *Bacillus subtilis*.

Auch in diesen Fällen wurde der Einfluss von MeOH auf das Bakterienwachstum ohne zugesetzte Substanzen bestimmt. Als Tendenz zeigte sich, dass die synthetischen Alamethicine in allen Konzentrationen eine bessere Hemmung bewirkten als der Einfluss des Methanols auf das Bakterienwachstum.

Wirksamkeit der Derivate von ALM 17

Die synthetischen Alamethicine hatten bei geringen Konzentrationen keinerlei Hemmwirkung. Im Vergleich untereinander zeigte sich, dass A-Lys 50 (Monomer) bei hohen Konzentrationen die stärkste Hemmwirkung aufwies. A-Lys 65 (Dimer) und A-Lys 51 (Dimer) besaßen ähnliche Wirkungen. A-Lys 52 (Trimer) und A-Lys 53 (Tetramer) hemmten das Wachstum geringer als ALM 17 (siehe Abb. 2-7).



Abb. 2-7 Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte ($\Delta OD = OD_{t=5h} - OD_{t=0h}$) von der Konzentration (µg/ml) der Proben (Derivate des ALM 17, ALM 17, ALM F50)

Bei einer Konzentration von 833,3 μ g/ml ergab sich folgende Reihenfolge bezüglich der Hemmung: A-Lys 50 > A-Lys 65 > A-Lys 51 > ALM 17 > A-Lys 52 > A-Lys 53.

In allen Fällen war die Hemmwirkung deutlich niedriger als die des natürlichen ALM F50.

Wirksamkeit der Derivate von ALM 20

Hier konnten erst bei sehr hohen Konzentrationen Hemmungen des Bakterienwachstums beobachtet werden, wobei bei Konzentrationen bis 416,7 µg/ml nur A-Lys 108 (Dimer) und A-Lys 106 (Tetramer) eine bessere Wirkung als das ALM 20 (vgl. Abb. 2-8) zeigten. Bei der höchsten Konzentration (833 µg/ml) war die Hemmwirkung von A-Lys 108 dem ALM F50 gleichzusetzen. Bei der höchsten Konzentration (833,3 µg/ml) war folgende Tendenz der Hemmung erkennbar: A-Lys 108 > A-Lys 106 > A-Lys 74 > ALM 20 > A-Lys 110 > A-Lys 111. Auch in diesem Fall war deutlich zu erkennen, dass das natürliche ALM F50 eine sichtbar bessere Hemmung bewirkte als die synthetischen ALM.



Abb. 2-8 Abhängigkeit der Differenz der Optischen Dichte ($\Delta OD = OD_{t=5h} - OD_{t=0h}$) von der Konzentration ($\mu g/ml$) der Proben (Derivate des ALM 20, ALM 20, ALM F50)

Zusammenfassend zeigte das natürliche ALM F50 bei identischen Konzentrationen eine deutlich bessere Hemmwirkung als die synthetischen ALM. Auch hier scheint das Vorhandensein eines Aminoalkohols eine positive Beeinflussung auf die Hemmwirkung zu haben. Einen weiteren positiven Einfluss auf die Hemmwirkung können auch die in der *C*-terminalen Sequenz dem Aminoalkohol vorgelagerten AS Glx-Gln haben.

Das freie ALM 17 und das freie ALM 20 wiesen im Vergleich zu ihren entsprechenden an Lysin gebundenen Derivaten ähnliche Wirkungen auf. Die in ihrer Affinität zur Bildung von

Membranporen [114, 115] am stärksten wirksamen synthetischen ALM A-Lys 50 und A-Lys 108 zeigten auch die stärksten Hemmwirkungen gegen *Bacillus subtilis*. Somit lässt sich die von Duclohier et al. [114, 115] nachgewiesene Verbesserung der Membranaktivität mit der gesteigerten antibiotischen Aktivität von A-Lys 108 und A-Lys 50 korrelieren, was die Schlussfolgerung nahe legt, dass bei der antibiotischen Aktivität der Peptaibole ihre Membran-Aktivität von Bedeutung ist.

2.6 Schimmelpilze im biologischen Pflanzenschutz

Die biologische Schädlingsbekämpfung stellt eine attraktive Alternative zur starken Abhängigkeit der modernen Landwirtschaft gegenüber chemischen Pestiziden dar, welche häufig als gesundheits- und umweltschädigend eingestuft werden [116]. Die Bedeutung der Pilze nimmt in der Schädlingsbekämpfung immer mehr zu, da sie antagonistisch gegen pflanzenpathogene Pilze, Unkräuter und Insekten wirken. Schimmelpilze lassen sich zudem leicht kultivieren und überleben relativ lange Zeit in Ruheformen, aus denen sie erneut keimen und wachsen können [1, 2].

Viele Untersuchungen antagonistischer Wirkungen gegen phytopathogene Pilze im Rahmen der biologischen Schädlingskontrolle sind mit Peptaibiotika-produzierenden Spezies der Gattung *Trichoderma*, *Gliocladium* und *Stilbella* durchgeführt worden [1, 117, 118]. Hierbei wurden synergistische Effekte zwischen cellulytisch wirkenden Enzymen und den Peptaibiotika postuliert [119, 120]. So konnten Wirkungen gegen Fäulniserreger wie z.B. *Sclerotium rolfsii* auf Karotten und Tomaten [121, 122], *Botrytis cinerea* [117, 123-125] und *Rhizoctonia solani* auf Kartoffeln und Zuckerrüben [126-129] sowie gegen verschiedene Nacherntepathogene [130], die Fusarien-welke [131, 132] oder den Mehltau [133] an Kastanien gezeigt werden.

Biologische Schädlingsbekämpfung wurde mit verschiedenen Zielen und unterschiedlichen Mikroorganismen weltweit durchgeführt und dokumentiert [134]. Kommerzielle Produkte, die momentan auf dem Markt erhältlich sind oder sich im Stadium der Registrierung befinden, wie z.B. "Bio Fungus" (Belgien), "Trichoject", "GlioCard", "Binab-TTM" und "Trichoseal" (Neuseeland) sowie "Trichodex 20P" (Makhteshim Agan LTD., Be'er Sheva, Israel) enthalten bereits Pilzsporen der Gattung *Trichoderma* und wirken gegen verschiedene pflanzenpathogene Pilze der Gattungen *Armillaria, Botryosphaeria, Chondrosternum, Fusarium, Pythium, Verticillium* oder *Rhizoctonia* [5, 135-137].

3 Massenspektrometrische Methoden zur Strukturaufklärung von Peptaibiotika

3.1 Einsatz der Massenspektrometrie in der Strukturaufklärung von Peptiden

In den Anfängen der Strukturaufklärung von Peptiden wurde in der Massenspektrometrie (MS) vor allem Feld-Desorptions (FD)-MS und Elektron-Impact (EI)-MS eingesetzt. So konnten mit diesen Methoden die Primärstrukturen der Peptaibole Alamethicin [138], Antiamoebin [29] und Trichopolyn [36] aufgeklärt werden.

Einen weiteren Fortschritt in der Sequenzierung der Peptaibiotika brachte, neben der Verwendung der Fast-Atom-Bombardment (FAB) Technologie gekoppelt mit Quadrupol-Massenanalysatoren, die Einführung der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) [139, 140].

Die ESI-Massenspektrometrie hat sich aufgrund der Möglichkeit thermolabile chemische Substanzen in Lösung zu analysieren und deren Massen zu bestimmen zu einem bedeutenden Instrument in der Analyse von Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und anderen Biomolekülen etabliert [140-144]. Durch das Auftreten von mehrfach geladenen Ionen eignet sich die ESI-MS sehr gut für den massenspektrometrischen Nachweis von hochmolekularen Verbindungen bis zu einer Masse von mehreren Kilodalton [141, 143]. Ein weiterer Vorteil der Elektrosprayionisierungstechnik ist die Möglichkeit, das Massenspektrometer entweder direkt on-line an eine HPLC zu koppeln oder zusätzliche Detektoren zwischen HPLC und Massenspektrometer zu betreiben [145].

Die Kombination von Hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und MS bietet ein routiniertes und leistungsfähiges Verfahren für die Mikrosequenzierung von Peptiden, welche die Analyse von Peptiden und Peptidmischungen ohne vorherige Reinigung und Fraktionierung ermöglicht [140, 146].

Aufgrund der strukturellen Eigenschaften von Peptiden ist die Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) bzw. multiple Massenspektrometrie (MSⁿ) bei der Sequenzierung von Peptiden erfolgreich und generell anwendbar. Dabei werden sowohl bei der FAB-MS-MS als auch bei der ESI-MS-MS Massenanalysatoren hintereinander geschaltet. Die häufig bei der ESI-MS-MS eingesetzten Ion-Trap Analysatoren ermöglichen es, einzelne Massenfragmente der Peptaibiotika zu isolieren und diese gezielt durch Kollision mit Helium weiter zu fragmentieren. Diese Art der Fragmentierung bezeichnet man als stoßinduzierten Zerfall (CID, collision induced dissociation). Durch die multiple MS (MSⁿ) können die entstandenen Fragmente nacheinander weiter isoliert und

von diesen wiederum die Tochterionenspektren bestimmt werden. Durch die Massendifferenzierung zwischen den aufeinander folgenden Paaren können die AS identifiziert und die AS-Sequenz bestimmt werden [146-149]. Eine Differenzierung zwischen den isomeren AS Leucin (Leu) und Isoleucin (Ile) sowie Valin (Val) und Isovalin (Iva) ist mittels ESI-MS-MS nicht möglich. Ebenso können z.B. Lysin (Lys) und Glutamin (Gln) aufgrund ihrer sehr geringen Massendifferenz von 0,0364 Da nicht mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie unterschieden werden [150].

3.2 Fragmentierungsverhalten von Peptiden

Bei der Anwendung der Massenspektrometrie entstehen durch Ionisierung sowohl positiv als auch negativ geladene Ionen. Dabei findet der positive Ionisierungsmodus in der Sequenzierung von Peptiden häufiger Anwendung, da diese meist leichter $(M+H)^+$ Ionen als $(M-H)^-$ Ionen bilden [150, 151]. Mit dieser Ionisierungsmethode liefern Peptide mit hoher Effizienz auch mehrfach geladene Molekül-Ionen der Form $(M+nH)^{n+}$, wobei *n* die Anzahl der an das intakte Molekül gebundenen Protonen angibt [152]. Für Peptide mit stark sauren Gruppen, wie phosphorylierte oder sulfonierte Peptide, ist der negative Ionisierungsmodus zur Sequenzierung besser geeignet. Zwar neigen die $(M-H)^-$ Ionen weniger zur Fragmentierung als $(M+H)^+$ Ionen, dennoch liefert der negative Modus ergänzende Informationen zum positiven Modus [150, 153].

Peptide fragmentieren vor allem entlang der Hauptkette zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Amid-Stickstoff. Dadurch sind die entstehenden Massen der Fragment-Ionen bei einer bekannten Peptidsequenz leicht berechenbar. Die Fragmente werden entsprechend ihrer Bruchstelle nach der Notation von Roepstorff und Fohlmann sowie Johnson und Biemann [154, 155] mit einem Buchstaben für die Art der Bruchstelle und einem Index für die Anzahl der AS im Fragment bezeichnet (vgl. Abb. 3-1).



Abb. 3-1 Nomenklatur nach Roepstorff für die bei der Massenspektrometrie von Peptiden entstehenden Fragmentionen (modifiziert nach [156])

Verbleibt hierbei die Ladung auf dem *N*-terminalen Fragmention, wird ein b-Typ Ion gebildet. Ein y-Typ Ion entsteht, wenn die Ladung bei dieser Spaltung am *C*-Terminus verbleibt [149]. Die Fragmentierung kann auch an anderer Stelle entlang des Peptidrückgrats stattfinden, so dass Ionen des a-, b-, c- sowie x-, y- und z-Typs gebildet werden können [157]. Kommt es zu einer Spaltung an den Seitenketten der Peptide, entstehen Ionen des Typs d, v oder w [146].

Der Index wird demnach für *N*-terminale Fragmente vom *N*-Terminus und für *C*-terminale Fragmente vom *C*-Terminus ausgehend hochgezählt. Die beschriebenen Fragmentierungs-Typen finden spontan nach der Ionisierung statt. Reicht dieser spontane Zerfall nicht aus, kann durch Stöße mit einem inerten Gas (CID) eine Anregung erzeugt werden, die zu einer Fragmentierung führt [148, 158]. Eine Zusammenstellung der Fragmentierungs-Typen und Mechanismen der im Ionisierungsmodus gebildeten Fragmente ist in [159-161] dargestellt.

4 Strukturaufklärung von Alamethicin F30, Suzukacillin A, Trichobrachin I-III und Entwicklung einer Screeningmethode auf Peptaibiotika

Die in den Originalartikeln und dem Entwurf [A - D] publizierten Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten zusammenfassend dargestellt.

4.1 Sequenzierung des Peptaibols Alamethicin F30, isoliert aus *Trichoderma viride* NRRL 3199

1967 wurde Alamethicin (ALM) erstmals aus der Nährlösung von *Trichoderma viride* Kulturen isoliert [162]. Viele mögliche Sequenzen und Konformationen des Peptaibols Alamethicin wurden im Lauf der Zeit beschrieben und teilweise revidiert [162-165].

Pandey et al. [138] überprüften die Sequenzen von Alamethicin mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie und erhielten die Strukturen von Alamethicin I und II (siehe Abb. 4-1).

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol	(I)
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol	(II)

Abb. 4-1 Strukturen von Alamethicin I und II [138]

Irmscher und Jung [166] konnten nach Fermentation von *Trichoderma viride* NRRL 3199 Alamethicin isolieren, wobei mittels DC das Alamethicin in 2 Hauptkomponenten mit den R_f -Werten von 0,3 und 0,5 aufgetrennt wurde. In Anlehnung an die Bezeichnung von Melling und McMullen [167] wurde die Hauptkomponente, bestehend aus neutralen Peptiden, als ALM F50 $(R_f = 0,5)$ und die Minorkomponente mit sauren Peptiden als ALM F30 $(R_f = 0,3)$ bezeichnet. Alamethicin besitzt aufgrund seiner Fähigkeit Ionenkanäle zu bilden, größtes Interesse für das Studium solcher künstlich erzeugter Ionenkanäle, wobei sowohl ALM F30 als auch ALM F50 in der Lage sind, diese Kanäle in Membranen zu bilden. Um den Bildungsmechanismus dieser Ionenkanäle aufzuklären ist es deshalb wichtig, die Struktur und somit die AS-Sequenz dieser Peptide zu kennen.

Bisher waren jedoch nur drei Peptidsequenzen von ALM F50 und zwei von ALM F30 bekannt. Die HPLC Fingerprints dieser beiden Substanzen deuten jedoch aufgrund der Vielzahl der Peaks auf eine größere Mikroheterogenität der Strukturen hin. So wurden zur erneuten und erweiterten Sequenzaufklärung aus einem weiteren Züchtungsansatz von *Trichoderma viride* NRRL 3199 sowohl ALM F50 als auch ALM F30 isoliert, die drei bisher bekannten Strukturen von Alamethicin F50 verifiziert und 16 neue ALM F50 Peptaibole (I a-f, III, IV a-c, V ab, VII b, IX a-c) sequenziert [A].

In Fortsetzung dieser Arbeit und um kommerziell erhältliche Alamethicine zu charakterisieren, sollten die Primärstrukturen von ALM F30 bestätigt und weitere Strukturen unter Verwendung von HPLC-ESI-MS und GC-MS bestimmt werden [A].

Da mittels chiraler AS-Analyse nur das Vorhandensein von L-Val und L-Leu angezeigt wurde, während deren Isomere Iva und Ile nicht detektiert wurden, konnte auf eine semipräparative HPLC-Isolierung der Peptide, wie in [B] beschrieben, verzichtet werden.

Mittels analytischer HPLC konnten anhand des Elutionsprofiles 10 Peaks von ALM F30 detektiert werden (Abb. 2a in [A]). Die Nummerierung der Peaks entspricht der Bezeichnung der ermittelten Sequenzen (Abb. 4 in [A]).

Mittels on-line HPLC-ESI-MS bzw. HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2-5) im positiven und negativen Ionsierungsmodus wurden die Sequenzen der bereits beschriebenen Komponenten ALM I und II (als ALM F30/3 und ALM F30/7 in [A] bezeichnet) [138, 166] bestätigt und weitere 8 bisher unbekannte Strukturen erfolgreich sequenziert, deren charakteristische Massenfragmente in Tabelle 2 in [A] dargestellt sind. Die Molmassen der 20er Peptide mit *C*-terminalem Phenylalaninol liegen zwischen 1950 und 1992 Da. Der Großteil der Signale wurde durch HPLC-ESI-MSⁿ von den Precursor-Ionen (M+H)⁺, b₁₃, b₈ oder b₅ ermittelt, wobei zur Massendifferenzierung bis zu 5 Fragmentierungen stattfanden. Die Generation der b₇ Ionen konnte lediglich durch Direktinjektion von ALM F30 im positiven Ionisierungsmodus erreicht werden.

Die MS-Analyse im negativen Ionisierungsmodus per Direktinjektion auf M⁻ ergab eine *N*-terminale Sequenzierung und bestätigte die in früheren Arbeiten veröffentlichte Position von Pro an Position 2 nach Ac-Aib [138].

Die Sequenzen von ALM F30 1-10 und die durch HPLC ermittelten Quantitäten der einzelnen Peptide sind in Abb. 4 in [A] dargestellt. Die Sequenz ALM F30/3 entspricht der als ALM I bezeichneten Sequenz und ALM F30/7 lässt sich dem ALM II zuordnen [138, 166]. Die anhand der HPLC-Analyse ermittelte Mikroheterogenität konnte durch AS-Austausche in den Sequenzen von ALM F30 bestätigt werden, wobei der außergewöhnlichste Austausch bei ALM F30/6 nachgewiesen wurde, wo an Position Nr. 7 das Gln gegen ein Glu ersetzt ist. Unter Verwendung der Kopplung von nichtwässriger Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie gelang es

Psurek et al. [168] weitere ALM F30 Peptide nachzuweisen. Auch hier wurde neben den Hauptkomponenten ALM F30/3 und ALM F30/7 unter anderem ALM F30/6 nachgewiesen.

Ein Vergleich der sauren Peptide von ALM F30 mit den neutralen von ALM F50 (vgl. Abb. 4 in [A]) zeigte Analogien bezüglich der AS-Sequenz. Hauptunterschied ist der Glu/Gln Austausch an Position Nr. 18, woraus der saure Charakter der ALM F30-Fraktionen resultierte. Des Weiteren wurde in ALM F30 im Gegensatz zu ALM F50 kein D-Iva detektiert.

Zum Vergleich der isolierten Alamethicine ALM F30 und ALM F50 mit dem Originalmaterial von Upjohn sowie den kommerziell erhältlichen Alamethicinpräparaten von Sigma und Fluka wurden diese mittels DC analysiert (Abb. 1 in [A]). Bei den Proben von Fluka und Sigma handelte es sich eindeutig um die Komponente ALM F50, wobei in den Chemikalien-Katalogen von Fluka die Sequenz von ALM F30 angegeben wird. Die Probe von Upjohn ließ sich dem ALM F30 zuordnen. Diese Ergebnisse wurden durch die vergleichende Analyse mittels HPLC bestätigt, wobei die relativen Anteile der einzelnen Peptide etwas variierten (Abb. 2 und 3 in [A]).

4.2 Sequenzierung der Peptaibol-Antibiotika Suzukacillin A

Suzukacillin (SZ) wurde 1965 aus dem *Trichoderma viride* Stamm 63C-I von Ooka et al. isoliert [10, 169, 170]. Untersuchungen mit DC zeigten zwei Komponenten, bezeichnet als SZ-A und SZ-B [10], wobei SZ-A mittels Kristallisation isoliert wurde [171].

Erste Untersuchungen von Primärstruktur und Konformation des Suzukacillin A mittels ¹³C-NMR und enantioselektiver GC zeigten neben Aib auch das Vorkommen von D-Iva und des Aminoalkohols L-Phenylalaninol (Pheol) [17, 79]. Durch eine Kombination von trifluor-acetolytischer Spaltung, präparativer Isolierung der Fragmente und GC-MS-Analyse sowie Sequenzierung der Partialsequenzen mittels Felddesorptions- und FAB-MS wurde eine General-sequenz von SZ-A mit drei Aminosäureaustauschstellen ermittelt [171-173].

Da in den vorhergehenden Arbeiten keine individuellen Sequenzen bestimmt wurden, sollte SZ-A erneut mittels verbesserter Analytik untersucht werden. Die Primärstrukturen der SZ-A sollten unter Verwendung von analytischer HPLC, semipräparativer HPLC, kombinierter HPLC-ESI-MS sowie enantioselektiver AS-Analyse mittels GC-MS aufgeklärt werden.

Das analytische Elutionsprofil der Peptaibole auf einer Kromasil KR100 ist in Abb. 2 in [B] dargestellt. Mittels semipräparativer HPLC konnten 13 Peptaibolfraktionen getrennt werden, welche auf der Kromasil KR100 jeweils als einzelner Peak eluierten. Die Untersuchung der

Fraktionen mittels ESI-MS im positiven Ionisierungsmodus zeigte für die Fraktionen 10 und 11 eine weitere Mikroheterogenität an.

Die chirale AS-Analyse zeigte, dass D-Iva und L-Val sowie L-Leu und L-Ile in jeder Fraktion vorlagen. Da mittels ESI-MS keine Unterscheidung zwischen diesen isomeren AS möglich ist, wurde in diesen Fällen die Abkürzung Vxx für Val und Iva sowie Lxx für Leu und Ile in den Sequenzen verwendet (siehe Abb. 6 in [B]).

Mittels HPLC-ESI-MS (Abb. 3-5 in [B]) und Direktinjektion der isolierten Fraktionen unter Verwendung von CID im positiven und negativen Modus konnten die Sequenzen von 15 SZ-A Peptiden mit 19 AS und *C*-terminalem Pheol, welche Molmassen von 1909 Da bis 1979 Da aufwiesen, ermittelt werden. Die detektierten Fragment-Ionen der einzelnen Peptide sind in Tabelle 2 in [B] aufgeführt.

Die Suzukacilline zerfallen mittels positivem MS-MS von $[M+H]^+$ in ein *N*-terminales Acylium-Ion (b₁₃) und ein *C*-terminales Prolylpeptid (y₇) (Abb. 3 in [B]), resultierend aus einer für diese Substanzklasse charakteristischen Spaltung zwischen Aib und Pro [159].

Der Großteil der Fragmente wurde mittels HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2-4) im positiven Modus von $[M+H]^+$, b_{13} , y_7 , b_{10} und b_8 bestimmt. Ausgehend von diesen Fragmenten konnten die Sequenzinformationen der AS-Positionen 3-13 und 16-20 ermittelt werden (Abb. 3-5 in [B]). Ausnahme bildeten die Peptide SZ-A2, SZ-A4, SZ-A10a und SZ-A13, bei denen die b_3 -Fragmente nur mittels Direktinjektion im positiven Ionisierungsmodus ermittelt wurden.

Die Anwendung von ESI-MS-MS auf M⁻ resultierte in der Bildung der y_N Serie (N für negativer Ionisierungsmodus). Durch die detektierten Fragmente konnte neben der *N*-terminalen Acylierung von Aib¹ auch die Fragmentionen y_{19N} bis y_{12N} detektiert werden. Die Sequenzierungsergebnisse aus dem positiven Ionisierungsmodus wurden daher durch den negativen Ionisierungsmodus bestätigt und erweitert. So konnten die im positiven Ionisierungsmodus, aufgrund der stabilen Gln-Aib-Bindung nicht in jedem Fall detektierten b₇ Ionen im negativen Ionisierungsmodus aufgeklärt werden. Hierbei wurden mittels Direkt-Injektion die intensiven Signale y_{13N} und y_{12N} bestimmt, aus deren Massendifferenz m/z = 128 Da das Vorhandensein von Gln in allen Peptiden abgesichert wurde.

Die Hauptkomponente SZ-A4 zeigt die Sequenz: Ac-Aib-Ala-Aib-Ala⁶-Gln-Aib-Lxx⁹-Aib-Gly-Aib¹²-Aib-Pro-Vxx¹⁵-Aib-Vxx¹⁷-Gln-Gln-Pheol. Austausche von AS sind an den Positionen 6 (Ala/Aib), 9 (Vxx/Lx), 12 (Aib/Lxx), 17 (Aib/Vxx) und eventuell an Position 15 (Val/Iva) zu finden.

Ein Vergleich der 15 Sequenzen mit der früher veröffentlichten Generalsequenz ([172], vgl. Abb. 6 in [B]) zeigte übereinstimmende Austausche an den Positionen 6 (Ala/Aib) und 17 (Vxx/Aib). Jedoch konnte an Position 9 kein Aib, stattdessen Lxx oder Vxx detektiert werden. Des Weiteren wurde ein zusätzlicher Austausch an Position 12 (Aib/Lxx) ermittelt.

Die hier aufgeklärten SZ-A Peptide haben große sequenzielle Ähnlichkeiten mit den neutralen Peptiden von ALM F50, wobei der deutlichste Unterschied das Vorhandensein von Pro in Position 2 bei ALM F50 ist.

4.3 Sequenzierung der Trichobrachin-Peptaibiotika und kinetische Untersuchungen zur Bildung der Trichobrachine

Der als Peptaibiotika-Produzent bekannte Pilz *Trichoderma parceramosum* (syn. *Trichoderma longibrachiatum*) wurde durch Kripp [174] fermentiert und die produzierten Peptaibiotika isoliert und charakterisiert. Diese Peptaibiotika wurden in Anlehnung an den früheren Namen des Pilzes als Trichobrachine (TB) bezeichnet. Anhand des dünnschichtchromatographischen Verhaltens ergab sich für die drei Hauptfraktionen die Bezeichnung TB I, TB II und TB III. Die mikroheterogenen Peptidgruppen wurden anschließend durch präparative DC und HPLC in die Reinsequenzen TB I A-D, TB IIa A-D, TB IIb A-D und TB III A-J aufgetrennt und mittels FAB-MS sequenziert [175, 176] (siehe Abb. 6 in [D]). Dabei war bei den Peptiden der Fraktionen I und IIa kein Aminoalkohol vorhanden und die Zuordnung der *C*-Termini bei verschiedenen Peptiden der Gruppe TB III nicht möglich.

Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit durch eine erneute Fermentation von *Trichoderma parceramosum* CBS 936.69 und Isolation der Peptaibiotika die bekannten Sequenzen bestätigt sowie die nicht komplett aufgeklärten Strukturen ergänzt werden. Des Weiteren sollten Bildung und Abbau der Trichobrachin-Gruppen in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer geklärt werden.

Zur Isolierung der Trichobrachine wurde eine Kultur von *Trichoderma parceramosum* in Malzextrakt-Medium eingesetzt. Ein Teil der nach Aufreinigung mittels XAD-2 und Sephadex LH-20-Säulenchromatographie erhaltenen Reinsubstanz des Trichobrachin-Gemisches wurde mittels präparativer DC in die Peptaibiotika-Gruppen aufgetrennt und in Analogie zu Kripp [174] anhand ihrer ansteigenden R_{f} -Werte als TB I, TB II und TB III bezeichnet (siehe Abb. 1 in [D]).

Die Primärstruktur der einzelnen Peptaibiotika wurde anschließend unter Verwendung von HPLC-UV, HPLC-ESI-MS und GC-MS aufgeklärt.

Die Bestimmung der AS-Zusammensetzung und der Aminoalkohole erfolgte durch chirale AS-Analyse mittels GC-MS (Abb. 2 in [D]). In allen 3 Peptaibiotika-Gruppen konnten Aib und D-Iva detektiert werden. Während in TB I kein Aminoalkohol detektiert wurde, waren in TB II L-Pheol und in TB III sowohl L-Leuol, L-Ileol als auch L-Valol vorhanden. Für TB III wurde die Anwesenheit von L-Leu, L-Ile, L-Val und D-Iva festgestellt.

Da im ESI-MS keine Unterscheidung zwischen L-Leu und L-Ile, L-Leuol und L-Ileol und den in allen Trichobrachin-Gruppen gemeinsam vorhandenen D-Iva und L-Val möglich ist, wurde in diesen Fällen wie auch in [B, C] die Abkürzungen Lxx, Lxxol sowie Vxx verwendet (siehe Abb. 5 in [D]).

Eine Bestimmung der Positionen der als Lxx und Vxx bezeichneten isomeren AS wäre durch eine Generierung von Dipeptid-Methylestern aus den Peptaibiotika, gefolgt von einer Detektion der Dipeptide mittels GC-MS möglich [177]. Allerdings war eine semipräparative HPLC zur Gewinnung von Einzelfraktionen bei TB III aufgrund der großen Mikroheterogenität des Komplexes (vgl. Abb. 3 in [D]) nicht sinnvoll anzuwenden.

Die Elutionsprofile auf einer Kromasil KR100 Säule zeigten für TB I 8 Peaks, für TB II 10 Peaks und für TB III 18 Peaks (vgl. Abb. 3 in [D]).

Zur Sequenzierung der Peptide wurde sowohl HPLC-ESI-MS als auch ESI-MS mittels Direktinjektion im positiven und negativen Modus angewendet.

Im Gegensatz zu Trichobrachin I und II, wo die erzeugten Tochterionen ausnahmslos zur b- und y-Serie gehörten (Abb. 4 in [D]), konnten die Peptide von TB III nur durch hoch-energetischen Zerfall in der a-Serie bestimmt werden (Abb. 4 in [D]). Positive HPLC-ESI-MSⁿ von $(M+Na)^+$ sowie von den Fragmentionen a₉ und a₇ ergaben den Hauptteil der Fragmente. Im negativen Ionisierungsmodus entstand, wie in [A] und [B] beschrieben, eine y_N-Serie.

Für TB I wurden die Sequenzen von 10 acetylierten Peptiden mit 19 AS in Abwesenheit eines Aminoalkohols analysiert. Die Peptide TB II-1 und TB II-2 wurden aus 18 AS ohne Aminoalkohol, die Peptide TB II-3 bis TB II-10 aus 19 AS und L-Pheol gebildet. Für Trichobrachin III konnten die Sequenzen von 34 11er-Peptiden mit *C*-terminalem L-Lxxol bzw. L-Valol bestimmt werden. Die Sequenzen der Peptide von TB I – III sind in den Abbildungen 5 in [D] dargestellt.

Der Großteil der in der Literatur beschriebenen Sequenzen von TB II wurde dabei bestätigt (Abb. 6 in [D]) [175, 176]. Die Sequenzen von TB I-1 und TB I-2 sowie TB II-1, TB II-3 und TB II-6 wurden neu beschrieben. Die Abwesenheit eines Aminoalkohols am *C*-Terminus der Peptide von

TB I konnte ebenfalls bestätigt werden, während die als vermutliche Abbauprodukte [175, 176] von TB IIa ermittelten Peptide in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 6 in [D]).

Die kurzkettigen Peptaibole von TB III konnten teilweise mit den Ergebnissen von Brückner et al. [176] abgeglichen werden, allerdings war ein genauer Vergleich der Sequenzen aufgrund der in diesem Fall nicht zugeordneten isobaren AS nicht möglich. Die Sequenzen TB III A und B [176] waren nicht nachweisbar. Der in einigen Sequenzen von Brückner et al. [176] nicht zugeordnete *C*-terminale Rest von m/z = 199 Da wurde als Pro-Valol identifiziert.

In einem weiteren Züchtungsansatz war während einer 20-tägigen Fermentation von *Trichoderma parceramosum* durch eine tägliche Probennahme und Analyse mittels DC, GC-MS und HPLC-UV eine schnell einsetzende Peptaibiotika-Produktion zu beobachten. Die Peptaibiotika-Gruppen TB II und TB III waren sowohl im Dünnschichtchromatogramm als auch bei der HPLC-Analyse bereits ab dem 2. Wachstumstag sichtbar (vgl. Abb. 1 [D]). Ab dem 5. Wachstumstag konnte mittels DC auch TB I detektiert werden, welches bis zum 20. Wachstumstag erkennbar war. Im Gegenzug wurde TB II mit steigender Dauer der Fermentation in immer geringerer Konzentration detektiert. TB III wurde während der gesamten Versuchsdauer von *Trichoderma parceramosum* gebildet.

Eine gaschromatographische Analyse der AS des Extraktes nach Totalhydrolyse zeigte das Vorhandensein von Aib ab dem 2. Wachstumstag. Der Aminoalkohol L-Pheol konnte ebenfalls ab dem 2. Fermentationstag detektiert werden, wobei die Konzentration ab dem 5. Fermentationstag abnahm. Hiermit konnte die dünnschichtchromatographische Detektion von TB II zusätzlich bestätigt werden. Die in TB III enthaltenen Aminoalkohole L-Leuol, L-Ileol und L-Valol waren nach dem 2. Fermentationstag während der gesamten weiteren Versuchsdauer im Mycelextrakt mittels GC-MS nachweisbar.

Die zur Sequenzaufklärung begleitende Überwachung der Peptaibiotika-Produktion und des Abbaus offenbarte, dass die Peptide von TB I sowie TB II Nr. 1 und 2 mit *C*-terminalem Gln durch Abbau aus den Peptaibolen TB II 3-10 entstanden. Durch die Abspaltung des *C*-terminalen L-Pheol bei TB II 3-10 resultierten die Peptide von TB I, ein weiterer Verlust von Gln¹⁹ resultierte in den Sequenzen TB II 1 und 2.

Der Zeitpunkt der Probennahme kann neben den Fermentationsbedingungen, wie z.B. Dauer der Fermentation, Temperatur und Lichteinfluss entscheidend über das Vorhandensein bestimmter Peptaibiotika-Gruppen in den untersuchten Extrakten sein. Eine zu kurze oder zu lange Fermentation kann somit zum Verlust von Peptaibiotika-Gruppen führen, was wiederum in einer schlechteren Reproduzierbarkeit der Peptid-Zusammensetzung eines Peptaibiotikum resultiert.
4.4 Peptaibiomics – eine schnelle und selektive Screeningmethode auf die Bildung von Peptaibiotika

Durch die Problematik der chemischen Pestizide, die häufig als gesundheits- und umweltschädigend bekannt sind, gewinnen Peptaibiotika-produzierende Schimmelpilze aufgrund ihres Einsatzes im biologischen Pflanzenschutz zunehmend an Bedeutung [1, 2, 178]. Auch durch die zunehmende Resistenz von Mikroorganismen gegen etablierte Antibiotika besteht ein Interesse, neue Wirkstoffe mit neuartigen Strukturen und Bioaktivitäten zu finden [7]. Daher bedarf es einer schnellen und aussagekräftigen Screeningmethode, um Ergebnisse zur Fähigkeit der Peptaibiotika-Produktion von Schimmelpilzen zu erhalten. Dabei stand im Vordergrund, dass mit diesem Screening eine Unterscheidung zwischen bereits bekannten und neuen Peptaibiotika-Produzenten durch Teilsequenzierung der Peptaibiotika möglich sein sollte.

In Anlehnung an die gängigen Bezeichnungen Proteomics bzw. Peptidomics als Zusammenfassung aller Analysen und Studien der Proteine und Peptide, welche in einer Zelle gebildet werden, wurde die Bezeichnung Peptaibiomics für die Analyse der von einem Schimmelpilze produzierten Gesamtheit an Aib-haltigen Peptiden definiert. Die Expression der Peptaibiotika durch den Multienzymkomplex eines Schimmelpilzes wird als Peptaibiom definiert.

Hierfür war die Entwicklung und Durchführung einer Methode erforderlich, die es ermöglichte, Teilsequenzen schnell und unter Verwendung von geringen Mengen an Probenmaterial aufzuklären.

Nach der Anzucht der Schimmelpilze auf einer Nähragarplatte wurden die lipophilen Peptaibiotika durch Extraktion mit MeOH/CH₂Cl₂ und anschließender Festphasenextraktion an einer RP-18-Kartusche isoliert und angereichert [25].

Unter Verwendung der Umkehrphasen-HPLC an einer RP-8 Säule mit einem Gradientensystem, bestehend aus Methanol, Acetonitril und Wasser angesäuert mit TFA, war eine Trennung und Detektion mittels HPLC von kurz- und langkettigen, neutralen und sauren Peptaibiotika in einem Analysenlauf möglich. Das Gradientenprogramm ist in Tabelle 1 in [C] dargestellt.

Die Untersuchung mittels HPLC-ESI-MS im positiven Ionisierungsmodus ermöglichte es, im aufgereinigten Mycelextrakt Teilsequenzen der enthaltenen Peptaibiotika zu ermitteln. Die Molmassen der einzelnen Peptaibiotika wurden ohne zusätzliche Kollisionsenergie (CID) bestimmt, während eine Fragmentierung mit einer CID von 45% erreicht wurde.

Die Detektion der Peptaibiotika erfolgte anhand von Molmassen und Massendifferenzen von Fragmentionen. Hierbei diente die Massendifferenz von $\Delta m = 85,1$ Da (Aib-H₂O) der Detektion

der Markeraminosäure Aib und somit dem Vorhandensein von Peptaibiotika im Mycelextrakt. Mit dieser Screeningmethode ist eine komplette Sequenzierung in der Regel nicht möglich, wie z.B. bei den *N*-Termini der Sequenzen, so dass in diesen Fällen die Massendifferenzen notiert wurden.

Da ferner mittels ESI-MS keine Unterscheidung der isobaren AS möglich war, wurden in diesen Fällen die Bezeichnungen Lxx für Leu und Ile bzw. Vxx für Val und Iva verwendet (vgl. Abb. 1 und 3 in [C]).

Mittels chiraler GC-MS AS-Analytik nach Totalhydrolyse konnten zusätzliche Informationen, wie z.B. das Gesamtaminosäurespektrum und das Vorkommen von Aminoalkoholen, erhalten werden.

Durch Anwendung dieser Screening-Methode wurden Pilze der Gattungen *Trichoderma* und *Hypocrea* auf die Produktion von Peptaibiotika untersucht und die erhaltenen Teilsequenzen mit den Sequenzen bereits aufgeklärter Peptaibiotika in der Peptaibol-Datenbank [12, 13] verglichen, so dass eine Aussage über bekannte oder neue Peptaibiotika und deren Produzenten möglich war. Hierbei wurden auch die ermittelten Molmassen der Peptaibiotika herangezogen, was den Vergleich in der Peptaibol-Database vereinfachte und absicherte.

Die Teilsequenzen für *Trichoderma asperellum*, *Tr. inhamatum*, *Tr. aggressivum* f. *europaeum* und *Tr. stromaticum* sind in Abbildung 1 in [C] dargestellt. In allen Mycelextrakten konnte die Massendifferenz $\Delta m = 85,1$ Da und somit Aib detektiert werden. Als Beispiel ist das Elutionsprofil sowie ein Massenspektrum von *Trichoderma asperellum* in Abbildung 2 in [C] dargestellt. Das Screening ergab, dass es sich bei den von *Tr. asperellum* produzierten Peptaibiotika um bekannte Strukturen aus der Gruppe der Trichotoxine [27] handelte (vgl. Abb. 5 in [C]). Auch bei *Tr. aggressivum* f. *europaeum* wiesen einige Teilsequenzen Übereinstimmungen mit den Peptaibolen von Hypomurocin, gebildet von *Hypocrea muroiana* [84], auf. In den ermittelten Teilsequenzen von *Tr. stromaticum* konnten in der Peptaibol-Database keine bekannten Teilsequenzen zugeordnet werden. Zudem wiesen alle untersuchten Pilzkulturen neue Teilsequenzen in den mikroheterogenen Peptaibiotika-Mischungen auf.

In den Extrakten der Schimmelpilze *Hypocrea semiorbis, Hyp. vinosa, Hyp. dichromospora, Hyp. gelatinosa, Hyp. nigricans, Hyp. muroiana* und *Hyp. lactea* wurde ebenfalls mittels HPLC-ESI-MS die Marker-AS Aib detektiert. Von den im positiven Ionisierungsmodus erhaltenen Fragmenten ließen sich Teilsequenzen ableiten (Abb. 3 in [C]) und Aussagen über bekannte oder neue Peptaibiotika-Produzenten treffen. *Hyp. vinosa* und *Hyp. lactea* produzierten Peptaibole aus der Gruppe der Trichogine und Trikoningine [32, 179] (vgl. Abb. 5 in [C]). Für die weiteren Teilsequenzen der verschiedenen *Hypocrea*-Stämme wurden keine Ähnlichkeiten mit bekannten Peptaibiotika festgestellt, so dass diese Teilsequenzen neue Strukturen repräsentieren.

Zur Untersuchung der Schimmelpilze auf Peptaibiotika-Produktion wurde somit eine schnelle und aussagekräftige Screeningmethode erstellt, um die Primärstruktur bzw. Teile der Peptaibiotika-Strukturen aufzuklären.

Die Festphasenextraktion an einer RP-18 Kartusche diente dabei der Aufreinigung des Mycelextraktes und der Anreicherung der Peptaibiotika. Somit war eine Verwendung dieses Extraktes für das Screening mittels HPLC-ESI-MS möglich.

Durch die Analyse "direkt" von der vollbewachsenen Nähragarplatte entfällt somit die bislang übliche Anzucht im größeren Volumen, d.h. die direkte Anwendung dieser Screening-Methode ist sowohl Zeit als auch Material sparend. Der Vergleich mit bekannten Sequenzen aus der Peptaibol-Database lässt auf bekannte oder neue Produzenten schließen. Somit ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl an Schimmelpilzen auf Peptaibiotika-Produktion zu untersuchen und damit sowohl neue und interessante Produzenten zu identifizieren, als auch neue Strukturen sowie deren unterschiedliche Wirkungen aufzuklären. Dabei können Schimmelpilze, die bereits biotechnologisch eingesetzt, erfolgreich in der biologischen Kontrolle verwendet oder auch als Kontaminanten in Lebens- und Futtermitteln gefunden werden, auf Peptaibiotika-Produktion untersucht werden. Neue und bereits bekannte Peptaibiotika-Produzenten können ferner auf ihre Möglichkeit, in der biologischen Kontrolle Einsatz zu finden, überprüft werden. Weiterhin sind auch Veränderungen in den Anzuchtbedingungen der Schimmelpilze, wie z.B. verschiedene Nährmedien, Temperaturveränderung oder Einflüsse der Beleuchtung auf die Peptaibiotika-Produktion schnell und effizient bestimmbar und dokumentierbar.

Außerdem sollte auch eine einfache Erweiterung der "Peptaibol-Database" [12, 13] oder eine Ausweitung generell auf Peptaibiotika angedacht werden, da immer mehr Sequenzen mit komplexen *C*-Termini aufgeklärt werden [11, 15].

Mit der Aufklärung der Struktur der Peptaibiotika und den dazugehörigen Bioaktivitätsprüfungen kann letzten Endes ein wichtiger wissenschaftlicher Beitrag zum strukturabhängigen Mechanismus der entsprechenden antibiotischen Wirkung erzielt werden.

5 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Peptaibiotika sind lipophile Peptidantibiotika des Sekundärstoffwechsels von Schimmelpilzen, die die nicht-proteinogene Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib) enthalten und eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten aufweisen. Eine Untergruppe der Peptaibiotika sind die Peptaibole, die in ihrer Struktur einen *C*-terminalen Aminoalkohol aufweisen.

Die Isolation, Detektion und Analyse neuer Peptaibiotika wurde unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie (DC), der (semipräparativen) Hochauflösenden Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) sowie der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS), welche eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung der Peptaibiotika ermöglicht, durchgeführt. Zur Bestimmung der Primärstruktur der Peptaibiotika wurde die Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) bzw. multiple MS (ESI-MSⁿ) im positiven und negativen Ionisierungsmodus eingesetzt, womit charakteristische Massenfragmente erhalten wurden.

Unter Anwendung dieser Isolations-, Analysen- und Strukturaufklärungsmethoden konnten neue Sequenzen der Peptaibole Alamethicin F30, Suzukacillin A und Trichobrachin bestimmt werden.

Aus dem mikroheterogenen Peptaibol-Gemisch Alamethicin F30, isoliert aus *Trichoderma viride* NRRL 3199, wurden die Sequenzen von acht neuen Komponenten und den beiden in der Literatur bekannten Hauptkomponenten, bestehend aus 19 Aminosäuren und dem Aminoalkohol L-Phenylalaninol (L-Pheol), aufgeklärt bzw. abgesichert. Bei einem Vergleich der Alamethicine F30 und F50 mit kommerziell erhältlichen Alamethicinpräparaten konnte die Probe von Upjohn dem Alamethicin F30 und die Proben von Fluka und Sigma dem Alamethicin F50 zugeordnet werden.

Für Suzukacillin A, isoliert aus *Trichoderma viride*, strain 63 C-I, konnten mittels HPLC-ESI-MS mehr als 90% der Peptide neu aufgeklärt und differenziert werden. Es wurden die Sequenzen von 15 Suzukacillin A Peptiden, mit 19 Aminosäuren und dem *C*-terminalem Aminoalkohol Pheol, ermittelt. Ein Vergleich zur vormals publizierten Generalstruktur zeigte einen zusätzlichen Austausch an Position 12 (Aib/Leu bzw. Ile), während an Position 9 kein Aib sondern lediglich Leu bzw. Ile und Val bzw. Iva gefunden werden konnte.

Zur Analyse der Trichobrachine (TB) wurde der Schimmelpilz *Trichoderma parceramosum* CBS 936.69 in Submers-Kultur angezogen, die gebildeten Peptaibiotika aufgereinigt und die TB-Gruppen I-III mittels semipräparativer DC isoliert. Für die Fraktion TB I wurden Sequenzen von 10 acetylierten Peptiden mit je 19 Aminosäuren ohne Aminoalkohol bestimmt. In der TB-Gruppe

II bestanden die Peptide TB II-1 und TB II-2 aus 18 Aminosäuren und die Peptide TB II-3 bis TB II-10 aus 19 Aminosäuren und dem *C*-terminalen Aminoalkohol L-Pheol. In der TB-Gruppe III wurden Sequenzen von insgesamt 34 11er-Peptiden mit den *C*-terminalen Aminoalkoholen L-Leuol/L-Ileol bzw. L-Valol bestimmt. In Fermentationsexperimenten konnten zeitabhängig die Prinzipien der Bildung und des Abbaus der TB-Gruppen geklärt werden. Die Peptide von TB I sowie TB II-1 und TB II-2, welche keinen *C*-terminalen Aminoalkohol aufwiesen, entstanden somit durch Abbau aus den Peptiden TB II 3-10.

Zur Untersuchung der Peptaibiotika-Produktion verschiedener Schimmelpilze wurde eine schnelle und aussagekräftige Screeningmethode entwickelt. Die dabei für das Screening verwendeten Methoden werden im Begriff **Peptaibiomics** zusammengefasst. Dies umfasst sowohl die Aufreinigung des von einer vollbewachsenen Nähragarplatte gewonnenen Mycelextraktes mittels Festphasenextraktion, als auch die Verwendung von HPLC-UV und HPLC-ESI-MS. Hiermit konnten Peptaibiotika erfasst und Teilsequenzen ermittelt werden, mit denen anhand eines Vergleiches mit bereits bekannten Strukturen in einer Peptaibol-Database Aussagen über bekannte oder neue Peptaibiotika-Produzenten getroffen werden konnten.

Mit dieser Screening-Methode wurden Pilze der Gattung *Trichoderma*, welche schon im biologischen Pflanzenschutz eingesetzt werden, sowie Pilze der Gattung *Hypocrea* auf die Produktion von unbekannten Peptaibiotika untersucht. Dabei konnten in allen Mycelextrakten Peptaibiotika detektiert werden. Neben bereits bekannten Peptaibiotika, wie den Trichotoxinen, Hypomurocinen sowie Trichoginen und Trikoninginen, wurden in allen Mycelextrakten auch neue Strukturen nachgewiesen.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit Tests auf mikrobiologische Aktivitäten in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Peptaibiotika gegen *Bacillus subtilis* unter Verwendung von Mikrotiterplatten etabliert.

Die in ihrer Struktur vollständig aufgeklärten Peptaibiotika Alamethicin, Suzukacillin A und Trichobrachin zeigten deutliche hemmende Wirkungen auf das Bakterienwachstum, wobei Alamethicin F50 die höchste antibiotische Aktivität aufwies. Ein Vergleich der Wirkungen bewies, dass das Vorhandensein eines Aminoalkohols in der Struktur der Hemmsubstanzen die antibiotische Aktivität fördert.

Des Weiteren wurde die Strukturabhängigkeit der biologischen Wirksamkeit von synthetischen Alamethicin-Analoga im Vergleich zu den natürlichen Alamethicinen untersucht. So konnte eine Korrelation zwischen der gesteigerten Membranaktivität der synthetischen Alamethicine und deren antibiotischen Aktivität gegen *Bacillus subtilis* gezeigt werden.

Literatur

- [1] Wainwright (1995) Biotechnologie mit Pilzen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Seiten 3-4, 21, 174, 175, 179.
- [2] Butt TM, Copping LG (2000) Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook* **10**:186-191.
- [3] Papavizas GC (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* **23**: 23-54.
- [4] Yedidia I, Benhamou N, Chet I (1998) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Envirom*. *Microbiol.* **65**: 1061-1070.
- [5] Monte E (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* **4**: 1-4.
- [6] Harman G, Jin X, Stasz T, Peruzzotti G, Leopold A, Taylor AG (1991) Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biol. Control* 1: 23-28.
- [7] Finking R, Marahiel MA (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 453-488.
- [8] Brückner H, Przybylski M (1984) Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **296**: 263-275.
- [9] Brückner H, Maisch J, Reinecke C, Kimonyo A (1991) Use of α-aminoisobutyric acid and isovaline as marker amino acids for detection of fungal polypeptide antibiotics. Screening of *Hypocrea*. *Amino Acids* 1: 251-257.
- [10] Ooka T, Shimojima Y, Akimoto T, Senoh S, Abe J (1966) A new antibacterial peptide "suzukacillin" formation. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 19-27.
- [11] Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Zsuzsanna A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi CS (2005) Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 52: 137-168.
- [12] Whitmore L, Chugh JK, Snook CF, Wallace BA (2003) The Peptaibol Database: A sequence and structure resource. *J. Peptide Sci.* **9**: 663-665.
- [13] Database (2006) Peptaibol Database http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml (Stand 01.04.2006).
- [14] 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.
- [15] Degenkolb T, Berg A, Gams W, Schlegel B, Gräfe U (2003) The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Peptide Sci.* **9**: 666-678.
- [16] Brückner H, Graf H (1983) Paracelsin, a peptide antibiotic containing α-aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons. Part A. *Experientia* **39**: 528-530.
- [17] 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.

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Chikanishi T, Hasumi K, Harada T, Kawasaki N, Endo A (1997) Clonostachin, a novel peptaibol that inhibits platelet aggregation. *J. Antibiot.* **50**: 105-110.
- [22] Arai T, Mikami Y, Fukushima K, Utsui T, Yazawa K (1973) A new antibiotic, leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. J. Antibiot. **3**: 157-161.
- [23] Leclerc G, Goulard C, Prigent Y, Bodo B, Wróblewski H, Rebuffat S (2001) Sequences and antimycoplasmic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Nat. Prod. **64**: 164-170.
- [24] Chugh JK, Wallace BA (2001) Peptaibols: models for ion channels. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 565-570.
- [25] Brückner H, Przybylski M (1984) 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.
- [26] Benedetti E, Bavoso A, Di Blasio B, Pavone V, Pedone C, Toniolo C, Bonora GM (1982) Peptaibol antibiotics: A study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 7951-7954.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Pandey RC, Meng H, Cook JC, Rinehart KL (1977) Structure of Antiamoebin I from high resolution field desorption and gas chromatographic mass spectrometry studies. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 5203-5205.
- [30] Augeven-Bour I, Rebuffat S, Auvin C, Goulard C, Prigent Y, Bodo B (1997) Harzianin HB I, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**: 1587-1594.
- [31] Toniolo C, Crisma M, Formaggio F, Peggion C, Epand RF, Epand RM (2001) Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1179-1188.
- [32] Auvin-Guette C, Rebuffat S, Prigent Y, Bodo B (1992) Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Am. Chem. Soc. **114**: 2170-2174.
- [33] 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.

- [34] Gräfe U, Ihn 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.
- [35] Fukushima K, Arai T, Mori Y, Tsubai M, Suzuki M (1983) Studies on peptide antibiotics, leucinostatins II. The structure of leucinostatins A and B. *J. Antibiot.* **36**: 1613-1630.
- [36] 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.
- [37] Bullough DA, Jackson CG, Henderson PJF, Beechey RB, Linnett PE (1982) The isolation and purification of the elvapeptins. A family of peptide inhibitors of mitochondrial ATPase activity. *FEBS Lett.* **145**: 258-262.
- [38] 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.
- [39] Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H (2003) Sequences of Alamethicin F30 and F50 Reconsidered and Reconciled. *J. Peptide Sci.* **9**: 799-809.
- [40] Brückner H, Jung G, Przybylski M (1983) Chromatographic and mass spectrometric characterisation of the structures of the polypeptide antibiotics samarosporin and stilbellin and identity with emerimicin. *Chromatographia* **17**: 679-685.
- [41] Rinehart KL, Gaudioso LA, Moore ML, Pandey RC, Cook JC, Barber M, Sedgwick RD, Bordoli RS, Tyler AN, Green BN (1981) Structures of eleven zervamicin and two emerimicin peptide antibiotics studied by fast atom bombardment mass spectrometry. J. Am. Chem. Soc. 103: 6517-6520.
- [42] Rebuffat S, Goulard C, Bodo B (1995) Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**: 1849-1855.
- [43] Wada S, Iida A, Akimoto N, Kanai M, Toyama N, Fujita T (1995) Fungal metabolites. XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, trichorovins-I-XIV, from the fungus *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 910-915.
- [44] 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.
- [45] Lee SJ, Yun BS, Cho DH, Yoo ID (1999) Tylopeptins A and B, new antibiotic peptides from *Tylopilus neofelleus*. *J Antibiot*. **52**: 998-1006.
- [46] Mathew MK, Balaram P (1983) A helix dipole model for alamethicin and related transmembrane channels. *FEBS Lett.* **157**: 1-5.
- [47] Whitmore L, Wallace BA (2004) Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. *Eur. Biophys. J.* **33**: 233-237.
- [48] Wysong CL, Yokum TS, McLaughlin ML, Hammer RP (1997) Controlling peptide structure. *Chemtech.* 27: 26-33.
- [49] Zhang L, Hermans J (1994) 3₁₀ Helix versus α-Helix: a molecular dynamics study of conformational preferences of Aib and Alanine. J. Am. Chem. Soc. 116: 11915-11921.
- [50] Toniolo C, Benedetti E (1991) The polypeptide 3₁₀-helix. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 350-353.

- [51] Bavoso A, Benedetti E, Di Blasio B, Pavone V, Pedone C, Toniolo C, Bonora GM, Formaggio F, Crisma M (1988) Long, chiral polypeptide 3₁₀-helices at atomic resolution. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5: 803-810.
- [52] Rebuffat S, Goulard C, Bodo B, Roquebert M-F (1999) The peptaibol antibiotics from *Trichoderma* soil fungi; structural diversity and membrane properties. *Recent Research Developments Organic and Bioorganic Chemistry* **3**: 65-91.
- [53] Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, Bodo B, Kenerley C (2002) Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol Synthetase. J. Biol. Chem. 277: 20862-20868.
- [54] Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 275-287.
- [55] Reiber K, Neuhof T, Ozegowski JH, von Döhren H, Schwecke T (2003) A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*. J. Peptide Sci. 9: 701-713.
- [56] Lipmann F (1973) Nonribosomal polypeptide synthesis of polyenzymes templates. *Acc. Chem. Res.* **6**: 361-367.
- [57] Kleinkauf H (1980) Die Biosynthese von Antibiotika-Peptiden. *Chem. unserer Zeit* **4**: 105-114.
- [58] Mohr H, Kleinkauf H (1978) Alamethicin biosynthesis. Acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochim. Biophys. Acta* **526**: 375-386.
- [59] Kleinkauf H, von Döhren H (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* **192**: 1-15.
- [60] Zuber P (1992) Non-ribosomal peptide synthesis. Curr. Op. Cell Biol. 3: 1046-1050.
- [61] Mootz HD, Marahiel MA (1997) Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembling. *Curr. Op. Chem. Biol.* 1: 543-551.
- [62] Raap J, Erkelens K, Ogrel A, Skladnev DA, Brückner H (2005) Fungal biosynthesis of non-ribosomal peptide antibiotics and α,α -dialkylated amino acid constituents. *J. Peptide Sci.* **11**: 331-338.
- [63] von Döhren H, Dickmann R, Pavela-Vranicic M (1999) The nonribosomal code. *Chem. Biol.* **6**: R273-R279.
- [64] Cane DE (1997) A special thematic issue on polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. *Chem. Rev.* **97**: 2463-2464.
- [65] Konz D, Marahiel MA (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.* **6**: R39-R48.
- [66] Dornberger K, Ihn W, Ritzau M, Gräfe U, Schlegel B, Fleck WF (1995) Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysosperma* Ap101. J. Antibiot. **48**: 977-989.
- [67] Boheim G, Janko K, Leibfritz D, Ooka T, König W, Jung G (1976) Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part B. Pore formation in black lipid films. *Biochim. Biophys. Acta* 433: 182-199.
- [68] 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.

- [69] Sansom MSP (1993) Alamethicin and related peptaibols model ion channels. *Eur. Biophys. J.* **22**: 105-124.
- [70] Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell nonselective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 55-70.
- [71] Grigoriev PA, Schlegel B, Kronen M, Berg A, Härtl A, Gräfe U (2003) Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J. Pepide Sci.* **9**: 763-768.
- [72] Engelberth J, Koch T, Kühnemann S, Boland W (2000) Ionenkanalbildende Peptaibole sind hochwirksame Elicitoren des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels und der Rankenkrümmung. *Angew. Chem.* **112**: 1928-1030.
- [73] Duclohier H, Wróblewski H (2001) Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues. *J. Membrane Biol.* **184**: 1-12.
- [74] Tieleman DP, Sansom MS, Berendsen HJ (1999) Alamethicin helices in a bilayer and in solution: Molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **76**: 40-49.
- [75] 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.
- [76] Chugh K, Brückner H, Wallace BA (2002) Model for a helical bundle channel based on the high-resolution crystal structure of trichotoxin_A50E. *Biochemistry* **41**: 12934-12941.
- [77] Duclohier H, Alder GM, Bashford CL, Brückner H, Chugh JK, Wallace BA (2004) Conductance studies on trichotoxin A50E and implications for channel structure. *Biophys. J.* 87: 1705-1710.
- [78] Grigoriev PA, Schlegel R, Dornberger K, Gräfe U (1995) Formation of membrane channels by chrysospermins, new peptaibol antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **1237**: 1-5.
- [79] Jung G, Dubischar N, Irmscher G, Mayr W, Oekonomopulos R (1977) Membranmodifizierende Peptidantibiotika aus Stämmen des Fadenpilzes *Trichoderma viride*. *Chem. Ztg.* **101**: 196-201.
- [80] Grigoriev PA, Berg A, Schlegel B, Heinze S, Gräfe U (2002) Formation of anionselective membrane pores by texenomycin A, a basic lipopeptaibol antibiotic. J. Antibiot. 55: 826-828.
- [81] Nagaraj R, Balaram P (1981) Alamethicin, a transmembrane channel. *Acc. Chem. Res.* 14: 356-362.
- [82] Jung G, Redemann T, Kroll K, Meder S, Hirsch A, Boheim G (2003) Template-free selfassembling fullerene and lipopeptide conjugates of alamethicin form voltage-dependent ion channels of remarkable stability and activity. *J. Peptide Sci.* **9**: 784-798.
- [83] Bessler WG, Ottenbreit B, Irmscher G, Jung G (1979) Interaction of membrane modifying peptide antibiotics from *Trichoderma viride* with leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**: 99-105.
- [84] Becker D, Kieß M, Brückner H (1997) Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Anal. Chem./Receuil* **1997**: 767-772.
- [85] 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.

- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] Jackson CG, Linnett PE, Beechey RB, Henderson PJF (1979) Purification and preliminary structural analysis of the effrapeptins, a group of antibiotics that inhibit the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem. Soc. Trans.* 7: 224-226.
- [90] Nagaraj G, Uma MV, Shivayogi MS, Balaram H (2001) Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **45**: 145-149.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] Kronen M, Kleinwächter P, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U (2001) Ampullosporins B, C, D, E₁, E₂, E₃ and E₄ from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053: structures and biological activities. *J. Antibiot.* **54**: 175-178.
- [94] 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.
- [95] 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.
- [96] Argoudelis AD, Johnson LE (1974) Emerimicins II, III and IV, antibiotics produced by *Emericellopsis microspora* in media supplemented with *trans*-4-*n*-propyl-L-proline. *J. Antibiot.* **27**: 274-282.
- [97] Lee SJ, Yeo WH, Yun B-S, Yoo ID (1999) Isolation and sequence analysis of new peptaibol, Boletusin, from *Boletus* spp.. J. Peptide Sci. 5: 374-378.
- [98] Argoudelis AD, Dietz A, Johnson LE (1974) Zervamicins I and II, polypeptide antibiotics produced by *Emericellopsis salmosynnemata*. J. Antibiot. **27**: 321-328.
- [99] Fuji K, Fujita E, Takaishi Y, Fujita T, Arita I, Komatsu M, Hiratsuka N (1978) New antibiotics trichopolyns A and B: Isolation and biological activity. *Experientia* **34**: 237-239.
- [100] Thirumalachar MJ (1968) Antiamoebin, a new antiprotozoal-anthelmintic antibiotic Part-I. Production and biological studies. *Hindustan Antibiot. Bull.* **10**: 287-289.
- [101] El Hajji M, Rebuffat S, Doan TL, Klein G, Satre M, Bodo B (1989) Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta* **978**: 97-104.

- [102] Park J-O, Hargreaves JR, McConville EJ, Stirling GR, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K (2004) Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 271-275.
- [103] Yun B-S, Yoo I-D, Kim YH, Kim Y-S, Lee S-J, Kim K-S, Yeo W-H (2000) Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. *Tetrahedron Lett.* 41: 1429-1431.
- [104] Kim YH, Yeo W-H, Kim Y-S, Chae S-Y, Kim K-S (2000) Antiviral activity of antibiotic peptaibols, Chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection. J. Microbiol. Biotechnol. 10: 522-528.
- [105] Reiber K (2003) Studien zur Biosynthese des fungalen Sekundärmetaboliten Ampullosporin und Untersuchungen der Kultivierungsbedingungen des Produzenten Sepedonium ampullosporum. Dissertation. Universität Jena.
- [106] Nguyen HH, Imhof D, Kronen M, Gräfe U, Reissmann S (2003) Circular dichroism studies of ampullosporin-A analogues. J. Peptide Sci. 9: 714-728.
- [107] Berg A, Grigoriev PA, Degenkolb T, Neuhof T, Härtl A, Schlegel B, Gräfe U (2003) Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276. *J. Peptide Sci.* **9**: 810-816.
- [108] Krasnoff SB, Gupta S, Leger RJ, Renwick JAA, Roberts DW (1991) Antifungal and insecticidal properties of the Efrapeptins: metabolites of the fungus *Tolypocladium niveum*. J. Invertebr. Pathol. 58: 180-188.
- [109] Matha V, Weiser J, Olejnicek J (1988) The effect of tolypin in *Tolypocladium niveum* crude extract against mosquito and blackfly larvae in the laboratory. *Folia Parasitol.* **35**: 379-381.
- [110] 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.
- [111] Razin, S (1992) Mycoplasma taxonomy and ecology. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB (Eds.). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 3-22.
- [112] Béven L und Wróblewski H (1997) Effect of natural amphipatic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Res. Microbiol.* **148**: 163-175.
- [113] Béven L, Duval D, Rebuffat S, Riddell FG, Bodo B, Wróblewski H (1998) Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA. *Biochim. Biophys. Acta* 1372: 78-90.
- [114] Duclohier H, Kociolek K, Stasiak M, Leplawy MT, Marshall GR (1999) *C*-terminally shortened alamethicin on templates: influence of the linkers on conductances. *Biochim. Biophys. Acta* **1420**: 14-22.
- [115] Duclohier H, Alder GM, Kociolek K, Leplawy MT (2003) Channel properties on template assembled alamethicin tetramers. J. Peptide Sci. 9: 776-783.
- [116] Druzhinina I, Kubicek CP (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J. Zhejiang Univ. Sci. **6B**: 100-112.
- [117] 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. *Phytopatology* **6**: 634-642.

- [118] Lewis JA, Papavizas GC (1983) Production of chlamidospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. *Soil Biol. Biochem.* **15**: 351-357.
- [119] Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-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.
- [120] Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek CP (1996) Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. J. Bacteriol. 178: 6382-6385.
- [121] Lewis JA, Papavizas GC (1993) *Stilbella aciculosa*: a potential biocontrol fungus against *Rhizoctonia solani. Biocontrol Sci. Technol.* **3**: 3-11.
- [122] Ristaino JB, Lewis JA, Lumsden RD (1994) Influence of isolates of *Gliocladium virens* and delivery systems on biological control of southern blight on carrot and tomato in the field. *Plant Dis.* **78**: 153-156.
- [123] Köhl J, Schlösser E (1988) Specifity in decay of sclerotia of *Botrytis cinerea* by species and strains *Trichoderma*. *Med. Fac. Landbouww*. *Rijksuniv. Gent* **53**: 339-346.
- [124] Köhl J, Molhoek ML, Van der Plas CH, Fokkema NJ (1995) Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* **85**: 393-401.
- [125] Köhl J, Van der Plas CH, Molhoek WML, Fokkema NJ (1995) Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea* by antagonists on dead onion leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 627-637.
- [126] Moussa TAA (2002) Studies on biological control of sugarbeet pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn. *J. Biol. Sci.* **2**: 800-804.
- [127] Elad Y, Chet I, Boyle P, Henis Y (1983) Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia* solani and *Sclerotium rolfsii* Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**: 85-88.
- [128] McQuilken MP, Gemmell J, Lahdenperä M-L (2001) *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding plants. *J. Phytopathol.* **149**: 171-178.
- [129] Lumsden RD, Locke CJ, Adkins ST, Walter JF, Ridout CJ (1992) Isolation and localization of the antibiotic Gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology* **82**: 230-235.
- [130] Okigbo RN, Ikediugwu FFO (2000) Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. J. Phytopathology **148**: 351-355.
- [131] Larkin RP, Fravel DR (1998) Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control fusarium wilt tomato. *Plant Dis.* **82**: 1022-1028.
- [132] Keinath AP, Fravel DR, Papavizas GC (1991) Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **81**: 644-648.
- [133] Arisan-Atac I, Heidenreich E, Kubicek CP (1995) Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 249-256.

- [134] Buchenauer H (1998) Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. J. Plant Dis. Protect. 105: 329-348.
- [135] Elad Y (2003) Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. *Comm. Appl. Biol. Sci., Ghent University* **68**: 17-24.
- [136] Lumsden RD, Locke JC (1989) Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. *Phytopathology* **79**: 361-366.
- [137] Elad Y, Shtienberg D (1996) *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse crops and grapes. *Adv. Biol. Control*: 310-319.
- [138] Pandey RC, Cook JC, Rinehart KL (1977) High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 8469-8483.
- [139] Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga CJ, Udseth HR (1990) New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.* **60**: 882-899.
- [140] Banks JF, Whitehouse CM (1996) Electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **270**: 486-519.
- [141] 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.
- [142] 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.
- [143] Neubauer G, Mann M (1997) Parent ion scans of large molecules. J. Mass Spectrom. 32: 94-98.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] Nguyen DN, Becker GW, Riggin RM (1995) Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. J. Chromatogr. A **705**: 21-45.
- [147] van Berkel GJ, Glish GL, McLuckey SA (1990) Electrospray ionization combined with ion trap spectrometry. *Anal. Chem.* **62**: 1284-1295.
- [148] Wehofsky M (2001) Struktureinflüsse auf das Fragmentierungs-Verhalten von Peptiden bei PSD-MALDI-Massenspektrometrie. *Dissertation*. Universität Gießen.
- [149] Beck A (2002) Entwicklung von massenspektrometrischen und chromatographischen Mikromethoden zur Analyse von Protein-Phosphorylierungen. *Dissertation*. Universität Tübingen.
- [150] Biemann K (1990) Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-collision-induced dissociation. *Methods Enzymol.* **193**: 455-479.
- [151] 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.

- [152] Katta V, Chowdhury SK, Chait BT (1991) Use of single-quadrupole mass spectrometer for collision-induced dissociation studies of multiply charged peptide ions produced by electrospray ionization. *Anal. Chem.* **63**: 174-178.
- [153] 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.
- [154] Roepstorff P, Fohlman J (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**: 601.
- [155] 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.
- [156] 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.
- [157] Biemann K (1992) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 977-1010.
- [158] Polce MJ, Beranova S, Nold MJ, Wesdemiotis C (1996) Characterization of neutral fragments in tandem mass spectrometry: a unique route mechanistic and structural information. *J. Mass Spectrom.* **31**: 1073-1085.
- [159] 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. Chromat. A 852: 179–189.
- [160] Jaworski A (1999) Sequenzierung von Peptaibol-Antibiotika mittels Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisierung-Massenspektrometrie. *Dissertation*. Universität Gießen.
- [161] Jaworski A, Brückner H (2000) New sequences and new fungal producer of peptaibol antibiotics antiamoebins. *J. Peptide Sci.* **6**: 149-167.
- [162] Meyer CE, Reusser F (1967) A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* **23**: 85-86.
- [163] Payne JW, Jakes R, Hartley BS (1970) The primary structure of alamethicin. *Biochem. J.* 117: 757-766.
- [164] McMullen AI, Marlborough DI, Bayley PM (1971) The Conformation of Alamethicin. *FEBS Lett.* **4**: 278-280.
- [165] Martin DR, Williams RJP (1976) The nature and function of alamethicin. *Biochem. J.* **153**: 181-190.
- [166] Irmscher G, Jung G (1977) Die hämolytischen Eigenschaften der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin. *Eur. J. Biochem.* 80: 165-174.
- [167] Melling J, McMullen AI (1975) Separation, purification and characterization of alamethicins produced from *Trichoderma viride*. *Science Council of Japan* **5**: 446-452.
- [168] Psurek A, Neusüß C, Balaguer E, Imhof D, Degenkolb T, Brückner H, Scriba GKE (2006) Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis – mass spectrometry. J. Peptide Sci. 12: 279-290.
- [169] Ooka T, Taketa I (1972) Studies of peptide antibiotic suzukacillin. Part II. Agr. Biol. Chem. 36: 112-119.

- [170] Ooka T, Taketa I (1974) The relationship between α-amino isobutyrate and L-valine for the suzukacillin formation. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 19-27.
- [171] Jung G, König WA, Leibfritz D, Ooka T, Janko K, Boheim G (1976) Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part A. Sequence and conformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; **433**: 164-181.
- [172] Katz E, Aydin M, Lucht N, König W, Ooka T, Jung G (1985) Sequence and conformation of suzukacillin A. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**: 1041-1062.
- [173] Katz E, Schmitt H, Aydin M, König WA, Jung G (1985) The C-terminal heptapeptides of suzukacillin A and alamethicin F30 – sequence, conformation and synthesis. *Liebigs Ann. Chem.* 1985: 365-377.
- [174] Kripp TC (1990) Isolierung und Sequenzierung von Peptidantibiotika (Trichobrachine) aus *Trichoderma longibrachiatum. Dissertation.* Universität Hohenheim.
- [175] 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 Science, Leiden, Netherland: 347-349.
- [176] 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.
- [177] 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.
- [178] Ozbay N, Newman SE (2004) Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum. Pak. J. Biol. Sci.* **7**: 478-484.
- [179] Auvin-Guette C, Rebuffat S, Vuidepot I, Massias M, Bodo B (1993) Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1 1993: 249-255.

Experimenteller Teil

Verzeichnis von Material und Methoden

1	Instrumentelle Anordnung und Systemparameter	42
	1.1 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie	42
	1.2 Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie	42
	1.3 Gaschromatographie	43
	1.3.1 Herstellung von Lösungen und Reagenzien für die Gaschromatographie	45
2	Festphasenextraktion	45
3	Dünnschichtchromatographie	45
4	Probenmaterial und Pilzstämme	46
5	Mikrobiologische Arbeiten	46
	5.1 Fermentationsmedien	46
	5.2 Substanzproduktion, Aufreinigung und Isolierung der Peptaibiotika	46
6	Biologische Aktivitätsprüfung	47
	6.1 Bestimmung der Wachstumskurve und Lebendzellzahl von Bacillus subtilis	47
	6.2 Anzucht des Bacillus subtilis für die Mikrotiter-Tests	48
	6.3 Mikrotiter-Tests zur Aktivitätsprüfung	48

1 Instrumentelle Anordnung und Systemparameter

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

1.1 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Trennung und Analyse der Peptaibiotika wurde eine HPLC-Anlage HP 1100 (Agilent, D-76337 Waldbronn) bestehend aus Entgaser, binärer HPLC-Pumpe, Säulenofen und Autosampler der selben Serie verwendet, welche entweder mit einem UV-Detektor (Agilent) oder on-line gekoppelt an das Massenspektrometer verbunden wurde. Die Datenauswertung erfolgte mit der Steuerungs- und Auswertungssoftware HP Chemstation für LC (Rev. A.04.02) von Agilent.

Stationäre Phasen

- 1. Kromasil KR100, 150 mm x 4,6 mm i.D., 3,5 µm (EKA Chemicals, Bohus, Schweden) [A-D]
- 2. Kromasil KR100, 150 mm x 10 mm i.D., 3,5 µm (EKA Chemicals, Bohus, Schweden) [B]

Die Eluenten setzten sich aus Acetonitril, Methanol (beide Merck) und H₂O bidest. zusammen. Es wurde TFA (Fluka, Buchs, Schweiz) zu den Eluenten gegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,1% entstand. Die genauen Volumenanteile sind in [A-D] beschrieben.

1.2 Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Zur Sequenzierung der Peptaibiotika wurde ein Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometer (ESI-MS) vom Typ LCQ (Thermo Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) verwendet. Die Peptaibiotika wurden entweder nach flüssig-chromatographischer Trennung [A-D] und/oder per Direktinjektion analysiert [A, B, D]. Die jeweiligen gerätespezifischen Einstellungen sind in [A-D] beschrieben. Die Steuerung und Datenauswertung erfolgte mittels LCQ Navigator Version 1.1.

1.3 Gaschromatographie

Zur chiralen Analyse der AS-Derivate der isolierten Peptaibiotika wurde ein Gaschromatograph HP 6890 mit einem Quadrupol-Massenspektrometer der Serie 5972 (beides Agilent) verwendet [A-D]. Die Datenauswertung erfolgte mit der Steuerungs- und Auswertesoftware G1701 AA von Agilent.

Systemeinstellungen	
Injektor- und Detektortemperatur:	250°C
Elektronenstoßenergie:	70 eV
Detektor-Verstärkung:	1,5 kV
Split-Verhältnis bei Injektion:	1:20
Injektionsvolumen:	1 μ1
Trägergas:	Helium 5,0 (Messer-Griessheim, Krefeld)

Säule

Chirasil[®]-L-Val (*N*-Propionyl-L-Valin-*tert*-Butylamid-Polysiloxan), Fused-Silica-Kapillarsäule, 25 m x 0,25 mm i.D., Filmdicke der stationären Phase 0,12 µm (Varian-Chrompack, Darmstadt)

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

Die Peptaibiotika wurden bei 100 °C in 6 M HCl für 16 h totalhydrolysiert. Die resultierenden AS wurden zu *N*-Trifluoroacetyl-AA-(1)-propylester derivatisiert, wobei die Aminoalkohole unter diesen Bedingungen als *N(O)*-Bis(trifluoroacetyl)-aminoalkohol vorlagen [A-D]. Da die Konfiguration von Iva unter diesen Derivatisierungsbedingungen nicht ermittelt werden konnte, wurden für die Chiralitätsbestimmungen von Iva die *N*-Acetyl-Iva-1-propylester eingesetzt [B, D].

MS-Parameter

Bei der GC-MS Methode können außer Messungen im Scan-Modus auch Bestimmungen im SIM-Modus durchgeführt werden, bei dem so genannte Ion-Sets festgelegt werden. Hierbei werden selektiv innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls nur charakteristische Massenfragmente einzelner AS detektiert, wodurch die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden kann. Daher wurden in einem Scan-Lauf zunächst Retentionszeiten und charakteristische Fragmentionen der einzelnen AS bestimmt und dementsprechend Gruppen von AS gemäß ihrer Elutionsfolge in Zeitfenstern (Ion-Sets) zusammengefasst.

Die folgende Tabelle II-1 zeigt die Zeitfenster und zugehörige Massenfragmente der in den untersuchten Peptiden detektierten AS und Aminoalkohole (AA) [A-D].

Tab. II-1Ion-Sets [min] und untersuchte Massenfragmente [m/z] der in den Peptiden
detektierten Aminosäuren (AS) und Aminoalkohole (AA); chirale Analyse der
N-Trifluoroacetyl-AA-(1)-propylester

Zusammensetzung der Ion- Sets	Zeitfenster [min]	Untersuchte Massenfragmente [<i>m/z</i>]
1. Aib, D/L-Iva	0.00 - 9.19	154, 155, 168, 166, 140, 141, 184
2. D-Ala, L-Prolol, D/L-Alaol, L-Ala, D-Val, L-Valol, L-Val, D-Valol, D-Thr, Gly, L-Thr	9.20 - 15.29	140, 141, 154, 153, 168, 169, 126, 127, 139, 138, 152, 171, 213, 166, 184, 182, 96, 180
3. D-Ile, β-Ala, L-Ileol, L-Ile, L-Leuol, D-Leuol, D-Pro, L- Pro, D-Leu, D-Ser, Pip, L-Ser, L-Leu, L-Nle,	15.30 - 21.99	182, 138, 139, 140, 153, 126, 166, 180, 181, 171, 213, 152, 167, 196, 125, 154, 102
4. Gaba, Hyp	22.00 - 26.49	126, 182, 154, 94, 96, 102, 164, 165, 278, 153, 140, 139, 184, 226
5. D-Asx, L-Asx, D-Met, L- Met, D/L-Pheol, D-Phe, L-Phe, D-Glx, L-Glx	26.50 - 31.29	184, 171, 153, 213, 139, 140, 226, 91, 148, 190, 152, 180, 198, 85, 117, 116, 115, 230, 240, 203, 260, 302
6. D-Tyr, L-Tyr, L-Tyrol, D- Orn (D-Arg), L-Orn (L-Arg), D-Lys, L-Lys	31.30 - 40.00	166, 180, 203, 260, 126, 302, 152, 180, 85, 198, 139, 240, 115, 138, 229

Asx = Asn oder Asp; Glx = Gln oder Glu

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 L-AS-Gemisch der proteinogenen AS verwendet, dem nach Bedarf entsprechende Mengen an Aminoalkoholen, D-AS und nichtproteinogenen AS zugesetzt wurde [B].

n-Propanol/HCl-Reagenz

Vorgekühltes Acetylchlorid wurde tropfenweise zu dem im Eisbad gekühlten und gerührten *n*-Propanol im Verhältnis *n*-Propanol/Acetylchlorid 8:2 (ν/ν) zugesetzt, woraus eine 2,5 M Lösung entstand.

2 Festphasenextraktion

Mittels Festphasenextraktion wurde unter Verwendung einer RP 18 Sep-Pak[®] Kartusche (Waters, Eschborn) der Mycelextrakt der Schimmelpilze aufgereinigt.

Die Konditionierung der Sep-Pak[®] Kartusche erfolgte mit jeweils 10 ml 1) MeOH, 2) H₂O bidest, 3) MeOH/H₂O (1/2, v/v).

Die genaue Darstellung der Probenaufarbeitung erfolgt im Material- und Methodenteil der Publikation [C].

3 Dünnschichtchromatographie

Für die analytische [A, B, D] und präparative [D] Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten verwendet.

```
analytische DC:
Plattenmaterial: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> auf Glas (Merck), Schichtdicke: 0,25 mm
präparative DC
Plattenmaterial: Kieselgel SIL G-200 auf Glas (Macherey-Nagel), Schichtdicke: 2,0 mm
```

Das Laufmittel setzte sich aus Chloroform, Methanol, H₂O bidest. und zusätzlich Essigsäure [D] oder 10 M wässrige Ammoniaklösung [A] zusammen. Die genauen Anteile sind in [A, B, D] beschrieben. Die Detektion nach der DC erfolgte mit H₂O bidest. bzw. mit 4,4'-Tetramethyl-diamino-diphenylmethan (TDM) - Reagenz.

4 Probenmaterial und Pilzstämme

Die Alamethicine waren Eigenisolate von M. Kieß (Arbeitskreis Prof. Brückner) aus dem Pilz *Trichoderma viride*, NRRL 3199 [A]. Das Suzukacillin A wurde von Dr. T. Ooka bereitgestellt [169] [B].

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

5 Mikrobiologische Arbeiten

5.1 Fermentationsmedien

Die Zusammensetzung der für die Anzucht der Schimmelpilze in Platten- und Submerskultur verwendeten Nährmedien, sowie die genauen Spezifikationen der in den Publikationen [A-D] verwendeten Geräte und Materialien erfolgt jeweils im Material- und Methodenteil der entsprechenden Arbeiten.

5.2 Substanzproduktion, Aufreinigung und Isolierung der Peptaibiotika

Die Peptaibole Alamethicin F30 und F50, sowie Suzukacillin A lagen bereits als aufgereinigtes Probenmaterial vor, Produktion und Aufreinigung wurden in den entsprechenden Publikationen genauer spezifiziert [A, B].

Die Produktion von Trichobrachin [D] von *Trichoderma parceramosum* erfolgte in Malzextrakt-Submerskultur, und wurde mittels dünnschichtchromatographischer Untersuchung von täglich steril entnommenen und über RP-8-Phasenmaterial aufgereinigten Proben unter H₂O- und TDM-Detektion überwacht.

Am Tag der höchsten Peptaibiotika-Produktion wurde das Pilzmycel von der Kulturbrühe abfiltriert, nachgewaschen und verworfen. Zur Aufreinigung der Peptaibiotika wurde ausschließlich die Kulturbrühe verwendet. Die Peptaibiotika wurden mittels MPLC unter Verwendung von XAD-2 Säulenmaterial, und Säulenchromatographie unter Atmosphärendruck mit LH-20 Material aus der Kulturbrühe isoliert. Weitere Reinigungs- und Trennungsschritte wie präparative DC sind im Material- und Methodenteil [D] beschrieben.

6 Biologische Aktivitätsprüfung

Es wurden 7 Peptaibol-Gruppen und 12 synthetische Alamethicine für Untersuchungen auf biologische Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (DSM: 10^T) eingesetzt.

Proben

Die Alamethicine waren Eigenisolate von M. Kieß (Arbeitskreis Prof. Brückner) aus dem Pilz *Trichoderma viride*, NRRL 3199 [A].

Das Suzukacillin A wurde von Dr. T. Ooka bereitgestellt [169] [B].

Die Trichobrachine wurden im Rahmen dieser Arbeit aus dem Pilz *Trichoderma parceramosum* CBS 936.69 isoliert [D].

Die synthetischen Alamethicine wurden von Prof. Dr. M. Leplawy, Technische Universität Lódz, Polen, zur Verfügung gestellt [114, 115].

6.1 Bestimmung der Wachstumskurve und Lebendzellzahl von Bacillus subtilis

Ein 200 ml Kolben mit 50 ml Standard-1-Nährbouillon (S1) (Oxoid, Wesel) wurde autoklaviert, mittels einer Impföse mit *Bacillus subtilis* aus einem Schrägagar-Röhrchen beimpft und bei 36 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 16 Stunden wurden unter keimfreien Bedingungen 5 ml des beimpften Mediums in einen weiteren Kolben mit 50 ml steriler S1 überführt. Dieser Ansatz wurde auf dem Schüttler bei 36 °C inkubiert. Über einen Zeitraum von 6 Stunden wurde das Wachstum über die Optische Dichte (OD) an einem Helios Gamma Spektrometer (Thermo, Dreieich) bei 600 nm alle 30 min verfolgt, wobei nicht beimpftes S1 zur Kalibrierung diente. Anhand der Wachstumskurve konnte der optimale Inkubationszeitraum für die Verwendung des *Bacillus subtilis* in den Mikrotiterplatten bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde in der ermittelten log-Phase 1 ml der Bakterienkultur entnommen und in 9 ml steriler Saline überführt. Daraus wurde erneut 1ml entnommen und in 9 ml steriler Saline pipettiert. So wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{0} bis 10^{9} hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 500 µl auf eine Agarplatte mit Standard-1-Nähragar pipettiert und mit dem Drigalskispatel verteilt. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert, bis sich auszählbare Kolonien gebildet haben.

6.2 Anzucht des Bacillus subtilis für die Mikrotiter-Tests

Ein Schikanekolben mit 50 ml autoklavierter Standard-1-Nährbouillon (S1) wurde mit einer Impföse mit *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10^{T} beimpft und 16 Stunden bei 36 °C inkubiert. 5 ml dieser Bakteriensuspension wurden in ein neuen Kolben mit 50 ml autoklavierter S1 überführt und ebenfalls auf dem Schüttler bei 36 °C inkubiert. Nach 3 Stunden wurde die optische Dichte bei 600 nm am Spektrophotometer gemessen, um sicherzustellen, dass der *Bacillus* die zuvor bestimmte Zellzahl enthält. Dieser Ansatz wurde für die Antibiotika-Tests mittels Mikrotiterplatten verwendet.

6.3 Mikrotiter-Tests zur Aktivitätsprüfung

Für die Tests wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Merck Darmstadt) verwendet und in die 8 Reihen und 12 Spalten folgende Ansätze pipettiert:

- I. 1. Spalte (8 Vertiefungen): 150 µl S1
- II. 2. Spalte: $100 \ \mu l \ S1 + 50 \ \mu l$ Bakteriensuspension (vgl. 6.2)
- III. 3. 12. Spalte: 100 µl S1
- IV. 3. Spalte in Vertiefungen 1-7: 50 µl Probe in MeOH + 50 µl S1
- V. 3. Spalte in Vertiefung 8: 50 µl MeOH + 50 µl S1

Für die 4.-12. Spalte wurde wie nachfolgend beschrieben verfahren:

Alle Ansätze wurden suspendiert, aus den Ansätzen unter IV und V wurden jeweils 100 μ l entnommen und in die entsprechende nächste Vertiefung der nächsten Spalte pipettiert, dort wiederum suspendiert und 100 μ l in die nächste Vertiefung der nächsten Spalte pipettiert. Dies wurde bis zu einer Verdünnung von 1/512 fortgesetzt. Danach wurde in die Vertiefungen der Spalten 3 - 12 noch 50 μ l Bakteriensuspension (vgl. 2.6) pipettiert. Jede Vertiefung hatte danach ein Volumen von 150 μ l.

Vor der Inkubation wurden die Optischen Dichten $(OD_{t=0h})$ bei 540 nm an einem Microplate Reader Titertek Multiskan[®] Modell MCC/340 (Labsystems, Finnland) gemessen. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 5 Stunden wurde abermals die $OD_{t=5h}$ bei 540 nm bestimmt.

Da durch die Zugabe der Proben in die Nährlösung teilweise eine Trübung entstand, wurde die Differenz der Optischen Dichte ΔOD bestimmt ($\Delta OD = OD_{t=5h} - OD_{t=0h}$).

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurden je drei Versuchsansätze unter identischen Bedingungen durchgeführt und die Mittelwerte verwendet.

Anhang III

[A]	Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H (2003) Sequences of
	alamethicin F30 and F50 reconsidered and reconciled
[B]	Krause C, Kirschbaum J, Jung G, Brückner H (2006) Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold <i>Trichoderma viride</i>
[C]	Krause C, Kirschbaum J, Brückner H (2006) Peptaibiomics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS
[D]	Krause C, Kirschbaum J, Brückner H (2006) Peptaibiomics: Micro- heterogeneity, Kinetics and Sequences of Peptaibiotics Trichobrachins from <i>Trichoderma parceramosum</i> BISSETT (syn. <i>T. longibrachiatum</i> RIFAI)77

Journal of Peptide Science J. Peptide Sci. 9: 799–809 (2003) Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/psc.535



Sequences of Alamethicins F30 and F50 Reconsidered and Reconciled[‡]

JOCHEN KIRSCHBAUM, CORINA KRAUSE, RUTH K. WINZHEIMER and HANS BRÜCKNER*

University of Giessen, Interdisciplinary Research Center, Department of Food Sciences, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

Abstract: From the culture broth of the mould *Trichoderma viride*, strain NRRL 3199, a microheterogeneous mixture of the membrane active 20-residue peptaibol alamethicin (ALM) could be isolated. ALMs were isolated by XAD-2 column chromatography and separated by silica gel chromatography and trichloromethane/MeOH gradient elution into an acidic and neutral group of peptides, named ALM F30 and ALM F50, respectively, according to their 100 $R_{\rm f}$ on TLC. Peptides ALM F50 were separated by semi-preparative and analytical HPLC and subjected to ESI-MS. Ten sequences of ALM F30 and their relative quantities could be determined. The major peptides ALM F30/3 (46%) and ALM F30/7 (40%), distinguished by Aib/Ala exchange in position 6, correspond to sequences described as ALM I and II occurring in the original alamethicin from Upjohn Company. Analogously, 13 sequences of the neutral peptide mixture named ALM F50 could be determined. The major peptide ALM F50/5 (75%) and the minor peptide ALM F50/7 (10%) are distinguished from ALM F30/3 and ALM F30/7 by having Gln17 in place of Glu17, the latter occurring in the F30 group. Notably, currently commercially available alamethicins (Fluka, Sigma) represent microheterogeneous mixtures of the neutral ALM F50 peptides with trace amounts of acidic ALM F30 peptides. Copyright © 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: peptaibols; peptide antibiotics; α -aminoisobutyric acid; isovaline; alamethicin F30 and F50; electrospray ionization mass spectrometry

INTRODUCTION

The first official report on the isolation and partial structural characterization of a polypeptide antibiotic (Upjohn Company, Kalamazoo; U-22,324) from the culture broth of the mould *Trichoderma viride* Pers ex Fries, strain NRRL 3199, was published by Meyer and Reusser in 1967 [1].

It was recognized that, among standard amino acids, the peptide contained a relatively large proportion of the nonprotein amino acid α -methylalanine (2-methylalanine, α -aminoisobutyric acid, Aib). Since this amino acid was listed in the register of Chemical Abstracts under the name '**ala**nine, **meth**yl', in accordance with many

antibiotics the ending -icin was added and the peptide was named 'alamethicin' (abbreviated ALM in the following). The unique membrane modifying properties of the peptide were soon recognized and reported by Mueller and Rudin in 1968 [2]. As no free N- and C-terminal amino acids could be detected and the peptide could not be visualized by spraying with ninhydrin, a cyclic structure was proposed based on acidic partial hydrolysates which were sequenced using conventional methods by Pavne et al. [3]. It was assumed that the γ -carboxy group of Glu17 was peptide bonded to the imino group of Pro1. Using a variety of analytical techniques, including GC-MS of partial hydrolysates and NMR, at about the same time Ovchinnikov et al. came to the same structural conclusions [4].

Investigation by TLC on silica H (i.e. acidic silica gel) of the Upjohn ALM by Melling and McMullen in 1975 revealed that this material was composed of two major groups named, according to 100 $R_{\rm f}$

^{*}Correspondence to: Dr Hans Brückner, University of Giessen, Interdisciplinary Research Center, Department of Food Sciences, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany;

e-mail: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

[‡] Presented at Peptaibols, October 2002, Jena, Germany.

Copyright © 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

800 KIRSCHBAUM ET AL

values, ALM F30 (about 85%), ALM F50 (about 12%), and a minor component ALM F20 (2%) [5]. However, minor or trace components of ALMs, numbered accordingly F40, F60 and F70, were also recognized by TLC [5]. Martin and Williams performed ¹H-NMR studies on ALM (Upjohn) and isolated from hydrolysates the hitherto undetected amino alcohol β -phenylalaninol (Pheol) as well as *N*-acetyl-Aib [6]. They concluded that the peptide is linear and not cyclic and that the N-terminal Ac-Aib might be back-linked to Pro thus forming a five-membered ring. Pheol was assumed to be amide-bonded to the γ -carboxyl of Glu at the C-terminal end of the peptide. The presence of Pheol was also recognized in 1975 by Jung et al. in the ¹³C-NMR spectra of ALM [7]. Martin and Williams distinguished also between the major component defined as F30 and a minor component F50, the latter assumed to represent the amide analogue of the former [6].

Based on the proposed linear structure an attempt was made to synthesize ALM F30 by Gisin *et al.* in 1977 [8]. Unexpectedly, the peptide was not identical to the natural material. From the p K_a values of Glu model compounds and comparison of data with the natural ALM isolate from Upjohn Company it was concluded that the amino alcohol was amide bonded to the α -carboxy group of *C*-terminal Gln19, rather than to the γ -carboxy group of Glu18 [8, 9].

Applying high resolution MS and field desorption MS on the Upjohn material, Pandey *et al.* in 1977 reported on the structure of a major peptide, named ALM I (85%) and minor component ALM II (2%) [10]. The authors demonstrated convincingly that the Upjohn material indeed represents an acidic 20-residue peptide with a *N*-terminal Ac-Aib-residue and a *C*-terminal Pheol residue α -linked to Gln19, whereas the γ -carboxy group of the preceding Glu18 residue is definitely not substituted. The peptides designated ALM I and ALM II differ by the presence of Aib6 in ALM I and Ala6 in ALM II.

It is worth noting that Pandey *et al.* suggested naming this unique group of peptides, according to its characteristic residues, **peptaibophols** (i.e. **pept**ides containing **Aib** and **ph**enylalanin**ol**). With the detection of valinol in the related peptide trichotoxin [11], the name was generalized to **peptaibols**, a name that has become well established.

Based on the revised structure of ALM three total syntheses of the major component ALM I were reported in 1981 by Gisin *et al.* [12], Balasubramanian *et al.* [13] and Nagaraj and Balaram [14], followed by a total synthesis of Schmitt and Jung in 1985 [15].

Total synthesis of ALM and related peptaibols is still attractive and a synthetic challenge as demonstrated by the solution phase synthesis of ALM by Słomczynska *et al.* performing a chemo-enzymic coupling in the last step [16]. Problems encountered in the coupling of sterically hindered Aib-segments by the use of conventional methods could be overcome by applying solid phase procedures employing highly reactive carboxyfluorides such as FMOC-Aib by Wenschuh *et al.* This method made possible the synthesis of ALMs, as well as other natural peptaibol sequences [17].

Thus, the major sequence of ALM was confirmed by many total syntheses and also corroborated by x-ray analysis of the natural peptide [18]. It was realized, however, as early as 1979 by applying HPLC that the Upjohn material was composed of a minimum of 12 components [19].

In the course of their own fermentation and isolation of ALM from T. viride NRRL 3199, Irmscher and Jung reported in 1977 that their major product had a $R_{\rm f}$ of 0.5 and the minor product a $R_{\rm f}$ of 0.3 on TLC [20]. This is the opposite ratio compared with the Upjohn material. In accordance with the designation used by Melling and McMullen [5] the major group composed of neutral peptides was named ALM F50, whereas the minor group of acidic peptides corresponding to the Upjohn material was named ALM F30. Consequently, the mixture of acidic alamethicins in the literature usually is referred to as alamethicins F30 (ALM F30), whereas the neutral alamethicins are designated alamethicins F50 (ALM F50). Accordingly, alamethicins I and II, as named and sequenced by Pandey et al. [10], are referred to as alamethicins F30/I and F30/II.

Investigation of the ALM mixture from Upjohn Company by König and Aydin using derivatized partial hydrolysates by GC-MS revealed at least six exchange positions of amino acids, including the established Ala6/Aib6 exchange [21]. Assignment of complete sequences of individual peptides of the mixtures was not possible by the technique used.

Several fermentations of *T. viride* NRRL 3199 in our laboratory in the complex medium provided, in agreement with the results of Irmscher and Jung, continued the F50 group as the major peptides accompanied by minor amounts of F30 peptides. Fermentation in malt medium, however, yielded a mixture of ALM F30 and F50 peptides. Separation of the F50 peptides by HPLC provided individual peptides designated ALM F50/A–F. Sequencing of these components using FAB-MS, accompanied by gas chromatographic investigations, provided the complete sequences for peptides F50/C–E [22]. The identity of peptides 'C' and 'E' to ALM F30/I and ALM F30/II was established, with the restriction of ALM F50 having Gln in sequence position 18. Further, the presence of D-isovaline (D-Iva) in minor peptides ALM F50/D and 'F' was detected. The presence of Iva in ALM sequences had not been recognized previously.

In continuation of this work, and in order to characterize commercially available preparations of ALM, the major and minor structures of ALM F30 and F50 peptides are presented and the chromatographic elution profiles, sequences of components, and abbreviations used in the literature are correlated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) (all of gradient grade quality) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); hydrochloric acid (32%, w/v), 1-propanol, aqueous ammonia (25%, w/v), dichloromethane and trichloromethane (TCM) were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany); trifluoroacetic acid (TFA), 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT) and trifluoroacetic acid anhydride (TFAA) were from Fluka (Deisenhofen, Germany). For amino acid analysis, an amino acid standard solution (AA-S-18 from Sigma, St Louis, MO, USA) was used and appropriate amounts of α -methylalanine (Aib, U, from Sigma), DL-isovaline (Iva, synthesized in our laboratory via the Strecker procedure) and L-phenylalaninol (Fol, from Sigma) were added.

Sources of Alamethicins

Alamethicins were isolated in our laboratory from *Trichoderma viride* NRRL 3199. A freeze dried sample was received from Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research and Development Division, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill, USA. Commercial ALMs were from Fluka (product no. 05125), from Sigma (product no. A4665) and compared with a sample from Upjohn Company (antibiotic U-22,324).

Chromatography

For column chromatography, Servachrom XAD-2 polystyrene adsorber resin, particle size 100-200 µm (Serva, Heidelberg, Germany), Sephadex LH 20,

SEQUENCES OF ALAMETHICINS 801

particle size 25–100 μ m (Pharmacia, Freiburg, Germany) and LiChroprep RP-8, particle size 40–63 μ m (Merck) were used. For thin layer chromatography (TLC), pre-coated plates with silica gel 60 (Merck) were used. The mobile phase was trichloromethane/methanol/17% aqueous ammonia (70/35/10, v/v/v). Peptaibols were detected by spraying with water and, after drying, with chlorine/TDM reagent.

For HPLC a HP 1100 series instrument comprising a Model G1322A degasser, G1312A binary pump, G1313A autosampler, G1316A column thermostat, G1314A UV/VIS detector and software HP Chem-Station for LC (Rev. A.04.02) was used (all from Agilent, Waldbronn, Germany or Palo Alto, CA, USA). The alamethicins were detected at a wavelength of 205 nm. For analytical HPLC columns (I) Kromasil KR100, 150 mm \times 4.6 mm i.d., 3.5 µm particle size (EKA Chemicals, Bohus, Sweden) was employed; for semi-preparative HPLC column (II) was Spherisorb ODS, 250 mm \times 8 mm i.d., 3 µm particle size (Grom, Herrenberg, Germany).

Eluents for column (I): for analytical separation of ALM F30 (acidic components) eluent A was a mixture of MeCN/MeOH/water (39/39/22, v/v/v) and eluent B was MeCN/MeOH (1/1, v/v), both containing 0.1% TFA (v/v). For the gradient programme, the column temperature and the flow rate see Table 1a. The analytical separation of neutral ALM F50 eluents A and B were those used for the separation of acidic ALM F30, the difference being that TFA was omitted (see Table 1b). The eluents for column (II), used for the semi-preparative HPLC separation of ALM F50, were identical to those employed for the separation of ALM F50 on column (I) (see Table 1c).

For medium pressure liquid chromatography (MPLC), a MD 80/100 pump, controller PS 1 (Labomatic, Sinsheim, Germany), and a Model FRAC-100 fraction collector (Pharmacia) were used. The adsorber resins XAD-2 and silica gel were packed in individual MPLC glass columns (38 cm \times 3.7 cm i.d., Labomatic).

Amino Acid Analysis by GC-SIM-MS

Chiral amino acid analysis was performed on a GC-MS Model HP 6890 with a mass selective detector Model HP 5972 (Agilent, Waldbronn, Germany). The instrument was equipped with a Chirasil-L-Val (i.e. *N*-propionyl-L-valine-*tert*-butylamide polysiloxane) quartz capillary column, 25 m \times 0.25 mm i.d. (Varian-Chrompack, Darmstadt, Germany). El mass

Copyright © 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

802 KIRSCHBAUM ET AL.

(a)				(b)		(c)					
Time (min)	Elu	ient	Time (min)	Elu	ient	Time (min)	Eluent				
	A (%)	В (%)		A (%)	В (%)		A (%)	B (%)			
0	90	10	0	100	0	0	80	20			
5	90	10	10	100	0	10	80	20			
25	50	50	30	20	80	30	20	80			
26	20	80	35	20	80	35	20	80			
35	20	80	36	100	0	36	80	20			
36	90	10	43	100	0	43	80	20			
43	90	10									

Table 1 $\,$ Gradient Programmes for Analytical Separation of ALM F30, ALM F50 and Semi-preparative HPLC of ALM F50 $\,$

(a) Analytical Separation of ALM F30 on Kromasil KR100 column (150 mm × 4.6 mm i.d., 3.5 μ m), column temperature 50 °C, flow rate 1.0 ml/min; (b) Analytical Separation of ALM F50, Kromasil KR100 column (150 mm × 4.6 mm i.d., 3.5 μ m), column temperature 35 °C, flow rate 1.0 ml/min; (c) Semi-preparative HPLC of ALM F50, Spherisorb ODS column (250 mm × 8 mm i.d., 3 μ m), column temperature 50 °C, flow rate 3.5 ml/min. Eluent A, MeCN/MeOH/water 39/39/22, v/v/v; eluent B, MeCN/MeOH 1/1, v/v; for analytical separation of ALM F30 to eluents A and B 0.1% TFA was added.

spectra were recorded at an ionization energy of 70 eV.

Aliquots of $20-100 \ \mu g$ of the microheterogeneous mixture of peptides from ALM F30 and the fractions of ALM F50 ($20-100 \ \mu g$), obtained from semipreparative HPLC, were hydrolysed with $6 \ M$ HCl at $100 \ C$ for 16 h. The chirality of AA was determined after derivatization as *N*-trifluoroacetyl-AA-(1)-propyl esters by GC — selected ion monitoring (SIM) — MS. The chromatographic conditions were: temperature: $70 \ C$, $1.0 \ min$, $2.5 \ C/min$; $100 \ C$, $2.0 \ min$, $3.5 \ C/min$; $135 \ C$, $5.0 \ C/min$, $150 \ C$, $20 \ C/min$; $190 \ C$, $10 \ min$; pressure: $5 \ kPa$, $1 \ min$, $0.2 \ kPa/min$; $7 \ kPa$, $2.0 \ min$, $0.3 \ kPa/min$; $11 \ kPa$, $1.6 \ kPa/min$; $15 \ kPa$, $8.0 \ min$. The split ratio was 30:1 at an injection volume of $1.0 \ \mu$ l. The chirality of Pheol and Iva had been analysed previously [22].

Mass Spectrometry

For ESI-MS a LCQ^{>>} MS (Thermo Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) was used. Alamethicins were analysed either by online HPLC-MS, using HPLC column (I), or via direct infusion into the MS. Nitrogen served as the sheath and auxiliary gas and helium (purity >99.9990%, Messer-Griesheim, Krefeld, Germany) as the collision gas. Sequence analysis was carried out by positive and negative ionization. The m/z values were recorded in centroid mode and have an accuracy of 0.5

m/z. The values in Tables 2 and 3 are rounded up or down, respectively. Conditions for direct infusion and positive (negative) ionization mode were: spray voltage 4.00 kV (4.00 kV), heated capillary temperature 230°C (230°C), capillary voltage +3.0 V (-3.0 V), tube lens offset +30.0 V(-30.0 V), sheath gas 50 units, auxiliary gas 5 units, maximum ion time 1000 ms. For online HPLC-MS the temperature of the heated capillary was set to 250°C, sheath gas to 65 units, auxiliary gas to 20 units. For automatic mass calibration a mixture of caffeine (m/z 195.1), Met-Arg-Phe-Ala (m/z 524.3) and the perfluoronated 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. The negative-ion mode was performed via infusion of solutions (c = 0.1%, w/v) of ALM F50, or the fractions of ALM F50 obtained by repetitive semipreparative HPLC, or ALM F30 in MeOH/2% aqueous ammonia (1/1, v/v). For sequence analysis of ALM peptides $(M + H)^+$ and $(M)^-$ molecular ions were chosen as precursor ions for MSⁿ.

The notation used for fragment assignments in the positive-ion mode, referring to *a*, *b* and *c* acylium ions, is in accordance to those used previously by us [23–25] and is based on the suggestion of Roepstorff, Fohlman and Biemann. The negative-ion mode produced the *y* series of fragment ions without protonation [25], and is denoted y_N in Tables 2 and 3.

SEQUENCES OF ALAMETHICINS 803

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$(M + H)^+$	1950	1950	1964	1964	1978	1965	1978	1992	1992	1992
$(M - H_2O)^{+a}$	1932	1932	1946	1946	1960	1947	1960	1974	1974	1974
$(M + Na)^+$	1972	1972	n.d.	1986	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$b_2{}^{\mathrm{a}}$	n.d.	225	225	225	225	n.d.	225	n.d.	225	n.d.
$b_3{}^{\mathrm{a}}$	310	310	310	310	310	310	310	310	310	310
$b_4{}^{\mathrm{a}}$	381	381	381	381	381	381	381	381	381	381
b_5^{a}	466	466	466	466	466	466	466	466	466	466
$b_6{}^{\mathrm{a}}$	537	537	537	551	537	537	551	551	551	551
b_7^{a}	665	665	665	679	665^{b}	666	679	679	679^{b}	679
$b_8{}^{\mathrm{a}}$	750	750	750	764	750	751	764	764	764	764
$b_9{}^{\mathrm{a}}$	835	849	849	863	849	850	863	877	863	863
$b_{10}{}^{a}$	920	934	934	948	934	935	948	962	948	948
$b_{11}{}^{a}$	977	991	991	1005	991	992	1005	1019	1005	1019
b_{12}^{a}	1090	1090	1104	1104	1104	1105	1118	1132	1118	1132
b_{13}^{a}	1175	1175	1189	1189	1189	1190	1203	1217	1203	1217
$b_{16}{}^{\mathrm{a}}$	1456	1456	n.d.	n.d.	n.d.	1472	n.d.	1485	1485	n.d.
$b_{17}{}^{a}$	1541	1541	1556	1556	1570	1557	1570	1584	1584	1584
$b_{18}{}^{a}$	1670	1670	1685	1685	1699	1686	1699	1713	1713	1713
b_{19}^{a}	1798	1798	1813	1813	1827	1827	1827	1841	1841	1841
a_7 , Na ^b	659	n.d.	n.d.	673	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
y_{7P}^{a}	775	775	775	775	789	775	775	775	789	775
(y _{7P} -H ₂ O) ^a	757	757	757	757	771	757	757	757	771	757
y _{7P} –AA (20) ^a	624	624	624	624	638	624	624	624	638	624
<i>y</i> _{7P} –AA (20–19) ^a	496	496	496	496	510	496	496	496	510	496
<i>y</i> _{7P} –AA (20–18) ^a	367	367	367	367	381	367	367	367	381	367
<i>y</i> _{7P} –AA (20–17) ^a	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282
<i>y</i> _{7P} –AA (20–16) ^b	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197
M ⁻	1949	1949	1963	1963	1977	1964	1977	1991	1991	1991
$y_{4\mathrm{N}}{}^{\mathrm{b}}$	493	493	493	493	n.d.	463	493	493	n.d.	493
y_{5N}^{b}	578	578	578	578	n.d.	578	578	578	n.d.	578
y_{6N}^{b}	677	677	677	677	n.d.	677	677	677	n.d.	677
y_{7N}^{b}	774	774	774	774	n.d.	774	774	774	n.d.	774
y_{13N}^{b}	1284	1284	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$y_{14N}^{\rm b}$	1412	1412	1426	1412	1440	n.d.	1426	n.d.	n.d.	n.d.
y_{15N}^{b}	1483	1483	1497	1497	1511	1498	1511	n.d.	n.d.	n.d.
y_{16N}^{b}	1568	1568	1582	1582	1596	1583	1596	n.d.	n.d.	n.d.
y_{17N}^{b}	1639	1639	1653	1653	1667	1654	1667	1681	1681	1681
$y_{19N}{}^{\mathrm{b}}$	1821	1821	1835	1835	1849	1849	1849	1863	1863	1863

Table 2 Diagnostic Ions (m/z) of ALM F30/1-10

^a Masses were identified via HPLC/MSⁿ (n = 2-5) from specific ions like (M + H)⁺, b_{13} , b_8 , b_5 , and y_{7P} in positive ion mode, and MS² from M⁻ in negative ion mode.

^b Masses were identified via infusion MSⁿ (n = 2–5) from specific ions like (M + H)⁺, b_{13} , b_8 , and b_5 in positive ion mode, and MS² from M⁻ in negative ion mode. Exceptions were (M + H)⁺, (M + Na)⁺, and M⁻. n.d. not determined.

Fermentation Procedure for Alamethicin Production

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) followed by sterilization.

Freeze dried *Trichoderma viride* NRRL 3199 was suspended in sterile water (1.5 ml) and, after soaking for 15 min, transferred to Petri dishes (9.5 cm diameter) with potato–glucose–agar medium. This medium was used for storage of *T. viride* NRRL 3199 at 4 °C in the refrigerator. *T. viride* NRRL 3199 was transferred under sterile conditions to Petri dishes

804 KIRSCHBAUM ET AL.

Table 3 Diagnos	tic Ions ^a (m,	/ <i>z</i>) of ALM	F50/2-8c
-----------------	---------------------------	---------------------	----------

	2	3a	3b	3c	4a	4b	5	6a	6b	7	8a	8b	8c
$(M + H)^+$	1935	1949	1949	1963	1949	1949	1963	1977	1977	1977	1977	1991	1991
$(M - H_2O)^+$	1917	1931	1931	1945	1931	1931	1945	1959	1959	1959	1959	1973	1973
$(M + Na)^+$	1957	1971	1971	1985	1971	1971	1985	1999	1999	1999	1999	2013	2013
b_2	n.d.	n.d.	225	n.d.	n.d.	225	225	225	225	225	n.d.	n.d.	225
b_3	n.d.	310	310	n.d.	310	296	310	310	310	310	310	310	310
b_4	381	381	381	381	381	367	381	381	395	381	381	381	395
b_5	466	466	452	466	466	452	466	466	480	466	466	466	480
b_6	537	537	523	523	537	523	537	537	551	551	537	551	565
b_7	665	665	651	651	n.d.	n.d.	665	665	679	679	n.d.	679	n.d.
b_8	750	750	736	736	750	736	750	750	764	764	750	764	778
b_9	821	835	835	835	849	835	849	849	863	863	863	863	877
b_{10}	906	920	920	920	934	920	934	934	948	948	948	948	962
b_{11}	963	977	977	977	991	977	991	991	1005	1005	1005	1005	1019
b_{12}	1076	1090	1090	1090	1090	1090	1104	1104	1118	1118	1118	1118	1132
b_{13}	1161	1175	1175	1175	1175	1175	1189	1189	1203	1203	1203	1203	1217
b_{15}	n.d.	1371	1371	n.d.	n.d.	n.d.	1385	1385	n.d.	1399	n.d.	1399	n.d.
b_{16}	1442	1456	1456	n.d.	1456	1456	1470	1470	n.d.	1484	n.d.	1484	n.d.
b_{17}	1527	1541	1541	1555	1541	1541	1555	1569	1569	1569	1569	1583	1583
b_{18}	1655	1669	1669	1683	1669	1669	1683	1697	1697	1697	n.d.	1711	1711
b_{19}	1783	1797	1797	1811	1797	1797	1811	1825	1825	1825	n.d.	1839	1839
Y 7P	774	774	774	788	774	774	774	788	774	774	774	788	774
(y _{7P} - H ₂ O)	756	756	756	770	756	756	756	770	756	756	756	770	756
y _{7P} -AA (20)	623	623	623	637	623	623	623	637	623	623	623	637	623
y _{7P} -AA (20-19)	495	495	495	509	495	495	495	509	495	495	495	509	495
y _{7P} –AA (20–18)	367	367	367	381	367	367	367	381	367	367	367	381	367
y _{7P} -AA (20-17)	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282
M^{-}	1934	1948	1948	1962	1948	1948	1962	1976	1976	1976	1976	1990	1990
<i>Y</i> 7N	773	773	773	787	773	773	773	787	773	773	773	787	773
y_{13N}	1269	1283	1297	1311	1283	1297	1297	1311	1297	1297	1311	1311	1297
$y_{14\mathrm{N}}$	1397	1411	1425	1439	1411	1425	1425	1439	1425	1425	1439	1439	1425
$y_{15\mathrm{N}}$	1468	1482	1496	1496	1482	1496	1496	1510	1496	1510	1510	1524	1510
y_{16N}	1553	1567	1567	1581	1567	1581	1581	1595	1581	1595	1595	1609	1595
<i>Y</i> 17N	1624	1638	1638	1652	1638	1652	1652	1666	1666	1666	1666	1680	1680
<i>Y</i> 19N	1806	1820	1820	1834	1820	1820	1834	1848	1848	1848	1848	1862	1862

^a Masses identified via infusion MSⁿ (n = 2-5) from specific ions like (M + H)⁺, b_{13} , b_8 , b_5 , and y_{7P} in positive ion mode, and MSⁿ (n = 2-3) from M⁻ and y_{19n} in negative ion mode. Exceptions were (M + H)⁺, (M + Na)⁺, and M⁻; n.d., not determined.

with oat-agar medium. After 10-14 days at $25 \,^{\circ}$ C intensive growth was observed. These cultures were used for the inoculation of fermentation broths. Fermentations were repeated several times and typical protocols are described below. Agar discs (1 cm diameter) were used for the inoculation of 18 Erlenmeyer flasks (2 l), each containing 500 ml of malt medium. The flasks were shaken at 100 min⁻¹ at $25 \,^{\circ}$ C for 8 days. The fermentation was performed using a rotary shaker Model G 25 (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA). For daily monitoring of peptaibol production, aliquots (30 ml) of filtered culture broth were passed through Sep-Pak[®]

C-18 cartridges (Waters, Milford, MA, USA) and the peptides adsorbed were eluted with 3 ml MeOH. The eluates were evaporated to dryness and the residues were dissolved in MeOH (0.5 ml). Aliquots of $5-15 \,\mu$ l were investigated by TLC (see Experimental) and spots of about $R_{\rm f}$ 0.3 and $R_{\rm f}$ 0.5 could be recognized, corresponding to ALM F30 and ALM F50, respectively.

Isolation and Purification of Alamethicins

After shaking for 8 days intensive peptide production in the fermentation broth was detected via TLC. Culture broths were separated from the mycelia

Copyright $\ensuremath{\mathbb C}$ 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

by filtration under reduced pressure. The mycelia were washed with distilled water and the combined filtrates were pumped through a MPLC column $(380\times37\ mm$ i.d.) filled with XAD-2 resin at a flow rate of 1 l/h. The resin was washed with water (2.5 l, flow rate 1.5 l/h), then the adsorbed peptides were eluted with a linear gradient from 75% to 100% MeOH at a flow rate of 8 ml/min. The first 100 ml of the eluate was discarded and fractions (15 ml) were collected. Elution of peptides was monitored by TLC. Fractions containing ALMs were combined and evaporated to dryness yielding 3.8 g of a dark brown oil. The raw material was dissolved in 15 ml of a mixture of TCM/MeOH (7/3, v/v) and injected on a MPLC column ($380 \times 37 \text{ mm i.d.}$) filled with silica gel 60. Elution was performed with an eluent of the above composition at a flow rate of 8 ml/min. After discarding the first 100 ml, fractions (15 ml) were collected and the elution of peptides was monitored by TLC. ALM-containing fractions were combined and evaporated to dryness yielding 1.48 g of a yellow powder. This material was dissolved in 10 ml MeOH and applied to a column (100 cm \times 5 cm) filled with Sephadex LH-20 resin. Elution was performed with MeOH at a flow rate of 4 ml/min. Fractions (14 ml) were collected and elution of peptides was monitored by TLC. Fractions containing ALM were combined and evaporated to dryness yielding 0.76 g of a pale yellow powder.

Separation of ALM F30 and ALM F50

For separation of alamethicins in ALM F30 and ALM F50 groups, MPLC on a silica gel 60 column (360 mm \times 20 mm) was performed. The mobile phase was TCM/MeOH (7/3, v/v). The crude peptide resulting from XAD-2 chromatography was dissolved in 10 ml mobile phase and the elution was performed at a flow rate of 8 ml/min. For elution of the acidic components of ALM F30 gradient elution (from 50% aqueous MeOH to 100% MeOH) was used. Fractions (15 ml) were collected and analysed by TLC. Fractions containing ALM F30 or ALM F50 were combined separately and evaporated to dryness.

RESULTS AND DISCUSSION

Fermentation and Separation of Alamethicins

It had been recognized that *T. viride* NRRL 3199 in a malt extract fermentation medium produces two

SEQUENCES OF ALAMETHICINS **805**

microheterogeneous groups of peptaibols, the acidic ALM F30 and the neutral ALM F50 peptides [5,6,20].

Using malt extract medium, the TLC-monitoring revealed that *T. viride* NRRL 3199 produced ALM F50 at the beginning of the fermentation. After about 5 days the ALM F50 concentration decreased, whereas the ALM F30 concentration increased. Fermentation in complex medium yielded ALM F50 almost exclusively.

For comparison of the different alamethicins, TLC and HPLC were performed. Using TLC, our isolations of ALM F30 and ALM F50 were analysed and compared with the original material from Upjohn, and commercially available samples from Fluka and Sigma (10 µl of 0.1% solutions in MeOH were composed). The mobile phase used was TCM/MeOH/17% aqueous ammonia (70/35/10, v/v/v) (Figure 1). This TLC shows ALM components F30 ($R_{\rm f}$ 0.32) and F50 ($R_{\rm f}$ 0.58). The TLC demonstrated, that ALM from Upjohn consists almost exclusively of acidic peptides named ALM F30, whereas ALMs from Fluka and Sigma represent definitely neutral ALM F50 peptides. Notably, the sequences presented in catalogues and data sheets of manufacturers represent ALM F30 sequences.

For analysis of the alamethicins with HPLC, different conditions were chosen. For analytical HPLC of acidic ALM F30, amounts of 0.1% TFA were added to eluents and the gradient programme as well as the column temperature were changed (see Table 1a). The separation of ALM F30 (our fermentation) and ALM F30 (Upjohn) are shown in Figure 2. The peak areas of the individual peptides of the Upjohn ALM F30 and our isolated ALM F30 were different. However, all individual peptides analysed were present in our isolated ALM F30 and in the alamethicin from Upjohn. The peptide ALM F30/3



Figure 1 TLC of isolation of (a) ALM F30 and (b) ALM F50 in comparison with alamethicins from (c) Upjohn company, (d) Fluka and (e) Sigma.

Copyright $\ensuremath{\mathbb C}$ 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

806 KIRSCHBAUM ET AL



Figure 2 Analytical HPLC of (a) ALM F30 (own isolation) and (b) alamethicin from Upjohn Company; A_{205} , absorption at 205 nm. Numbers refer to peptide sequences displayed in Figure 4.

was the main compound in both alamethicins. The peptide with the second highest abundance was ALM F30/7 in both cases. But in the Upjohn alamethicin the relative content of ALM F30/7 was higher than in our isolated ALM F30.

The neutral peptides of ALM F50 were separated with a gradient system generated from MeCN/MeOH/water (39/39/22, v/v/v) and MeCN/ MeOH (1/1, v/v) (see Table 1b). Under these conditions, separation of ALM F50 (our fermentation), alamethicin from Sigma and alamethicin from Fluka was possible (see Figure 3). By comparison of the HPLC-fingerprints of these three alamethicins differences in peak areas of the single peptides could be observed. All peptides analysed in our isolated ALM F50 were seen in the two other alamethicins. The most abundant peptide (ALM F50/5) represents the main compound in all three isolates.

The fingerprint of the alamethicin from Fluka showed more signals in the first 20 min of the chromatogram than our isolate of ALM F50. The main difference of the alamethicin from Sigma to our isolated ALM F50 was the much higher signal of the component at a retention time of 24 min. This component, which was denoted as ALM F50/7, was in both cases the second most abundant, but in the Fluka alamethicin other peptides showed nearly higher peak areas. The ratio of individual peptides was likely to be influenced by fermentation conditions as well as isolation procedures.



Figure 3 Analytical HPLC of (a) ALM F50 (own isolation), (b) alamethicin from Fluka, and (c) alamethicin from Sigma. A_{205} , absorption at 205 nm. Numbers characterize peptides. Peptides nos. 3c and 8a are minor components of fraction nos. 3 and 8, respectively. They were analysed via direct infusion. Allocation of these peptides to signals was not possible.

Copyright @ 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

J. Peptide Sci. 9: 799-809 (2003)

Sequence Determination of Alamethicin F30

Chiral amino acids analyses of total hydrolysates of the ALM F30 peptides showed the presence of Aib, L-Ala, L-Pro, Gly, L-Leu, L-Val, L-Glx and Lphenylalaninol (Fol). The L-configuration of Fol had been determined in previous investigations [22].

Using positive and negative ion HPLC-ESI-MS, the sequences of the peptides were analysed along procedures described previously [23–25]. The diagnostic ions are listed in Table 2. Some of the diagnostic ions, e.g. $(M + Na)^+$, $(M + H)^+$, b_{13} , b_8 and y_{7P} , were generated using HPLC-ESI-MS in the collision induced dissociation (CID) mode. The majority of the diagnostic ions was identified via HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2-5) in positive ion mode from specific precursor ions such as $(M + H)^+$, b_{13} , b_8 , or b_5 . For the generation of b_7 ions, resulting from stable Gln-Aib bonds, intensive signals were obtained using direct infusion of ALM F30 dissolved in a mixture of MeOH/water (1/1, v/v) containing 1% formic acid.

In positive ion mode, the formation of b_1 ions could be observed. Signals of b_2 ions were recorded

SEQUENCES OF ALAMETHICINS 807

at m/z 225, which corresponds to the fragment Ac-Aib-Pro (43 + 85 + 97 Da). This was confirmed using the negative ionization mode and direct infusion of ALM F30 dissolved in MeOH/2% aqueous ammonia (1/1, v/v). Here a series of negative ions resulting from MSⁿ of the molecular ion (M)⁻ was detected. The y_{19N} ion shows a mass difference of m/z 128 to the (M)⁻ molecular ion, and represents the *N*terminal fragment Ac-Aib (43 + 85 Da). Taking the data of b_2 and y_{19N} fragments together, Pro in position 2 is assigned definitely. This confirms earlier investigations of ALM F30 [10,22].

Analogously, in positive ionization mode, the ion y_{7P} — AA (20–16) showed m/z 197. Because the y_{7P} ion results from cleavage of the labile Aib-Pro bond, Pro has to be the first AA in the y_{7P} sequence. Therefore, the y_{7P} — AA (20–16) ion results from Pro-Val (97 + 99 Da). This can also be deduced from the series of negative ions y_{7N} , y_{6N} and y_{5N} , providing mass differences of 97 Da (Pro) and 99 Da (Val) were obtained.

The sequences deduced from the data in Table 2, for ALM F30 are listed in Figure 4, as well as the

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%
F30/1	Ac	U	Ρ	U	А	U	А	Q	U	U	U	G	L	U	Р	V	U	U	Е	Q	Fol	0.4
2	Ac	U	Ρ	U	А	U	А	Q	บ	v	U	G	v	U	Р	V	U	U	Е	Q	Fol	3.7
3	Ac	U	Ρ	U	А	U	А	Q	U	v	U	G	L	U	Ρ	V	U	U	Е	Q	Fol	46.2
4	Ac	U	Ρ	U	Α	U	U	Q	U	v	U	G	v	U	Р	v	U	U	Ε	Q	Fol	1.1
5	Ac	U	Ρ	U	А	U	Α	Q	U	v	υ	G	L	υ	Ρ	v	U	V	Е	Q	Fol	2.6
6	Ac	υ	Р	U	А	U	А	E	U	v	U	G	L	U	Р	v	U	U	E	Q	Fol	1.9
7	Ac	U	Р	U	А	U	U	Q	U	v	U	G	L	υ	Р	v	υ	U	E	Q	Fol	39.8
8	Ac	U	Р	U	А	U	U	Q	U	L	U	G	L	U	Р	V	U	U	Е	Q	Fol	1.1
9	Ac	U	Р	U	Α	U	U	Q	U	v	U	G	L	U	Р	v	U	V	Е	Q	Fol	1.6
10	Ac	U	Ρ	U	А	U	U	Q	U	v	υ	Α	L	U	Р	v	υ	U	Е	Q	Fol	1.5
F50 /2	Ac	U	Ρ	U	А	U	А	Q	U	А	υ	G	L	U	P	v	U	U	Q	Q	Fol	0.8
3a	Ac	U	Р	U	А	U	А	Q	υ	U	υ	G	L	U	Р	v	U	U	Q	Q	Foi	1.2
Зb	Ac	U	Р	υ	А	А	А	Q	υ	v	U	G	L	U	Р	v	U	U	Q	Q	Fol	
3c	Ac	U	Р	υ	А	U	G	Q	U	v	υ	G	L	υ	Р	v	U	v	Q	Q	Fol	ŧ
4a	Ac	U	Р	U	А	U	А	Q	U	v	U	G	v	U	Р	v	U	υ	Q	Q	Fol	5.2
4b	Ac	U	Р	А	А	U	А	Q	U	U	υ	G	L	U	Р	v	U	U	Q	Q	Fol	•
5	Ac	U	Р	U	А	U	А	Q	U	v	U	G	L	U	Р	v	U	U	Q	Q	Fol	75.4
6a	Ac	U	Р	U	υ	U	А	Q	U	х	U	G	L	U	Р	х	υ	υ	Q	Q	Fol	5.6
6b	Ac	U	Р	u	А	U	А	Q	U	х	U	G	L	υ	Р	х	U	х	Q	õ	Fol	
7	Ac	Ū.	P	- U	A	Ū.	U.	ō	Ū	v	ŭ	G	Ē	ū	P	v	- 	U U	õ	õ	Fol	10.3
8a	Ac	ŭ	P	ŭ	Δ	ŭ	A	0		i	-	G	-	й	P	v	n.	U U	õ	0	Fol	0.6
85	Ac	Ŭ	P	ŭ	11	บ	U II	õ	ŭ	v	ŭ	G	-	ŭ	P	v	Ű	ŭ	õ	õ	Fol	1
8c	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	v	U	G	L	U	P	v	U	v	Q	Q	Fol	¥

Figure 4 Sequences of alamethicins F30/1-10, alamethicins F50/2-8, and relative quantities (%) of peptides; abbreviations according to one-letter nomenclature, Ac = acetyl, U = Aib, X = Val or Iva, Fol = phenylalaninol. Chiral amino acids are of the L-configuration with the exception of D-Iva. For HPLC see Figure 2 and Figure 3; for TLC see Figure 1.

Copyright $\ensuremath{\textcircled{o}}$ 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

808 KIRSCHBAUM ET AL.

relative quantities of individual peptides in our isolates of ALM F30. The main components, ALM F30/3 and ALM F30/7, make up 86% of ALM F30 peptides. The sequences of these peptides are identical to those reported for the alamethicins originally designated I and II [10,22]. Exchanges of amino acids in ALM F30 occur in certain positions. One special case of exchange shows ALM F30/6, where an Gln/Glu exchange at position no. 7 was recognized. This exchange is the sole difference between ALM F30/3 and ALM F30/6.

Sequence Determination of Alamethicin F50

Chiral amino acids analyses of the total hydrolysates of the ALM F50 peptides showed the presence of Aib, L-Ala, L-Pro, Gly, L-Leu, L-Val, L-Glx (resulting from L-Glu and/or L-Gln), Iva and phenylalaninol (Fol). The configuration of L-Fol and D-Iva had been determined in earlier investigations [22]. Iva was detected exclusively in fraction no. 6.

For further investigations, ALM F50 was separated by HPLC on a semi-preparative Spherisorb ODS column. Using the gradient programme listed in Table 1c, eight fractions were collected [25]. These fractions were further resolved on an analytical Kromasil C8 column using the gradient programme described in Table 1b. The resulting peaks shown in Figure 3 were denoted in accordance with the peptides of the fractions.

Using HPLC-ESI-MS and direct infusion ESI-MS, the sequences of the peptides of ALM F50 were analysed. Diagnostic ions determined are listed in Table 3. Analogously to the sequence analysis of ALM F30, some of the diagnostic ions, e.g. $(M + Na)^+$, $(M + H)^+$, b_{13} , b_8 and y_{7P} , were determined using HPLC-ESI-MS or direct infusion of the fractions with collision induced dissociation (CID) energy. The majority of the diagnostic ions were also identified via HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2-5) from these characteristic ions. As for ALM F30, in positive ion mode no b_1 and sometimes no b_2 ions could be determined. The detected b_2 ions showed m/z 225, corresponding to N-terminal Ac-Aib-Pro (43+85+97 Da). This was also confirmed in the negative ion mode using direct infusions of ALM F50 fractions, dissolved in MeOH/2% aqueous ammonia (1/1, v/v). A series of negative ions resulting from MSⁿ of (M)⁻ were detected. From the difference of the y_{19N} ion to (M)⁻ of 128 Da and the results of b_2 from positive ion mode, Pro was assigned at position no. 2. This was also confirmed by earlier investigations of ALM F50 [22]. In analogy to ALM F30, the amino

acids at positions nos. 14 and 15 resulting from y_{7P} and y_{7P} –AA (20–16), are Pro and Val, respectively.

The sequences of ALM F50, calculated from the data of Table 3, and the relative quantities of each peptide in our ALM F50 isolates are also shown in Figure 4. Isobaric Iva and Val in the peptide(s) of fraction no. 6 could not be distinguished. Therefore, 'X' stands for Val or Iva. Fraction no. 1 (0.9% of ALM F50 peptides) consists of at least six peptides, which could not be separated by the analytical HPLC used. The structures of these trace peptides could not be analysed and they are not treated in this work.

The peptide ALM F50/5 is identical to the component designated in our previous publication as ALM 'C', whereas ALM F50/6b is equal to ALM 'D', and ALM F50/7 corresponds to ALM F50 'E' [22]. The only difference between ALM F50/6b and the structure of ALM 'D' is the assignment of Iva to position 17 of the latter. Amino acid exchanges of ALM F50 peptides can be depicted from Figure 4.

Comparison of the Structures of the Peptides Constituting ALMs F30 and ALMs F50

By comparing the structures of the acidic peptides ALM F30 and the neutral peptides ALM F50 (cf. Figure 4), common and deviating domains can be recognized. All peptides start with the *N*-terminal sequence Ac-Aib-Pro, and end with *C*-terminal Gln-Fol. Further, Aib in positions 8, 10, 13 and 16, and Pro in position 14 are not exchanged.

The sequences of the major peptides ALM F30/3 and ALM F50/5, as well as minor peptides ALM F30/7 and ALM F50/7, differ from each other only by Glu/Gln exchange at position 18. Other minor components, such as ALM F30/1 and ALM F50/3a, ALM F30/2 and ALM F50/4a, as well as ALM F30/9 and ALM F50/8c, are also distinguished by this characteristic replacement. Notably, in combined ALMs F50/6a and b, the presence of Iva could be detected, but in none of the ALM F30 peptides.

Acknowledgements

We thank Dr Michael Kieß for fermentation and isolation of alamethicin F30 and F50 mixtures in our Hohenheim laboratories. We are indebted to Professor J. Raap from Leiden University, The Netherlands, for providing a sample of alamethicin (purchased from Sigma) for comparison with our isolates.

Copyright © 2003 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

REFERENCES

- Meyer CE, Reusser F. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* 1967; 23: 85–86.
- Mueller P, Rudin DO. Action potentials induced in biomolecular lipid membranes. *Nature* 1968; **217**: 713–719.
- 3. Payne JW, Jakes R, Hartley BS. The primary structure of alamethicin. *Biochem. J.* 1970; **117**: 757–766.
- Ovchinnikov YA, Kiryushkin AA, Kozhevnikova IV. Mass-spectrometric determination of the amino acid sequence in peptides. Structure of alamethicin. *J. Gen. Chem.* USSR 1971; **41**: 2105–2116.
- Melling J, McMullen AJ. Separation, purification and characterisation of alamethicins produced from *Trichoderma viride. ISC-IAMS Proc. Science Council of Japan* 1975; **5**: 446–452.
- Martin DR, Williams RJP. The nature and function of alamethicin. *Biochem. J.* 1976; 153: 181–190.
- Jung G, Dubischar N, Leibfritz D. Conformational changes of alamethicin induced by solvent and temperature. *Eur. J. Biochem.* 1975; **54**: 395–409.
- Gisin BF, Kobayashi S, Hall JE. Synthesis of a 19residue peptide with alamethicin-like activity. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1977; 74: 115–119.
- Gisin BF, Kobayashi S, Davis DG. Synthesis of biologically active alamethicin. In *Peptides* 1977, Proc. 5th Am. Peptide Symp, Goodman M, Meienhofer J (eds). Wiley: New York, 1977; 215–217.
- Pandey R, Cook JC, Rinehart KL. High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II. J. Am. Chem. Soc. 1977; 99: 8469–8483.
- Brückner H, König WA, Greiner M, Jung G. Sequences of membrane modifying trichotoxin A-40. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1979; 18: 476–477.
- Gisin BF, Davis DG, Borowska ZK, Hall JE, Kobayashi S. Synthesis of the major component of alamethicin. J. Am. Chem. Soc. 1981; **103**: 6373–6377.
- Balasubramanian TM, Kendrick NCE, Taylor M, Marshall GR, Hall JE, Vodyanov I, Reusser FJ. Synthesis and characterization of the major component of alamethicin. J. Am. Chem. Soc. 1981; **103**: 6127–6132.
- Nagaraj R, Balaram P. Solution phase synthesis of alamethicin I. *Tetrahedron* 1981; **37**: 1263–1270.
- 15. Schmitt H, Jung G. Total synthesis of the α -helical eicosapeptide antibiotic alamethicin. Liebigs Ann. Chem. 1985; 321–344.

SEQUENCES OF ALAMETHICINS 809

- Słomczynska U, Zabrocki J, Kaczmarek K, Leplawy MT, Beusen DD, Marshall GR. Facilitated synthesis of peptaibols: alamethicin via enzymatic segment condensation. *Biopolymers* 1992; **32**: 1461–1470.
- Wenschuh H, Beyermann M, Haber H, Seydel JK, Krause E, Bienert M. Stepwise automated solid phase synthesis of naturally occurring peptaibols using Fmoc amino acid fluorides. J. Org. Chem. 1995; 60: 405–410.
- Fox OR, Richard MR. A voltage-gated channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature* 1982; **300**: 325–330.
- Marshall GR, Balasubramanian TM. Alamethicin: purification, characterization, conformational and synthetic studies. In *Peptides 1979, Structure and Biological Function*, Gross E, Meienhofer J (eds). Pierce Chemical Co.: Rockford IL, 1979; 639–646.
- Irmscher G, Jung G. Die hämolytischen Eigenschaften der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin. *Eur. J. Biochem.* 1977; **80**: 165–174.
- König WA, Aydin M. Glass capillary gas chromatography — chemical ionization mass spectrometry in peptide sequence analysis. In *Peptides* 1980, Brundfeld K (ed.). Kopenhagen, 1980; 711–718.
- 22. Brückner H, Bokel M, Przybylski M. Detection and sequential characterization of Aib-containing polypeptides ('Peptaibols') and utilization of their natural microheterogeneity for an assignment of ¹³C NMR signals. In *Peptides 1985, Structure and Function*. Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium, Deber CM, Hruby VJ, Kopple KD (eds). Pierce Chemical Company: Rockford, Illinois, 1985; 109–112.
- Jaworski A, Brückner H. Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flavipes*. J. Peptide Sci. 2001; 7: 433–447.
- Jaworski A, Kirschbaum J, Brückner H. Structures of trichovirin II, peptaibol antibiotics from the mould *Trichoderma viride* NRRL 5243. *J. Peptide Sci.* 1999; 5: 341–351.
- Kirschbaum J, Winzheimer RK, Brückner H. Alamethicin sequences reconsidered. In *Peptides* 2002. Proc. 27th Eur. Peptide Symp, Benedetti E, Pedone C (eds). Edizioni Ziino: Napoli, Italy, 2002; 360–361.


Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold *Trichoderma viride*

CORINA KRAUSE, a JOCHEN KIRSCHBAUM, GÜNTHER JUNG^b and HANS BRÜCKNER^a*

^a Interdisciplinary Research Center, Department of Food Sciences, University of Giessen, Giessen, Germany ^b Institute of Organic Chemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany

Received 3 August 2005; Accepted 10 August 2005

Abstract: From the culture broth of the mold *Trichoderma viride*, strain 63 C-I, the polypeptide antibiotic suzukacillin (SZ) was isolated. A peptide mixture named SZ-A was obtained by crystallization from crude SZ. Individual peptides from SZ-A were isolated by semipreparative HPLC and sequences were determined by HPLC-ESI-MS. The data confirm a general sequence of SZ-A published previously and in addition establish the individual sequences of 15 acetylated eicosa peptides with *C*-terminal alcohols. The major peptide SZ-A4 (21% of all peptides) shows the sequence:

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala⁶-Gln-Aib-Lx⁹-Aib-Gly-Aib¹²-Aib-Pro-Vx¹⁵-Aib-Vx¹⁷-Gln-Gln-Fol. Amino acid exchanges of the peptaibol are located in position 6 (Ala/Aib), 9 (Vx/Lx), 12 (Aib/Lx), 17 (Aib/Vx) and possibly at position15 (Val/Iva) (uncommon abbreviations: Aib (α -aminoisobutyric acid); Iva (D-isovaline); Lx (L-leucine or L-isoleucine); Vx (L-valine or D-isovaline); Fol (L-phenylalaninol)). Copyright © 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: peptaibols; peptide antibiotics; α -aminoisobutyric acid; isovaline; suzukacillin-A; electrospray ionization mass spectrometry; sequencing

INTRODUCTION

From the culture broth of the mold Trichoderma viride, strain 63C-I, a polypeptide antibiotic named suzukacillin (SZ) was isolated in crystalline form. Investigation of SZ by TLC showed that this material comprises two major groups of peptides named SZ-A ($R_f = 0.18$) and SZ-B ($R_f = 0.70$) (Figure 1). Analysis of the amino acid composition showed among other amino acids, the presence of nonproteinogenic α aminoisobutyric acid (Aib or U) [1,2]. In the following, L-phenylalaninol (L-Fol) and D-isovaline (Iva or J) in SZ-A were detected by ¹³C-NMR and enantioselective gas chromatography [3,4]. Sequencing of trifluoroacetyl peptide methyl esters from partial hydrolysates of SZ-A using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) provided a preliminary sequence of SZ-A, including several amino acid exchange positions [3]. Sequences were refined on the basis of an approach used for sequencing the related 18-residue peptaibol trichotoxin [4,5]. Selective trifluoroacetolysis of SZ-A furnished peptides that could be resolved using silica gel and Sephadex G-10 chromatography. These fragments were converted into a mixture of di-, triand tetra-peptides by partial hydrolysis with $12\ \mbox{\scriptsize m}$ HCl. The peptide mixtures were analyzed by GC-MS as their trifluoroacetyl peptide methyl esters or, after reduction of fragments, as N-ethylpolyaminoalcohol Otrimethylsilyl ethers. Overlapping sequences, together

*Correspondence to: H. Brückner, University of Giessen, Interdisciplinary Research Center, Department of Food Sciences, Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Giessen, Germany;

e-mail: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry of fragments, quantitative and enantioselective amino acid analysis and ¹³C-NMR spectroscopy provided a general sequence of the eicosa peptide. In particular, the presence of *N*-terminal acetylated Aib (U) and *C*-terminal amino alcohol L-Fol were established and three amino acid exchange positions were localized (Figure 6) [6].

The sequences of SZ indicated a close sequential and conformational similarity with alamethicin, another *N*-acetylated eicosapeptide alcohol of the peptaibol family [3,6,7]. Methods such as ultraviolet and infrared spectroscopy, circular dichroism in various solvents and, in particular, ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy have been used for a comparative study of SZ and alamethicin [3]. Owing to amphiphilic, detergent-like properties, SZ causes hemolysis of erythrocytes [8] and exhibits weak antibiotic properties [1].

SZ modifies cation permeability of model membranes whereby oligomeric aggregates form transmembrane channels, whose conductance is dependent on the membrane potential [9–11]. Biological activities were correlated with moderate membrane permeabilization [12]. X-ray diffraction and NMR studies revealed high-resolution structures for several peptaibols and showed that these peptides adopt α -helical structures with a proline bend. Analysis of conductance levels provided support for the 'barrel stave' model of channel formation by bundles of parallel transmembrane helices [10,13–17] with varying pore sizes depending on the number of monomers forming a single pore.

One of the most characteristic features of peptaibols is their pronounced microheterogenicity, as a result

Copyright © 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

322 KRAUSE ET AL.



Figure 1 TLC of crude suzukacillin (SZ) and suzukacillin-A (SZ-A) isolated from *Trichoderma viride* 63C-1 and purified by crystallization (TLC: silica gel, chloroform/methanol 7/3, v/v).

of the nonribosomal biosynthesis of these fungal metabolites [18–21]. Single and multiple exchanges of amino acids accumulate in various defined positions and result in a complex pattern of closely related sequence analogs [22,23]. This has recently also been demonstrated for alamethicins [7,24], antiamoebins [25], stilboflavins [26] and trichovirins [27].

Since in previous work a general sequence and several exchange positions but no individual peptide sequences were assigned [6] we reinvestigated SZ-A using advanced techniques, in particular semipreparative HPLC together with on-line HPLC electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) and enantioselective GC-MS using chiral capillary columns.

EXPERIMENTAL

Materials and Methods

Chemicals. Acetonitrile and methanol of gradient grade quality were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); chloroform was from Carl Roth (Karlsruhe, Germany); trifluoroacetic acid and L-phenylalaninol were from Fluka (Deisenhofen,

Copyright @ 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Germany); α -methylalanine (Aib, U) was from Sigma; and DLisovaline (Iva, J) was synthesized in our laboratory via the Strecker procedure. For TLC, precoated silica gel plates 60 F₂₅₄ (no. 5714, Merck) were used.

Origin of Suzukacillin-A

Crude SZ was kindly provided by Dr T. Ooka, Japan [2]. Crystals of SZ-A were obtained from a solution of SZ in chloroform/acetone by addition of an excess of acetone. This material, uniform on TLC but still microheterogeneous (Figures 1 and 2), was used for sequencing.

Instrumental

For HPLC, an HP 1100 series instrument comprising Model G1322A degasser, G1312A binary pump, G1313A autosampler, G1316A column thermostat, G1314A UV/VIS detector, and HP ChemStation software for LC (Rev. A.04.02) was used (all from Agilent, Waldbronn, Germany or Palo Alto, CA, USA). The SZs were detected at a wavelength of 205 nm.

For HPLC, analytical column no. I (150 mm \times 4.6 mm i.d.) filled with Kromasil KR100, with 3.5-µm particle size (EKA Chemicals, Bohus, Sweden), was used. For semipreparative HPLC, column no. II (150 mm \times 10 mm i.d.) packed with the same batch of Kromasil was employed. Eluents and gradient elution conditions are compiled in Table 1.

For confirmation of the presence of SZ-A constituents and determination of their stereochemistry, a standard mixture was prepared composed of Aib, Gly and the L-enantiomers of Ala, Glu, Leu, Ile, Val and Fol and compared to a total hydrolysate of SZ-A. Enantioselective analyses of the standard mixture and SZ-A by GC on Chirasil-L-Val were performed similarly to procedures already described [27,28]. Components were converted into trifluoroacetyl amino acid 1-propyl esters or bistrifluoroacetyl derivatives of the amino alcohol, which were analyzed by GC-MS on a Chirasil-L-Val capillary column [28]. Isovaline was analyzed as *N*-acetyl-isovaline-(1)-propyl

Table 1 Gradient program and eluents at column temperatures of 35 °C for (a) analytical column no. I at flow rate 1 ml/min and (b) semipreparative column no. II at flow rate 3.5 ml/min. Eluent A, MeCN/MeOH/water 39/39/22, v/v/v; eluent B, MeCN/MeOH 1:1, v/v. Note that for analytical gradient elution 0.1% TFA was added to eluents A and B

	(a)			(<i>b</i>)			
	Elu	ient		Eluent			
Time (min)	A (%)	В (%)	Time (min)	A (%)	В (%)		
0	100	0	0	100	0		
25	100	0	25	100	0		
30	70	30	30	90	10		
35	50	50	35	70	30		
45	0	100	45	0	100		
50	0	100	50	0	100		
51	100	0	51	100	0		
56	100	0	56	100	0		

PEPTAIBOL ANTIBIOTIC SUZUKACILLIN 323

ester since the acetyl derivatives of DL-Iva are much better resolved on Chirasil-L-Val in comparison to the corresponding N-perfluoroacyl esters [4] (chromatogram not shown).

Mass Spectrometry

For HPLC-ESI-MS, an LCQTM MS (Thermo Electron Corp., San Jose, CA, USA) was used. Nitrogen served as sheath and auxiliary gas and helium (purity >99.9990%, Messer-Griesheim, Krefeld, Germany) as collision gas. SZs were analyzed either by on-line HPLC-MS, using HPLC column

Table 2Diagnostic ions (m/z) of suzukacillin-A

no. I, or via direct infusion into the MS. Sequence analysis was carried out by positive and negative ionization. The m/z values were recorded in centroid mode and have an accuracy of 0.5 m/z (Table 2).

Conditions for direct infusion and positive (negative) ionization mode were: spray voltage 4.00 kV (4.00 kV), heated capillary temperature 230 °C, capillary voltage +3.0 V (-3.0 V), tube lens offset +30.0 V (-30.0 V), sheath gas 50 units, auxiliary gas 5 units, and maximum ion time 1000 ms. For on-line HPLC-MS, the temperature of the heated capillary was set to 250 °C, sheath gas to 65 units, and auxiliary gas

						Suzuł	acillin-	A							
Diagnostic ions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10a	10ь	11a	11b	12	13
(M + H) ⁺	1909	1923	1923	1937	1937	1923	1951	1937	1951	1951	1965	1951	1965	1979	1965
$(M + H - H_2O)^+$	1891	1905	1905	1919	1919	1905	1933	1919	1933	1933	1947	1933	1947	1961	1947
$(M + Na)^+$	1931	1945	1945	1959	1959	1945	1973	1959	1973	1973	1987	1973	1987	n.d.	1987
b_2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	213
b_3	284	284	284	284	284	284	284	284	284	284	284	284	284	284	284
b_4	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355
b_5	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440
b_6	511	511	511	511	525	511	525	511	511	511	511	511	511	525	511
b_7	639	639	n.d.	639	n.d.	639	n.d.	639	639	639	639	639	639	n.d.	639
b_8	724	724	724	724	738	724	738	724	724	724	724	724	724	738	724
b_9	823	837	823	837	851	837	851	837	837	823	837	837	837	851	837
b_{10}	908	922	908	922	936	922	936	922	922	908	922	922	922	936	922
b_{11}	965	979	965	979	993	979	993	979	979	965	979	979	979	993	979
b_{12}	1050	1064	1050	1064	1078	1064	1078	1063	1092	1078	1092	1092	1092	1106	1092
b_{13}	1135	1149	1135	1149	1163	1149	1163	1149	1177	1163	1177	1177	1177	1191	1177
b_{16}	1417	n.d.	1417	n.d.	1445	n.d.	1445	1431	n.d.	n.d.	1459	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
b_{17}	1502	1516	1516	1530	1530	1516	1544	1530	1544	1544	1558	1544	1558	1572	1558
b_{18}	n.d.	1644	n.d.	1658	1658	1644	1672	1658	1672	n.d.	1686	n.d.	1686	1700	1686
b_{19}	1758	1772	1772	1786	1786	1772	1800	1786	1800	1800	1814	1800	1814	1828	1814
<i>y</i> _{7p}	774	774	788	788	774	774	788	788	774	788	788	774	788	788	788
$(y_{7P} - H_2O)$	756	756	770	770	756	756	770	770	756	770	770	756	770	770	770
y _{7P} – AA (20)	623	623	637	637	623	623	637	637	623	637	637	623	637	637	637
<i>y</i> _{7Р} – АА (20–19)	495	495	509	509	495	495	509	509	495	509	509	495	509	509	509
y _{7P} – AA (20–18)	367	367	381	381	367	367	381	381	367	381	381	367	381	381	381
<i>y</i> _{7Р} – АА (20–17)	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282
y _{7P} – AA (20–16)	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197
M^{-}	1908	1922	1922	1936	1936	1922	1950	1936	1950	1950	1964	1950	1964	1978	1964
<i>Y</i> 3N	407	407	407	407	407	407	407	407	407	407	407	407	407	407	407
$y_{4\mathrm{N}}$	492	492	506	506	492	492	506	506	492	506	506	492	506	506	506
<i>Y</i> 5N	577	577	591	591	577	577	591	591	577	591	591	577	591	591	591
Y6N	676	676	690	690	676	676	690	690	676	690	690	676	690	690	690
<i>Y</i> 7N	773	773	787	787	773	773	787	787	773	787	787	773	787	787	787
y_{12N}	1184	1198	1198	1212	1212	1198	1226	1212	1226	1226	1240	1226	1240	1240	1240
y_{13N}	1269	1283	1283	1297	1297	1283	1311	1297	1311	1311	1325	1311	1325	1325	1325
$y_{14\mathrm{N}}$	1397	1411	1411	1425	1425	1411	1439	1425	1439	1439	1453	1439	1453	1453	1453
y_{15N}	1468	1482	1482	1496	1496	1482	1510	1496	1510	1510	1524	1510	1524	1538	1524
y_{16N}	1553	1567	1567	1581	1581	1567	1595	1581	1595	1595	1609	1595	1609	1623	1609
y_{17N}	1624	1638	1638	1652	1652	1638	1666	1652	1666	1666	1680	1666	1680	1694	1680
y_{18N}	1709	1723	1723	1782	1782	1723	1751	1782	1751	1751	1765	1751	1765	1779	1765
y_{19N}	1780	1794	1794	1808	1808	1794	1822	1808	1822	1822	1836	1822	1836	1850	1836
<i>Y</i> 20N	1865	1879	1879	1893	1893	1879	1907	1893	1907	1907	1921	1907	1921	1935	1921

n.d. = not detected.

Copyright $\ensuremath{\mathbb C}$ 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

J. Peptide Sci. 2006; 12: 321-327

324 KRAUSE ET AL.

to 20 units. For automated mass calibration, a mixture of caffeine (*m*/*z* 195.1), Met-Arg-Phe-Ala (*m*/*z* 524.3) and the perfluorinated 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. The negative-ion mode was performed via infusion of a solution (*c* = 0.1%, w/v) of SZ-A in MeOH containing 2% aqueous ammonia. For sequence analysis of SZ peptides, (M + H)⁺ and (M)⁻ molecular ions were chosen as precursor ions for MSⁿ.

The notation used for fragment assignments in the positiveion mode, referring to *a*, *b* and *c* acylium ions, is in accordance with those used by us previously [7,24,27]. The negativeion mode produced the *y*-series of fragment ions without protonation [7], and is denoted y_N in Table 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Among various octadecylsilyl phases tested, the Kromasil KR 100 phase together with the gradient elution conditions described in Table 1 provided highest resolution for SZ-A peptides. The fingerprint HPLC of analytical column no. I is shown in Figure 2, which demonstrates the microheterogeneity of SZ-A, despite its crystallinity and uniformity on TLC. These characteristic features had also been recognized previously at lower resolution [6].

For sequence studies, SZ-A peptides were separated by employing semipreparative HPLC on column no. II filled with the same batch of the Kromasil stationary phase. Using the gradient program listed in Table 1, 13 peptide fractions were collected and combined. The numbers of the peaks assigned in the chromatogram shown in Figure 2 correspond to the fractions resulting from semipreparative chromatography.

Enantioselective amino acid analysis by GC-SIM-MS of the derivatized total hydrolysates of the peptides of SZ-A corroborated the presence of Aib, Gly, D-Iva, L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Ala, L-Glu (from Gln), L-Pro and L-Fol. Analysis revealed that each of the fractions contained D-Iva together with isomeric L-Val as well as

L-Leu and isomeric L-Ile. Since these isomers cannot be distinguished by HPLC-ESI-MS of the peptaibols Val and Iva are denoted as Vx, and Leu and Ile as Lx in the SZ-A sequences compiled in Figure 6.

Using analytical HPLC-ESI-MS and direct infusion ESI-MS of isolated fractions applying collision induced dissociation (CID) energy in positive and negative ionization mode, the sequences of the SZ-A peptides were determined. The diagnostic ions determined are listed in Table 2.

Positive-ion MS-MS of $(M + H)^+$ precursor ions generated the b- and y-series of fragment ions. The resulting y-series are internal fragments and are marked $y_{\rm P}$ (P for positive-ion mode). MS-MS of M⁻ in negative-ion mode also formed the y-series and were designated y_N (N refers to negative mode). Some of the diagnostic ions, such as $(M + H)^+$, $(M + Na)^+$, b_{13} and y_{7P} resulted from on-line HPLC-ESI-MS. Typically, characteristic fragment ions of the b_{13} and y_{7P} series were generated by cleavage of the extremely labile Aib¹³–Pro¹⁴ bond [7]. The majority of the diagnostic ions were identified via HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2-4) in positiveion mode from specific precursor ions $(M + H)^+$ and fragment ions b_{13} and y_{7P} , as well as b_{10} and b_8 . The b₃ ions of the peptides SZ-A2, SZ-A4, SZ-A10a and SZ-A13 were only recorded using direct infusion at positive ionization mode.

From these fragments, sets of diagnostic fragment ions of the b_3-b_{12} series and internal fragment ions of y_{7P} were generated and provided sequence information on the amino acid positions 3–13 and 16–20. Figure 3 shows the diagnostic fragment ions of SZ-A4 after HPLC-ESI-MS in the positive-ion mode. HPLC-ESI-MS-MS of b_{13} of SZ-A4 provided the mass spectrum shown in Figure 4, and the mass spectrum demonstrating formation of diagnostic ions from HPLC-ESI-MS-MS of y_{7P} is presented in Figure 5.

The generation of b_7 ions was not observed in each case because of the very stable Gln–Aib bonds.



Figure 2 Analytical HPLC of crystalline suzukacillin-A. Numbers correspond to peptide sequences presented in Figure 6.

Copyright $\ensuremath{\mathbb{C}}$ 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

PEPTAIBOL ANTIBIOTIC SUZUKACILLIN 325



Figure 3 Characteristic mass spectrum (positive-ion mode) of suzukacillin-A4 resulting from HPLC-ESI-MS analysis.



Figure 4 Mass spectrum (positive-ion mode) with fragment ions of b_{13} of suzukacillin-A4 resulting from HPLC-ESI-MS-MS.

The amino acids in these positions were confirmed by intense signals (y_{13N} and y_{12N}) using the negative ionization mode and direct infusion of SZ-A dissolved in a mixture of methanol/water (v/v, 1/1) containing 1% ammonia. Since only the mass difference of 128 amu was detected, the exclusive presence of Gln in SZ-A was confirmed [6] and no sequences containing Glu were found as in alamethicins F30 [7].

The b_1 fragment ions, which should be generated from the *N*-acetyl-Aib occurring in all peptides, were not detected under the conditions of positive ESI-MS. Thus, the *N*-terminal amino acids were determined from fragments resulting from *y*-series of negative ions generated from MS-MS of (M)⁻ by applying direct infusion in the negative ionization mode. The mass differences between y_{20N} and M⁻ (43 amu) and y_{19N} to M⁻ (128 amu) represent the *N*-terminal fragment Ac-Aib. Diagnostic product ions y_{19N} to y_{12N} were also analyzed via negative ionization MS-MS from M⁻ and MS³ of fragment ion y_{17N} (Table 2). The *C*-terminal positions of Fol in all SZ-A peptides were deduced from the mass difference of 151 amu between y_{7P} (m/z 774 or 788) and the internal fragments y_{7P} -AA(20) (m/z 623 or 637).

The smallest fragment detectable in HPLC-ESI-MS-MS and direct infusion ESI-MS-MS at positive mode of y_{7P} showed m/z 197, representing Pro^{14} -Vx¹⁵. Because the y_{7P} ion results from cleavage of the labile Aib–Pro bond, Pro has to be the first amino acid in the y_{7P} sequence. This was also deduced from the series of negative ions y_{7N} , y_{6N} and y_{5N} , providing mass differences of 97 amu (Pro) and 99 amu (Vx).

From the data, 15 individual sequences of peptides of SZ-A were deduced and compared to the general sequence of SZ-A that had been reported previously (Figure 6). The analysis confirms exchange positions 6 (A/U) and 17 (Vx/U) of the general sequence SZ-A. No Aib was detected in position 9 (Lx/Vx) but an additional exchange was established in position 12 (U/Lx). Furthermore, relative quantities of SZ-A peptides could be calculated from the HPLC elution profile.

Copyright @ 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

326 KRAUSE ET AL.



Figure 5 Mass spectrum (positive-ion mode) with fragment ions of y_{7P} of suzukacillin-A4 resulting from HPLC-ESI-MS-MS.

no.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%
1	Ac	U	Α	U	А	U	А	Q	υ	Vx	U	G	U	U	Ρ	Vx	U	U	Q	Q	Fol	4.2
2	Ac	U	А	U	Α	U	А	Q	U	Lx	U	G	U	U	Р	Vx	υ	U	Q	Q	Fol	11.8
3	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Vx	U	G	υ	U	Ρ	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	6.1
4	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Lx	Ų	G	U	υ	Ρ	Vx	υ	Vx	Q	Q	Fol	20.9
5	Ac	U	А	U	А	U	U	Q	υ	Lx	U	G	U	U	Р	Vx	U	U	Q	Q	Fol	1.7
6	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Lx	υ	G	U	υ	Ρ	Vx	U	U	Q	Q	Fol	3.5
7	Ac	U	А	U	Α	U	U	Q	U	Lx	U	G	U	U	Р	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	3.1
8	Ac	U	А	U	Α	U	А	Q	U	Lx	υ	G	U	U	Ρ	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	8.3
9	Ac	U	А	U	Α	U	А	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	Ρ	Vx	υ	U	Q	Q	Fol	10.7
10a	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Vx	U	G	Lx	U	Ρ	Vx	υ	Vx	Q	Q	Fol	45.5
10b	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	Р	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	1 15.7
11a	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	Ρ	Vx	U	U	Q	Q	Fol	4.7
11b	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	Р	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	4.7
12	Ac	U	А	U	А	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	Р	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	2.9
13	Ac	U	А	U	А	U	А	Q	υ	Lx	U	G	Lx	U	Р	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	6.5
	Ac	υ	А	U	А	U	A (U)	Q	υ	U (L)	υ	G	L	U	Р	v	U	(U) J	Q	Q	Fol	

Figure 6 Sequences of suzukacillin-A (SZ-A) peptides nos. 1–13 and their relative quantities (%) in comparison with a general sequence of SZ-A [6]; abbreviations according to one-letter nomenclature; Ac = acetyl; U = α -aminoisobutyric acid; Lx = Leu or Ile; Vx = Val or Iva (isovaline, J); Fol = L-phenylalaninol. Chiral amino acids are of the L-configuration with the exception of D-Iva. For HPLC see Figure 2; for TLC see Figure 1.

The isomeric amino acids denoted as Vx and Lx are not distinguishable under our routine conditions of ESI-MS. Their differentiation was not part of this work. This is a basic problem of ESI-MS sequencing. It can be safely assumed that these amino acid exchanges do not influence bioactivity very much. Therefore, many sequences just indicating the exchange positions of these isomers have been included in the peptaibol database [22].

CONCLUSION

SZ-A is a microheterogeneous mixture of at least 15 metabolic fungal peptides belonging to the peptaibol

Copyright @ 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

family [22]. This mixture might also be considered as a natural peptaibol library [26,29,30]. The peptides are distinguished by their conserved and dynamic domains, the latter characterized by exchange of certain amino acids. The sequential comparison shows that neutral SZ-A peptides are closely related to alamethicin F-50 peptides, which possess no negatively charged *C*-terminal glutamic acid. The most conspicuous difference is the presence of Pro in position two of alamethicins. This may cause the minor, but distinct, differences found in the characteristics of potentialdependent pore formation [10] of these two membranemodifying peptaibols.

REFERENCES

- Ooka T, Shimojima Y, Akimoto T, Takeda I, Senoh S, Abe J. A new antibacterial peptide "Suzukacillin". *Agric. Biol. Chem.* 1966; **30**: 700–702.
- Ooka T, Takeda I. Studies of peptide antibiotic suzukacillin. Part II. Agric. Biol. Chem. 1972; 36: 112–119.
- Jung G, König WA, Leibfritz D, Ooka T, Janko K, Boheim G. Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part A. Sequence and conformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; **433**: 164–181.
- Brückner H, Nicholson GJ, Jung G, Kruse M, König WA. Gas chromatographic determination of the configuration of isovaline in antiamoebin, samarosporin (emerimicin IV), stilbellin, suzukacillins and trichotoxins. *Chromatographia* 1980; 13: 209–214.
- Brückner H, König WA, Aydin M, Jung G. Trichotoxin A40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 827: 51–62.
- Katz E, Aydin M, Lucht N, König W, Ooka T, Jung G. Sequence and conformation of suzukacillin A. *Liebigs Ann. Chem.* 1985; 1985: 1041–1062.
- Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 799–809.
- Irmscher G, Jung G. Die hämolytischen Eigenschaften der membran-modifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin and Trichotoxin. *Eur. J. Biochem.* 1977; **80**: 165–174.
- Mueller P, Rudin DO. Action potentials induced in biomolecular lipid membranes. *Nature* 1968; **217**: 713–719.
- Boheim G, Janko K, Leibfritz D, Ooka T, König WA, Jung G. Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part B. Pore formation in black lipid films. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; 433: 182–199.
- Schindler H. Autocatalytic transport of the peptide antibiotics suzukacillin and alamethicin across lipid membranes. *FEBS Lett.* 1979; **104**: 157–160.
- Grigoriev PA, Schlegel B, Kronen M, Berg A, Härtl A, Gräfe U. Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 763–768.
- Sansom MSP. Alamethicin and related peptaibols model ion channels. Eur. Biophys. J. 1993; 22: 105–124.
- Chugh JK, Wallace BA. Peptaibols: models for ion channels. Biochem. Soc. Trans. 2001; 29: 565–570.
- Whitmore L, Wallace BA. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. *Eur. Biophys. J.* 2004; **33**: 233–237.
- Chugh JK, Brückner H, Wallace BA. Model for a helical bundle channel based on the high-resolution crystal structure of Trichotoxin A50E. *Biochemistry* 2002; 41: 12934–12941.

PEPTAIBOL ANTIBIOTIC SUZUKACILLIN 327

- Duclohier H, Wroblewski H. Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues. *J. Membr. Biol.* 2001; 184: 1–12.
- Rindfleisch H, Kleinkauf H. Biosynthesis of alamethicin. FEBS Lett. 1976; 62: 276–280.
- Kleinkauf H, von Döhren H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. Eur. J. Biochem. 1990; 192: 1–15.
- Reiber K, Neuhof T, Ozegowski JH, von Döhren H, Schwecke T. A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*. J. Pept. Sci. 2003; 9: 701–713.
- Raap J, Erkelens K, Ogrel A, Skladnev DA, Brückner H. Fungal biosynthesis of non-ribosomal peptide antibiotics and α,αdialkylated amino acid constituents. *J. Pept. Sci.* 2005; **11**: 331–338.
- Whitmore L, Chugh JK, Snook CF, Wallace BA. The peptaibol database: a sequence and structure resource. J. Pept. Sci. 2003; 9: 663–665.
- Degenkolb T, Berg A, Gams W, Schlegel B, Gräfe U. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragments ions. J. Pept. Sci. 2003; 9: 666–678.
- 24. Psurek A, Neusüβ C, Degenkolb T, Brückner H, Balaguer E, Imhof D, Scriba GKE. Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis – mass spectrometry. J. Pept. Sci. 2005; in press; DOI:10.1002/psc.720
- Jaworski A, Brückner H. New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. J. Pept. Sci. 2000; 6: 149–167.
- Jaworski A, Brückner H. Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flavipes. J. Pept. Sci.* 2001; **7**: 433–447.
- Jaworski A, Kirschbaum J, Brückner H. Structures of trichovirin II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243. J. Pept. Sci. 1999; **5**: 341–351.
- Pätzold R, Brückner H. Chiral separation of amino acids by gas chromatography. In *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography, Journal of Chromatography Library.* Vol **70**, Molnár-Perl I (ed.). Elsevier: Amsterdam, 2005; 98–118.
- Jung G. Natural peptide libraries of microbial and mammalian origin. In *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Jung G (ed.). Wiley-VCH: Weinheim, 1996; 1–18.
- 30. Lehr N, Antelo L, Meffert A, Anke H, Weber R, Sterner O. Antiamoebins, myrocin B and the basis of antifungal antibiosis in the coprophilous fungus Stilbella erythrocephala. FEMS Microbiol. Ecol. 2005; in press.

Copyright © 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Amino Acids (2006) 30: 435–443 DOI 10.1007/s00726-005-0275-9

Amino Acids Printed in Austria

Peptaibiomics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS

C. Krause, J. Kirschbaum, and H. Brückner

Department of Food Sciences, Interdisciplinary Research Center, University of Giessen, Giessen, Germany

Received August 5, 2005 Accepted October 1, 2005 Published online April 20, 2006; © Springer-Verlag 2006

Summary. "Proteomics" and "peptidomics" are used as technical terms to define the analysis and study of all proteins and peptides expressed in an organism or tissue. In analogy we propose the name *peptaibiomics* for the analysis of a group of fungal peptide antibiotics (peptaibiotics) containing the characteristic amino acid Aib (α -aminoisobutyric acid). In analogy to the peptidome the complete expression of peptaibiotics by fungal multienzyme complexes should be named the *peptaibiome*.

Peptaibiotics are defined as peptides containing Aib and exerting a variety of bioactivities. They comprise the sub-groups of *N*-acetylated peptaibols, characterized also by a *C*-terminal amide-linked 2-amino alcohol, and lipopeptaibols having in place of an acetyl group a lipophilic fatty acid acyl group. Furthermore, lipoaminopeptides are also known with long-chain fatty acid on the *N*-termini, a lipoamino acid in position three and a strongly basic secondary or tertiary amine form a subgroup of mixed forms which could not be integrated in one of these three previously mentioned groups.

Here we present a specific and rapid screening method on the peptaibiome applicable directly onto filamentous fungi cultured in a single Petri dish. The method comprises solid-phase extraction (SPE) of peptaibiotics followed by on-line reversed-phase HPLC coupled to an ion trap electrospray tandem mass spectrometer (ES-MS). The presence of these peptides is indicated by characteristic mass differences of $\Delta m = 85.1$ Da representing Aib-residues which can be observed in the *b*-series of acylium fragment ions resulting from ES-MS. Partial sequences can be deduced from the data and compared with structures compiled in electronic peptaibol data bases. The judgement is possible whether or not structures are novel, already known or related to known structures. Suitability of the method is demonstrated with the analysis of strains of *Trichoderma* and its teleomorph *Hypocrea*. New sequences of peptaibiotics are presented and those being related to established 10- to 18-residue peptaibols trichovirin, trichogin and trichotoxin, which have been described in the literature.

Keywords: α-Aminoisobutyric acid – Electrospray mass spectrometry – Fungal secondary metabolites – Peptide libraries – Solid-phase extraction

Introduction

The *proteome* is defined as the entirety of proteins expressed in an organism, tissue or a body fluid. The term "*proteomics*" is defined as the analytical methodology used to study these proteins (Baggermann et al., 2004;

Soloviev and Finch, 2005). In analogy to the *proteome* and the *peptidome* we define the *peptaibiome* as the entire expression of fungal *pept*ides containing the characteristic non-protein amino acid *Aib*. Accordingly, *peptaibiomics* is the analytical methodology for structural characterization of all *peptaibiotics* expressed in fungal cells.

A *peptaibiotic* is defined as fungal *pept*ide containing *Aib* and exerting *antibiotic* or other bioactivities. The subgroup of *peptaibols* are *pept*ides containing *Aib* and a 2-amino alcohol.

Peptide antibiotics of the group of peptaibiotics/ peptaibols are fungal secondary metabolites characterized by the occurrence of the non-protein Aib and in many cases the additional presence of other α -alkylated amino acids like α -ethylalanine (isovaline, Iva) or in a single case of α -ethylnorvaline (Etnor).

These unique peptides are produced by a widespread group of filamentous fungi comprising soil and aquatic species, wood decaying, plant pathogenic, fungicolous and coprophilous species. Known members of this group consist of 5 up to 20 residues (Degenkolb et al., 2003).

The structural diversity of the peptaibiotics is caused by the varying amounts of protein and non-protein amino acids and varying substitution on *N*- and *C*-termini. The *N*-termini might be acetylated or acylated by a fatty acid of medium chain length; then the resulting peptaibols are terminated lipopetaibols (Toniolo et al., 2001; Auvin-Guette et al., 1992). The *C*-termini of most peptaibiotics consists of an amide bound 2-amino alcohol like Pheol, Valol or Leuol or, less frequently, complex heterocyclic residues, an amino acid with free or methylated carboxy group or a sugar alcohol, amine, amide or diketopiperazine (Brückner et al., 1991a, b; Degenkolb et al., 2003). 436

C. Krause et al.

Peptaibiotics exert a broad range of biological activities depending on their chain length and particular structural features. They have been described to exhibit antibacterial activity primarily against gram-positive bacteria (Leclerc et al., 2001; Dornberger et al., 1995; Gräfe et al., 1995), and display antifungal activity (Berg et al., 1996; Dornberger et al., 1995), antiviral activity (Kim et al., 2000; Yun et al., 2000), antimycoplasmic activities (Leclerc et al., 2001; Beven et al., 1998) and pigment induction in Phoma destructiva (Ritzau et al., 1997; Berg et al., 2003). Bioactivity includes also haemolysis of erythrocytes and leucocytes (Irmscher and Jung, 1977), insecticidal action on larvae (Matha et al., 1992; Bandani et al., 2001; Landreau et al., 2002), inhibition of the mitochondrial ATPase and uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria (Krishna et al., 1990; Okuda et al., 1994; Gupta et al., 1991; Bullough et al., 1982). Furthermore, neuroleptic activities including induction of hypothermia in mice have been reported for ampullosporins and trichofumins (Ritzau et al., 1997; Kronen et al., 2001; Berg et al., 2003).

Amphiphilic peptaibols of sufficient chain-length are membrane-active polypeptides. They form voltage-dependent or independent ion channels or pores in natural and artificial bilayer membranes, and show, owing to the presence of Aib, high preference for α -helical conformations including 3₁₀-helical motifs (Boheim, 1974; Chugh and Wallace, 2001; Chugh et al., 2002; Whitmore and Wallace, 2004; Gessmann et al., 2003; Grigoriev et al., 2002, 2003; Duclohier et al., 2004; Jung et al., 2003).

Presently, the family of peptaibiotics comprises more than 300 sequences many of which are structurally closely related. Informations and overviews on structures and taxonomy of fungal producers of peptaibiotics are available from the Peptaibol Database (Whitmore et al., 2003) or databases such as Antibase 2.0 (Laatsch, 1997). Occurrence, structures and sequencing methods of peptaibiotics and peptaibols have been compiled in a review by Degenkolb et al. (2003).

The development of a method is required which (*i*) provides sufficient and reliable diagnostic information on peptaibiotic production and (*ii*) enables a rapid analysis and differentiation among new and already known peptaibiotics. This is of major interest because a still growing number of peptaibiotics is discovered.

In continuation of our work on screening fungi for the production of Aib-peptides (Brückner et al., 1991b; Jaworski and Brückner, 2001; Kirschbaum et al., 2004; Krause et al., 2005; Psurek et al., 2005), here we present a chromatographic screening method which enables the rapid and sensitive detection and sequential characterization of this particular group of fungal peptides. The method is applicable directly onto filamentous fungi grown on single agar plates. The method comprises solid-phase extraction (SPE) followed by on-line reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (ES-MS). Mass spectral data are acquired with an ion trap mass spectrometer operating in the positive ion mode. The presence of the marker amino acid Aib, detected by characteristic mass differences of fragment ions of $\Delta m = 85.1 \text{ Da}$ (Aib-H₂O), together with diagnostic ions from other constituents, confirm the biosynthesis of peptaibiotics. By comparing partial sequences deduced from the data with those compiled in databases the judgment is possible whether or not structures are novel, identical or related to structures already known. The method has been applied on species and strains of Trichoderma and its teleomorph Hypocrea. The peptaibiome, i.e. the entire expression of peptaibiotics might be also considered a natural peptaibiotic library (Jung, 1996).

Peptaibiomics will allow the determination of peptaibiotics biosynthesized by the multienzyme complexes (Raap et al., 2005) of a multitude of filamentous fungi grown on a single agar plate without time-consuming isolation and purification procedures. This method can be extended to analyze fungi growing in (sub)liquid media, or in natural habitats such as: soil, water, decaying organic material, dung, faeces, or as parasites of plants, mushrooms, toadstools and insects.

Peptaibiomics comprises growth of fungi on suitable media, solid-phase extraction of the entirety of peptaibiotics, HPLC profiling and complete or partial ES-MS/MS sequencing of peptaibiotics, and finally sequence matching using data bases.

Materials and methods

Chemicals

Acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) (all of gradient grade quality) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); dichloromethane (DCM) was from Carl Roth (Karlsruhe, Germany); trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Fluka (Deisenhofen, Germany).

Culture of fungi

Fungi were supplied as growing cultures or lyophilized spores from the culture collections CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) and BCCM/MUCL (The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/(Agro) Industrial Fungi & Yeasts Collection, Louvain-la-Neuve, Belgium). The filamentous fungi investigated are listed in Table 1.

Selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS

Table 1.	Filamentous	fungi	screened	for	peptaibiotic	production
----------	-------------	-------	----------	-----	--------------	------------

Filamentous fungi	Culture collection number
Trichoderma asperellum Samuels,	CBS 433.97
Trichoderma inhamatum Veerkamp & W. Gams	CBS 345.96
Trichoderma aggressivum	CBS 100526
<i>J. europaeum</i> Samuels & W. Gams <i>Trichoderma stromaticum</i> Samuels & Pardo-Schultheiss	CBS 101875
Hypocrea semiorbis Berkeley	CBS 244.63
Hypocrea vinosa Cooke	CBS 247.63
Hypocrea dichromospora Yoshim. Doi	CBS 337.69
Hypocrea gelatinosa (Tode: Fries) Fries	CBS 724.87
Hypocrea nigricans (Imai) Doi	MUCL 28439
Hypocrea muroiana Hino & Katsumoto	MUCL 28442
Hypocrea lactea (Fries: Fries) Fries	CBS 853.70

Malt-extract agar was prepared by dissolving 30.0 g malt extract (Oxoid, Wesel, Germany), 3.0 g soy peptone (Oxoid) and 15.0 g agar (Fluka) in 11 demineralized water (final pH 6–6.5), followed by sterilization for 20 min at 121 °C.

Freeze dried cultures were suspended in sterile water (1.5 ml) and, after soaking for 15 min, transferred to Petri dishes (9.5 cm diameter) with malt extract agar. This medium was also used for storage of growing moulds at 4 °C in the refrigerator. For analyses the moulds were transferred under sterile conditions to three Petri dishes with malt-extract agar and were grown for 7 days under daylight at ambient temperature.

Solid phase extraction of peptaibiotics

Fungal cultures were grown for seven days on malt-extract agar in Petri-dishes of 95 mm diameter. Extraction was performed with three 5 ml portions of a mixture of MeOH and DCM (1/1, v/v). Extracts were combined, centrifuged at 3500 rpm for 15 min and the supernatant was evaporated to dryness using a rotary evaporator. Amounts of 10 ml MeOH/H₂O (1/2, v/v) were added and the resulting solution was passed with the aid of a syringe through a conditioned Sep-Pak C-18 cartridge, (1.5 cm × 1.0 cm I.D.; particle size 80 µm; Waters, Milford, MA). Conditioning was performed by washing successively with 10 ml portions of MeOH, H₂O and MeOH/H₂O (1/2, v/v). Then the cartridge was washed with 10 ml water and 10 ml MeOH/H₂O (1/2, v/v).

Finally, peptides adsorbed were eluted with 10 ml MeOH (100%). The effluent was collected in a tarred round-bottomed flask and evaporated to dryness using a rotary evaporator. The weight of the re-

 Table 2. Gradient program for analytical HPLC separation

maining residue was determined gravimetrically and MeOH was added in order to yield an about 1% solution (w/v). Aliquots of 10 µl were analyzed by HPLC-ESI-MS.

437

Testing of the efficiency of SPE

The efficiency and completeness of the SPE procedure described above was proved with test solutions of the 11- to 20-residue peptaibols antiamoebin (Jaworski and Brückner, 2000), paracelsin (Brückner et al., 1984), alamethicin F50 and alamethicin F30 (Kirschbaum et al., 2003), trichobrachin (Brückner et al., 1993) and acretocin (Kirschbaum et al., 2004). Amounts of 1.0 mg of the peptaibols were dissolved in 1 ml MeOH, then 2 ml H₂O were added and the resulting solutions were applied to the Sep-Pak cartridges. Then the cartridges were washed with each 10 ml of H₂O and MeOH/H₂O (1/2, v/v), then the peptaibols eluted with 10 ml MeOH. Each step was analyzed by HPLC. The sum of the peak areas of the respective peptaibol before and after treatment with Sep-Pak cartridges were determined and compared. Under the conditions of the controlled washing procedure of the cartridge with water and the MeOH/H₂O mixture, no peptaibiotic eluted. Complete elution was accomplished with 100% MeOH (10 ml).

Chromatography

For analytical HPLC a HP 1100 series instrument comprising a Model G1322A degasser, G1312A binary pump, G1313A autosampler, G1316A column thermostat, G1314A UV/VIS detector, and software HP Chem Station for LC (Rev. A.04.02) were used (all from Agilent, Waldbronn, Germany or Palo Alto, CA, USA). Analysis of the extracts by HPLC was performed on a Kromasil KR100 column, 150 mm × 4.6 mm i.d., 3.5 µm particle size (EKA Chemicals, Bohus, Sweden) using a binary gradient (see Table 2) at a detector wavelength of 205 nm. Eluent A consisted of MeCN/MeOH/water (32/32/36, v/v/v), and eluent B consisted of MeCN/MeOH (1/1, v/v); to both eluents 0.1% TFA (v/v) was added. The column temperature was set on 35 °C. For gradient program and flow rate see Table 2.

Mass spectrometry

For ES-MS a LCQTM MS (Thermo Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) was used. Extracts were analyzed by online HPLC-MS. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas and helium (purity >99.9990%, Messer- Griesheim, Krefeld, Germany) as collision gas. Sequence analysis was carried out in the positive ionization mode. The m/z values were recorded in centroid mode and have an accuracy of ± 0.5 Da. Conditions for positive ionization mode were: spray voltage 4.00 kV, heated capillary temperature 230 °C, capillary voltage +3.0 V, tube lens offset +30.0 V, sheath gas 50 units, auxiliary gas 5 units, maximum ion time 1000 ms. For online HPLC-MS the temperature of the heated capillary was set to 250 °C, sheath gas to 65 units, auxiliary gas to 20 units. For automatic mass calibration a mixture was used comprising caffeine (m/z 195.1), Met-Arg-Phe-Ala (m/z 524.3) and the

Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Flow rate (ml/min)	Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Flow rate (ml/min)
0	100	0	0.8	75	0	100	1.0
5	100	0	0.8	76	100	0	1.0
45	50	50	0.8	85	100	0	1.0
65	0	100	0.8				

438

C. Krause et al.

perfluoronated Ultramark 1621 (*m*/*z* 1022.0, 1122.0, 1222.0, 1322.0, 1422.0, 1522.0, 1622.0, 1722.0, 1822.0, 1921.9).

A collision induced dissociation (CID) energy of 0% was used for scanning of molecular masses and fragments resulting from cleavage of the extremely labile Aib-Pro bond. A CID energy of 45% was used for generating series of characteristic fragment ions.

Results and discussion

Use of the Kromasil KR100 column together with the gradient system consisting of MeOH, ACN and water provided best separations for short-chain (11–16 residues) and long-chain (17–20 residues) peptaibiotics of varying lipophilicity.

The purified peptides resulting from SPE were analyzed using HPLC-ES-MS. Molecular ions and more or less complete series of characteristic fragment ions were generated. From the mass differences (Δm) of fragment ions the presence of the marker amino acid Aib, characterized

Tric	hoderma asperellum (CBS 433.97)	MW
1	[227]-Aib-Val-Aib-Aib-Ala-Ser-[70]	809
2	[227]-Aib-Lxx-Aib-Aib-Ala-Aib-[86]	837
3	[270]-Lxx-Aib-213-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Valol	1689
4	[270]-Lxx-Aib-213-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Valol	1689
5	[270]-Lxx-Aib-213-Aib-Aib-Ser-Aib-Aib-210-Aib-Vxx-GIn-Valol	1733
6	[270]-Lxx-Aib-213-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Valol	1703
7	[270]-Lxx-Aib-213-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-210-Aib-Vxx-Gln-Valol	1717
Tric	hoderma aggressivum f. europaeum (CBS 100526)	мw
1	[184]-GIn-Lxx-Aib-Aib-Aib-Leuol	796
2	[184]-GIn-Lxx-Aib-Ser-Lxx-Leuol	826
з	[184]-GIn-Lxx-Aib-Ala-Lxx-Leuol	810
4	[286]-Lxx-Aib-213-Vxx-Aib-142-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Valol	1719
5	[286]-Lxx-Aib-213-Gly-Aib-Lxx-Aib-Aib-210-Aib-Aib-Gln-Valol	1733
6	[286]-Lxx-Vxx-GIn-Aib-170-Ala-Vxx-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Valol	1747
Tric	choderma inhamatum (CBS 345.96)	мw
1	[242]-Lxx-Aib-Lxx-Aib-Aib-242-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Lxxol	1675
2	[256]-Lxx-Aib-Lxx-[579]	1146
з	[185]-Ala-Aib-Aib-GIn-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Aib-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Lxxol	1703
4	[185]-Ala-Vxx-Aib-Gln-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Aib-Aib-210-Aib-Aib-Gln-Lxxol	1717
5	[185]-Ala-Aib-Aib-GIn-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Vxx-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Lxxol	1717
6	[256]-Vxx-Aib-GIn-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Vxx-Aib-210-Aib-Aib-GIn-Lxxol	1731
7	[185]-Ala-Vxx-Aib-Gln-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Vxx-Aib-210-Aib-Aib-Gln-Lxxol	1731
Tric	choderma stromaticum (CBS 101875)	мw
1	[184]-Ala-Lxx-Aib-Ser-Lxx-Vxx-Ala-Vxx-[616]	1538
2	[368]-Vxx-Ala-213-Vxx-299-210-Aib-Aib-Gln-Lxxol	1774
3	[284]-Ala-Vxx-Vxx-213-Vxx-Aib-213-210-Aib-Aib-Gln-Lxxol	1788
4	[284]-Ala-Vxx-Vxx-213-Vxx-Aib-213-210-Aib-Vxx-Gln-Lxxol	1802

Fig. 1. Examples of partial sequences from *Trichoderma* strains screened for peptaibiotics; abbreviations according to the standard three-letter code; *Aib* α -aminoisobutyric acid; *Lxx* Leu or Ile; *Vxx* Val or Iva (isovaline); *Leuol* leucinol; *Valol* valinol; *Lxxol* leucinol or isoleucinol; *MW* molecular weight. Fragment ions, the structure of which could not be assigned, are put in squared brackets. Chirality of constituents (exception Iva) was determined by enantioselective GC-MS according to procedures described (Pätzold and Brückner, 2005)

by $\Delta m = 85.1$ Da, as well as other peptide constituents could be deduced. If mass fragments could not be assigned unambiguously only the mass differences were registered.

The isomeric amino acids in extracts cannot be distinguished by HPLC-ESI-MS. Therefore Val and Iva are denoted Vxx, and Leu and Ile designated as Lxx in partial sequences of peptides shown in Figs. 1 and 3.

The mass differences of $\Delta m = 213$ Da in many partial sequences presented in Figs. 1 and 3 result from the Gln-Aib bonds which are particularly stable under the fragmentation conditions of ES-MS (Jaworski et al., 1999; Kirschbaum et al., 2003).

The observed fragment ions of $\Delta m = 197$ Da of the protonated dipeptide Pro-Vxx and of $\Delta m = 211$ Da of Pro-Lxx result from the cleavage of the *C*-terminal prolyl peptide (Figs. 1 and 3). The particular lability of the Aib(Iva)-Pro bond has been recognized previously (Jaworski et al., 1999; Jaworski and Brückner 2000, 2001) and is of diagnostic value.

The peptaibiome of Trichoderma species

In all extracts of the *Trichoderma* strains analyzed characteristic mass differences of $\Delta m = 85.1$ Da could be detected by ES-MS and partial sequences of peptaibiotics could be assigned.

Sequences resulting from analyses of *Trichoderma asperellum*, *Tr. inhamatum*, *Tr. aggressivum* f. *europaeum* and *Tr. stromaticum* are compiled in Fig. 1. Comparison of these sequences with those of peptaibiotics compiled in the Peptaibol Database (Whitmore et al., 2003) provided novel and already known structures.

The HPLC elution profile of the purified extract of *Trichoderma asperellum* (CBS 433.97) and the MS (CID 45%) of the peptide eluting at 54.5 min is shown as an example in Fig. 2.

Sequence no. 7 from *Tr. asperellum* might be identical with trichotoxin A50I from *Trichoderma viride*, strain NRRL 5242 (Przybylski et al., 1984). For sequences see Fig. 5. Sequences no. 3 to 6 are most likely new analogues of the trichotoxin A50 group.

The partial sequence no. 4 of *Tr. aggressivum* f. *europaeum* is similar to hypomurocin BI (Fig. 5) isolated from *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto (Becker et al., 1997). The fragment ion of $\Delta m = 142$ Da indicates the presence of Gly-Aib. Sequences no. 5 and 6 are considered to be new analogues of hypomurocin B.

Peptides nos. 3 to 7 of *Tr. inhamatum* correspond to partial sequences of trichovirins (Jaworski et al., 1999).

Selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS



Fig. 2. a Analytical HPLC of the purified mycelial extract of *Trichoderma asperellum* after clean-up with Sep-Pak cartridge, **b** fragment ions resulting from ES-MS of the peptide eluting at 54.5 min. Characteristic masses are in bold characters. The partial sequence deduced therefrom is shown in Fig. 1 (sequence no. 6). For chromatographic conditions see Materials and methods

439

440

Hypocrea muroiana MUCL 28442

[291]-Phe-Aib-Lxx-Aib-Lxx-[186]

C. Krause et al.

мw

1020

2	[199]-Ala-Aib-Aib-213-Aib-Aib-Ser-Aib-Lxx-[842]	1950
3	[199]-Ala-Aib-Aib-213-Aib-Aib-Ser-Vxx-Vxx-[816]	1924
4	[199]-Ala-Aib-Aib-213-Aib-Aib-Ser-Aib-Lxx-196-Aib-Lxx-GIn-GIn-Pheol	1909
Нуре	ocrea nigricans MUCL 28439	мw
1	[157]-Vxx-Vxx-Aib-[623]	1162
2	[270]-Vxx-Aib-Lxx-[623]	1190
Нуре	ocrea gelatinosa CBS 724.87	мw
1	[157]-Vxx-Lxx-Aib-Vxx-[510]	1176
2	[142]-Gln-Lxx-Lxx-Aib-[623]	1204
Нуре	ocrea dichromospora CBS 337.69	мw
1	[184]-Ala-Vxx-Aib-Aib-Aib-Leuol	726
2	[184]-Ala-Lxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	740
3	[184]-Ala-Lxx-Aib-Ala-Lxx-Leuol	754
4	[255]-Lxx-Aib-Gly-Lxx-Vxx-[247]	969
Нуре	ocrea vinosa CBS 247.63	мw
1	[212]-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Vxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	1038
2	[212]-Gly-Lxx-Aib-Gly-Gly-Vxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	1052
3	[212]-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Lxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	1052
4	[212]-Gly-Lxx-Aib-Gly-Gly-Lxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	1066
Нур	ocrea semiorbis CBS 244.63	MW
1	[284]-Ala-Aib-Ala-213-Aib-Aib-Leu-Gly-Aib-[788]	1937
2	[284]-Ala-Aib-Ala-213-Vxx-Aib-Aib-Gly-Leu-[774]	1937
3	[284]-Ala-Aib-Aib-213-Vxx-Aib-Aib-Aib-Aib-[774]	1951
4	[284]-Ala-Aib-Aib-213-Ala-Leu-Aib-Gly-Leu-[788]	1965
Нуре	ocrea lactea CBS 853.70	мw
1	[212]-Gly-Lxx-Aib-Gly-Gly-Vxx-Aib-Gly-Vxx-Leuol	1038
2	[212]-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Lxx-Aib-Gly-Vxx-Leuol	1038
3	[212]-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Lxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	1052
4	[212]-Gly-Lxx-Aib-Gly-Gly-Lxx-Aib-Gly-Lxx-Leuol	1066

Fig. 3. Examples of partial sequences from *Hypocrea* strains screened for peptaibiotics; abbreviations according to the standard three-letter code; *Aib* α -aminoisobutyric acid; *Lxx* Leu or Ile; *Vxx* Val or Iva (isovaline); *Leuol* leucinol; *Pheol* phenylalaninol; *MW* molecular weight. Fragment ions, the structure of which could not be assigned, are put in squared brackets. Chirality of constituents (exception Iva) was determined by enantioselective GC-MS according to procedures described (Pätzold and Brückner, 2005)

Amino acid exchanges could be located in position nos. 4 (Leu) and 10 (Gly).

Other partial sequences resulting from analyses of *Tr*: *aggressivum* f. *europaeum*, *Tr*: *inhamatum*, *Tr*: *asperellum* and all sequences identified from *Tr*: *stromaticum* did not correspond with structures compiled in databases. Thus, the fungi are producers of novel microheterogeneous peptaibiotics.

The peptaibiome of Hypocrea species

In extracts of the filamentous fungi *Hypocrea semiorbis*, *Hyp. vinosa*, *Hyp. dichromospora*, *Hyp. gelatinosa*, *Hyp.*

nigricans, Hyp. muroiana and *Hyp. lactea* peptides containing Aib could be detected. Partial sequences of these peptides could be deduced from series of fragment ions. Examples of partial sequences of peptaibiotics are shown in Fig. 3.

The HPLC elution profile of the purified extract of *Hypocrea muroiana* and the MS (CID 45%) of the peptide eluting at 51.7 min is presented in Fig. 4.

Hypocrea vinosa and *Hyp. lactea* produce peptaibols, which are considered to be identical with trichogin GA IV and trikoningin KB I or to be novel analogues of these peptaibols. Sequences no. 4 from *Hyp. vinosa* and no. 4 from *Hyp. lactea* are identical with trichogin GA IV isolated from *Tr. longibrachiatum* (Auvin-Guette et al., 1992) and the partial sequence no. 1 from *Hyp. vinosa* might be trikoningin KBI from *Tr. koningii* (Auvin-Guette et al., 1993). For comparison of sequences see Fig. 5.

For the other fragments and partial sequences shown in Fig. 3 no similarity could be validated by comparison with sequences stored in databases. Consequently, the sequences determined are assumed to be represent new structures of the peptaibol family.

Conclusions

A method named peptaibiomics is presented aimed on the complete analysis of all peptides containing Aib (i.e. peptaibiotics) from growing fungal cultures on agar plates. The method might be extended on solid-phase substrates or material from the natural habitats.

Factors such as composition of growth medium (chemically defined or complex medium), physicochemical parameters such as temperature, light or radiation, aeration, stress factors etc. governing the peptaibiome can be investigated and correlated with sequences of peptaibiotics.

Extracts from a single Petri dish applied to SPE and LC-ES-MS provide sufficient diagnostic information on the entire of peptaibiotics production. Using characteristic N- and C-terminal mass fragments, among peptaibiotics and subgroups such as peptaibols, lipopeptaibols or lipo-aminopeptides can be distinguished. Moreover, as structures of almost 300 peptaibiotics are known, the use of peptaibiomics will enable a decision whether or not structures are novel or related or identical to already known structures.

The peptaibiome might also be an important tool for establishing or supporting taxonomic species concepts in fungi (Druzhinina and Kubicek, 2005). Selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS



Fig. 4. a Analytical HPLC of the purified mycelial extract of *Hypocrea muroiana* after clean-up with Sep-Pak cartridge, **b** fragment ions resulting from ES-MS of the peptide eluting at 51.7 min. Characteristic masses are in bold characters. The partial sequence deduced therefrom is shown in Fig. 3 (sequence no. 3). For chromatographic conditions see Materials and methods

441

442	C. Krause et al.
Trichotoxin A50I	Ac Aib Gly Aib Leu Aib Gln Aib Aib Aib Ala Aib Aib Pro Leu Aib Iva Gln Valol
<i>Tr. asperellum</i> sequence 7	[270] Lxx Aib [213] Aib Aib Ala Aib Aib [210] Aib Vxx Gln Valol
Hypomurocin Bl	Ac Aib Ser Ala Leu Aib GIn Aib Val Aib Gly Aib Aib Pro Leu Aib Aib GIn Valol
<i>Tr. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> sequence 4	[286] Lxx Aib [213] Vxx Aib [142] Aib [210] Aib Aib GIn Valol
Trichogin GA IV	Oc Aib Gly Leu Aib Gly Gly Leu Aib Gly Ile Leuol
<i>Hyp. vinosa</i> sequence 4	[212] Gly Lxx Aib Gly Gly Lxx Aib Gly Lxx Leuol
<i>Hyp. lactea</i> sequence 4	[212] Gly Lxx Aib Gly Gly Lxx Aib Gly Lxx Leuol
Trichokoningin KBI	Oc Aib Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Leuol
<i>Hyp. vinosa</i> sequence 1	212] Gly Vxx Aib Gly Gly Vxx Aib Gly Lxx Leuol

Fig. 5. Comparison of sequences of previously described peptaibiotics and sequence data resulting from SPE/HPLC-ES-MS. For abbreviations see Figs. 1 and 3; Ac acetyl; Oc n-octanoyl

Acknowledgements

We thank our students Susanne Skrbek and Sabine Kempff, who contributed to parts of the experimental work. We also thank Dr. Thomas Degenkolb for valuable comments.

References

- Auvin-Guette C, Rebuffat S, Prigent Y, Bodo B (1992) Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. J Am Chem Soc 114: 2170–2174
- Auvin-Guette C, Rebuffat S, Vuidepot I, Massias M, Bodo B (1993) Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*. J Chem Soc Perkin Trans 1: 249–255
- Baggerman G, Verleyen P, Clynen E, Huybrechts J, De Loof A, Schoofs L (2004) Peptidomics. J Chromatogr 803: 3–16
- Bandani AR, Amiri B, Butt TM, Gordon-Weeks R (2001) Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. Biochim Biophys Acta 1510: 367–377
- Becker D, Kiess M, Brückner H (1997) Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea mur*oiana Hino et Katsumoto. Liebigs Ann Recueil 1997: 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
- Berg A, Grigoriev PA, Degenkolb T, Neuhof T, Härtl A, Schlegel B, Gräfe U (2003) Isolation, structure elucidation and biological activities of

Trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from Trichoderma sp. HKI 0276. J Peptide Sci 9: 810-816

- Beven L, Duval D, Rebuffat S, Riddell FG, Bodo B, Wroblewski H (1998) Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18residue peptaibols, trichorzins PA. Biochim Biophys Acta 1372: 78–90
- Boheim G, Hanke W, Jung G (1983) Alamethicin pore formation: voltagedependent flip-flop of α -helix dipoles. Biophys Struct Mech 9: 181–191
- Brückner H, Przybylski M (1984) Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. J Chromatogr 296: 263–275
- Brückner H, Kripp T, Kieß M (1991a) 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 Science, Leiden, Netherland, pp 347–349
- Brückner H, Maisch J, Reinecke C, Kimonyo A (1991b) Use of αaminoisobutyric acid for the detection of fungal polypeptide antibiotics. Screening of *Hypocrea*. Amino Acids 1: 251–257
- 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. Mainz Verlag, Mainz, pp 357–373
- Bullough DA, Jackson CG, Henderson PJF, Beechey RB, Linnett PE (1982) The isolation and purification of the elvapeptins. A family of peptide inhibitors of mitochondrial ATPase activity. FEBS Lett 145: 258–262
- Chugh JK, Wallace BA (2001) Peptaibols: models for ion channels. Biochem Soc Trans 29: 565–570
- Chugh JK, Brückner H, Wallace BA (2002) Model for a helical bundle channel based on the high-resolution crystal structure of Trichotoxin A50E. Biochem 41: 12934–12941

Selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS

- Degenkolb T, Berg A, Gams W, Schlegel B, Gräfe U (2003) The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. J Peptide Sci 9: 666–678
- Dornberger K, Ihn W, Ritzau M, Gräfe U, Schlegel B, Fleck WF (1995) Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chryso-sperma* Ap101. J Antibiot 48: 977–989
- Druzhinina I, Kubicek CP (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J Zhejiang Univ Sci 6B: 100–112
- Duclohier H, Alder GM, Bashford CL, Brückner H, Chugh JK, Wallace BA (2004) Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications for channel structure. Biophys J 87: 1705–1710
- Gessmann R, Brückner H, Petratos K (2003) Three complete turns of a 3_{10} -helix at atomic resolution: the crystal structure of Z-(Aib)₁₁-OtBu. J Peptide Sci 9: 753–762
- Gräfe U, Ihn W, Ritzau M, Schade W, Stengel 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, Berg A, Schlegel B, Heinze S, Gräfe U (2002) Formation of anion-selective membrane pores by texenomycin A, a basic lipopeptaibol antibiotic. J Antibiot 55: 826–828
- Grigoriev PA, Schlegel B, Kronen M, Berg A, Härtl A, Gräfe U (2003) Differences in membrane pore formation by peptaibols. J Peptide Sci 9: 763–768
- Gupta S, Krassnoff SB, Roberts DW, Renwick JAA (1991) Structures of efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolypocladium niveum*. J Am Chem Soc 113: 707–709
- 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
- Irmscher G, Jung G (1977) Die hämolytischen Eigenschaften der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin. Eur J Biochem 80: 165–174
- Jaworski A, Kirschbaum J, Brückner H (1999) Structures of trichovirin II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243. J Peptide Sci 5: 341–351
- Jaworski A, Brückner H (2000) New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. J Peptide Sci 6: 149–167
- Jaworski A, Brückner H (2001) Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flavipes*.J Peptide Sci 7: 433–447
- Jung G (1996) Natural peptide libraries of microbial and mammalian origin. In: Jung G (ed) Combinatorial peptide and nonpeptide libraries Wiley, Weinheim, pp 1–18
- Jung D, Redemann T, Kroll K, Meder K, Hirsch A, Boheim G (2003) Template-free self-assembling fullerene and lipopeptide conjugates of alamethicin form voltage-dependent ion channel of remarkable stability and activity. J Peptide Sci 9: 784–798
- Kim YH, Yeo WH, Kim YS, Chae SY, Kim KS (2000) Antiviral activity of antibiotic peptaibols, Chrysospermins B and D, produced by Apiocrea sp. 14T against TMV infection. J Microbiol Biotechn 1: 522–528
- Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H (2003) Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. J Peptide Sci 9: 799–809
- Kirschbaum J, Slavíčková M, Brückner H (2005) Acretocin, an efrapeptinanalogue peptaibiotic from Acremonium crotocinigenum. In: Flegel M, Fridkin M, Gilon C, Slaninova J (eds) Peptides 2004. Proceedings of the Third International and 28th European Peptide Symposium, September 5–10, 2004, Prague, Czech Republic. Kenes International, Geneva, pp 415–416
- Krause C, Kirschbaum J, Jung G, Brückner H (2006) Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin A from the mold *Trichoderma viride*. J Peptide Sci 12 (in press)

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

443

- Kronen M, Kleinwächter P, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U (2001) Ampullosporins B, C, D, E₁, E₂, E₃ and E₄ from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053: structures and biological activities. J Antibiot 54: 175–178
 Laatsch H (1997) Antibase 2.0 a database for rapid structure identifica-
- tion of microbial metabolites. Chemical Concepts, Weinheim Landreau A, Pouchus YF, Sallenave-Namot C, Biard JF, Boumard MC, Du Pont TR, Mondeguer F, Goulard C, Verbist JF (2002) Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. J Microbiol Methods 48: 181–194
- Leclerc G, Goulard C, Prigent Y, Bodo B, Wroblewski H, Rebuffat S (2001) Sequences and antimycoplasmic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. J Nat Prod 64: 164–170
- Matha V, Jegorov A, Kiess M, Brückner H (1992) Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, α-aminoisobutyric acidrich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. Tissue Cell 24: 559–564
- 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: 482–445
- Pätzold R, Brückner H (2005) Chiral separation of amino acids by gas chromatography. In: Molnar-Perl I (ed) Quantitation of amino acids and amines by chromatography. J Chromatogr Libr 70: 98–118
- 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* hydrolyses. Biomed Mass Spectrom 11: 569–582
- Psurek A, Neusüss C, Degenkolb T, Brückner H, Balaguer D, Imhoff D, Scriba GKE (2006) Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. J Peptide Sci 12: 279–290
- Raap J, Erkelens K, Ogrel A, Skladnev DA, Brückner H (2005) Fungal biosynthesis of non-ribosomal peptide antibiotics and α,α-dialkylated amino acid constituents. J Peptide Sci 11: 331–338
- Ritzau M, Heinze S, Dornberger K, 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
- Soloviev M, Finch P (2005) Peptidomics, current status. J Chromatogr 815: 11–24
- Toniolo C, Crisma M, Formaggio F, Peggion C, Epand RF, Epand RM (2001) Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides. Cell Mol Life Sci 58: 1179–1188
- Whitmore L, Chugh JK, Snook CF, Wallace BA (2003) The peptaibol database: a sequence and structure resource. J Peptide Sci 9: 663–665
- Whitmore L, Wallace BA (2004) Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. Eur Biophys J 33: 233–237
- Yun BS, Yoo ID, Kim YS, Lee SJ, Kim KS, Yeo WH (2000) Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. Tetrahedron Lett 41: 1429–1431

Authors' address: Prof. Dr. Hans Brückner, Department of Food Sciences, Interdisciplinary Research Center, University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Giessen, Germany,

Fax: +49-641-99-39149, E-mail: hans.brueckner@ernaehrung.unigiessen.de

Entwurf

Peptaibiomics: Microheterogeneity, Kinetics and Sequences of Peptaibiotics Trichobrachins from *Trichoderma parceramosum* BISSETT (syn. *T. longibrachiatum* RIFAI)

Corina Krause, Jochen Kirschbaum and Hans Brückner*

Interdisciplinary Research Centre for Bio Systems, Land Use and Nutrition (IFZ), Department of Food Sciences, University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany (phone:0049-641/99-39141; fax:0049-641/99-39149; e-mail: hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de)

Manuscript received:

Manuscript accepted:

Keywords

Trichobrachins α-Aminoisobutyric acid Electrospray ionization mass spectrometry Fungal secondary metabolites Fungal peptide libraries

Summary

From the culture broth of the filamentous fungus Trichoderma parceramosum, strain CBS 936.69, a mixture of polypeptide antibiotics (peptaibiotics) named trichobrachin (TB) was isolated. Three major groups designated TB I, TB II and TB III could be separated and isolated by preparative TLC on silica. Individual peptides of these three groups were sequenced by online LC/ESI-MSⁿ. The mixture of *N*-acetvlated peptides comprises ten 19-residue peptides with free C-terminal glutamine residues (TB I peptides), two 18-residue peptides with free C-terminal glutamine residues (TB II 1 und TB II 2), seven 20-residue peptides with C-terminal amidebonded phenylalaninol (TB II 3-10) und thirty-four 11-residue peptides with either C-terminal leuol, isoleucinol or valinol (TB III 1-34). Monitoring of the production and degradation of peptaibiotics in a pilot experiment revealed that TB II and TB III peptides are synthesized soon after the beginning of fermentation. After 5 days of fermentation amounts of TB II peptides decreased, whereas those of TB I peptides increased. This proofs that the peptides of TB I and TB II with free carboxy termini result from enzymic C-terminal degradation of TB II peptides. In analogy to the technical terms proteome and proteomics, for the entirety and dynamics of the Aib-containing peptides (peptaibiotics) the terms peptaibiom and peptaibiomics have been proposed. Consequently, the entire peptaibiom of T. parceramosum grown under submerse conditions in shake-flasks for five days comprises at least fifty-four peptides differing by chain length and microhetereogeneity, i.e. exchange of amino acids and amino alcohols.

1. Introduction

It has been shown that filamentous fungi such as *Trichoderma* are capable of producing a group of polypeptide antibiotics which contain, together with proteinogenic amino acids, relatively high proportions of α -aminoisobutyric acid (Aib) and, in many cases, isovaline (Iva) residues. **Peptaibiotics** are defined as fungal **pept**ides containing **Aib** and exhibiting antibiotic or other bioactivities. The abundant subgroup of **peptaibols** are **pept**ides containing **Aib** and a *C*-terminal 2-amino alcohol.

In accordance with other **-omics**, **peptaibiomics** represents the analytical methodology for the structural characterization of all peptaibiotics produced by fungal cells. The **peptaibiom** is defined as the entire expression of fungal peptides containing the characteristic non-protein amino acid Aib (Krause et al., 2006; Degenkolb et al., 2006). Members of this group consist of 5 up to 20 residues including the *C*-terminal moieties (Degenkolb et al., 2003; Szekeres et al., 2005).

Peptaibols/peptaibiotics may be classified into three groups according to the number of residues: (*i*) the long-chain peptides with 18-20 residues, (*ii*) the medium-chain peptides with 11 to 17 residues, and (*iii*) the short-chain peptides with less than 11 residues.

Members of the group of long-chain peptaibols include the 20-residue peptaibols alamethicin, suzukacillin, paracelsin, the 19-residue peptaibol chrysospermin, and the 18-residue peptaibol trichotoxin. Medium-chain peptaibols are the 15-residue peptaibols antiamoebin and 11-residue peptaibols hypomurocins (Kirschbaum et al., 2003; Jaworski and Brückner, 2000; Krause et al., 2006).

Short-chain peptaibiotics are represented by the 10-residue peptaibol trichorozin, the 9-residue peptaibiotics helioferin (Gräfe et al., 1995) or the 5-residue peptaibol peptaibolin (Hülsmann et al., 1998).

Notably, alamethicins, trichotoxins and antiamoebins have been most intensively studied with regard to crystal and solution structure and in particular their membrane-modifying properties which include formation of ion-channels (Fox and Richards, 1982; Whitmore and Wallace, 2004; Chugh et al., 2002; Boheim et al., 1983; Duclohier et al., 2004).

Several special bioactivities of peptaibiotics have been described. The 15-residue peptaibol ampullosporin and the 11- and 13-residue trichofumins induce pigment formation in *Phoma destructiva* (Ritzau et al., 1997; Berg et al., 2003) as well as neuroleptic activities including induction of hyperthermia in mice (Ritzau et al., 1997; Kronen et al., 2001; Berg et al., 2003).

The 16-residue peptaibiotic efrapeptin causes inhibition of mitochondrial ATP-ase and uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria (Gupta et al., 1991).

Owing to the non-ribosomal biosynthesis of peptaibiotics by fungal multienzyme complexes, peptaibiotics usually represent groups of peptides differing by chain-length. Exchange of amino acids and amino alcohols within these groups lead to microheterogeneous peptide mixtures. (Kleinkauf and von Döhren, 1996; Raap et al., 2005; Szekeres et al., 2005). These multicomponent mixtures might be considered as natural peptide libraries (Jung, 1996; Jaworski and Brückner, 2001).

From the culture broth of the mold *Trichoderma longibrachiatum* CBS 936.69, we had isolated a mixture of peptaibiotics named trichobrachins I-III (TB I-III).

Individual sequences could be determined by fast atom bombardment tandem mass spectrometry (FAB MS/MS). The positions of isobaric amino acids Val/Iva could be determined by automated Edman degradation after selective acidolytic cleavage and HPLC isolation of fragments (Kripp, 1990; Brückner et al., 1990; 1993). The stoichiometry and chirality of isolated peptides was determined using quantitative and enantioselective gas chromatographic amino acid analysis on Chirasil L-Val. It was found that trichobrachins consist of very microheterogeneous groups of peptides of varying chain-length. Since for the first time Aib-peptides with free carboxy termini had been structurally characterized, the name peptaibiols could no longer be applied and the name peptaibiotics was proposed (Brückner et al., 1990).

In order to prove how reproducible the biosynthesis of multicomponent peptaibiotics such as the trichobrachins is and in order to reinvestigate their structures we conducted a submerse culture of *T. longibrachiatum* and applied our advanced technique named peptaibiomics aimed at the determination of the entirety of peptaibiotics excreted into the culture broth (Krause et al., 2006). It should be noted in this context that the taxonomy of *T. longibrachiatum* RIFAI (CBS 936.69) was changed to *T. parceramosum* BISSETT by CBS in December 1992. This latter name is used in the following.

2. RESULTS

Kinetics of the formation of trichobrachins

Preliminary experiments in a single shake-flask and daily monitoring of the production of the peptides produced by *T. parceramosum* revealed that production of TB II and III could be detected after two days of submerse fermentation. After 6 days of fermentation quantities of TB II had decreased very much whereas TB I was formed. After 8 days of fermentation TB II was no longer detected.

In contrast, TB III was also detectable two days after the beginning of fermentation but quantities did not change very much after having reached a maxium after about 5 days. This was confirmed by a large-scale experiment providing after 5 days of fermentation sufficient TB peptides for isolation and sequencing as described in Experimental. The kinetics (time-dependence) of fermentation are shown in Figure 1. It proves that at the advanced state of fermentation, providing 19-residue peptides TB II with *C*-terminal Gln¹⁹. Further, from some of these 19-residue peptides a further Gln is released yielding the 18-reside peptides TB II 1 and 2 ending with C-terminal Gln¹⁸. Such successive cleavage of the *C*-termini could not be established for the 11-residue peptides representing the TB III group (see sequences presented in Figure 5).

Preparative isolation of trichobrachins I-III, characterization of constituents, and HPLC elution profiles

Based on the experiments described above a separate fermentation was conducted for 5 days and from a total of 4.8 l culture broth 309 mg of the crude peptide mixture TB, representing TB I-III, could be isolated by applying XAD-2 and Sephadex LH 20 column chromatography.

Parts of this mixture were subjected in portions to preparative TLC and peptide groups TB I, II and III could be isolated. The TLC of the isolated peptide groups TB I-III and of the crude TB is also shown in Figure 1. Crude TB and the isolated groups TB I-III were totally hydrolyzed and subjected to enantioselective GC-MS. The presence of Aib, Gly, D-Iva, L-Val, L-Leu, L-Ala, L-Glu (from Gln) and L-Pro could be determined in all peptides. Presence of L-Pheol was detected exclusively in TB II but not in TB I peptides. In the total hydrolysate of TB III the simultaneous presence of the amino alcohols L-Valol, L-Leuol and L-Ileol could be detected and the presence of D-Iva was established. The resulting chromatograms demonstrate the presence and chirality of constituents (Figure 2).

The HPLC-elution profiles of the isolated peptide groups TB I, II and III are presented in Figure 3. As can be seen analysis of TB I provided 8 peaks, TB II 10 peaks and TB III 18 peaks which could be shown to represent peptaibols/peptaibiotics by LC-MS (see below). Peaks designated with an x in the chromatograms resulted from the silica used for preparative TLC and peaks not denoted do not represent peptides.

Sequence analysis of TB I and TB II peptides

Sequence determination of isolated TB I and TB II peptides was performed using analytical HPLC-ESI-MS and direct infusion ESI-MS and by applying collision induced dissociation (CID) energy in positive and negative ionization mode. The diagnostic ions determined for TB I and II are listed in Table 1 and Table 2, respectively. From the data ten individual sequences of TB I peptides, each containing 19 amino acids, could deduced. TB II 1 and 2 are 18-residue peptides, whereas TB II 3-10 are 20-residue peptides (for sequences discussed in the following see Figure 5).

Some of the diagnostic ions, e.g. $(M+Na)^+$, $(M+H)^+$, b_{13} and y_{5P} (peptides with 18 amino acids), y_{6P} (peptides with 19 amino acids) and y_{7P} (peptides with 20 residues), were generated using online HPLC-ESI-MS. Positive ion MS-MS of $(M+H)^+$ precursor ions generated the *b* and y_p series (P for positive-ion mode) of fragment ions. MS-MS of M⁻ in negative ion mode provided fragment ions of the *y*-series that were designated as y_N (N refers to negative ion mode).

The majority of the diagnostic ions of the trichobrachins were identified *via* HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2 - 4) in positive ion mode from specific precursor ions such as $(M+H)^+$, b_{13} , b_8 or b_5 . Notably, the Gln⁷-Aib⁸ bonds are extremely stable under these conditions of HPLC-ESI-MS. However, diagnostic b_7 ions could produced by applying direct infusion of the peptides using 1% HCOOH in MeOH as solvent.

In contrast, the Aib¹³-Pro¹⁴ bond is extremely labile. Characteristic fragment ions of the b_{13} and y_{7P} series (analogously the ions y_{6P} (for TB I) and y_{5P} (for TB II 1-2)) were generated by cleavage of these bonds (Kirschbaum et al., 2003).

The b_1 fragment ions, which should be generated from *N*-Ac-Aib occurring in all peptides, were not detected under the conditions of positive ESI-MS. In the cases of TB I peptides the b_2 fragment ions that should result from Ac-Aib-Ala were not detected, whereas they were generated from TB II peptides. Thus the *N*-terminal amino acids were determined from fragment ions resulting from y_N series generated from direct infusion MS-MS of (M)⁻ in the negative ionization mode. For the 20-residue peptides TB II 3 to 10 the mass differences between ions y_{19N} and M⁻ (128 amu) represent the *N*-terminal fragment Ac-Aib. In the cases of 18-residue peptides TB II 1 and 2 this mass difference was observed between ions y_{17N} and M⁻. Analogously, the mass difference of ions y_{18N} and M⁻ established the Ac-Aib termini for the 19-residue peptides of TB I.

The *C*-terminal positions of Pheol in TB II peptides nos. 3-10 were deduced from the mass differences of 151 amu between y_{7P} (*m/z* 760, 774 or 788) and the internal fragments y_{7P} -AA (*m/z* 609, 623 or 637).

Trichobrachins TB I and TB II 1 and TB II 2 do not contain an amino alcohol.

The *C*-terminal sequences of TB I peptides were determined by MS-MS of the y_{6P} fragment ions. Analogously, for TB II 1 and TB II 2 sequence analyses were executed with MS-MS of the y_{5P} fragment and with the y_{7P} fragment for TB II 3-10. These characteristic fragment ions were formed as a result of the lability of Aib¹³-Pro¹⁴ bonds (Kirschbaum et al., 2003). For these *C*-terminal internal fragment ions the lowest masses detectable by MS-MS were m/z = 197, representing Pro¹⁴-Vxx¹⁵. Because the fragment ions y_{7P} (from TB II 3-10) as well as y_{6P} (from TB I) and y_{5P} (from TB II 1 and TB II 2) result from cleavage of these labile Aib-Pro bonds, Pro was assigned to be the first amino acid in these sequences. This was also deduced from the series of the corresponding negative ions y_{7N} , y_{6N} and y_{5N} , providing mass differences of 97 amu (Pro) and 99 amu (Vxx).

The loss of the amino alcohol Pheol from TB II 3-10 resulted in the sequences of TB I. The additional loss of Gln¹⁹ from some TB I peptides provided the sequences TB II 1 and TB II 2. Characteristic mass spectra of the b-series of TB I 3 and TB II 5 are shown in Figure 4.

Sequence analysis of TB III peptides

Application of LC-MS to the mixture of TB III peptides isolated by preparative TLC enabled the determination of 34 sequences of the 11-residue peptides, designated as TB III 1-18. Diagnostic ions determined are listed in Table 3. Many peptides could be resolved by HPLC but complete sequences could not be elucidated as result of the presence of isobaric amino acids Val/Iva and Leu/Ile and the amino alcohols Leuol/Ileol.

In TB III many sequences from peptides eluting at different retention time seem to be identical. For this group of peptides GC-MS analysis showed the presence of isobaric Val/Iva, Leu/Ile and Leuol/Ileol.

Analogously to the sequence analysis of TB I and II, some of the diagnostic ions provided by TB III such as $(M+Na)^+$, $(M+H)^+$, and the *a*-series in positive ionization mode and the *y*-series in

negative mode were analyzed by HPLC-ESI-MS or direct infusion with collision induced dissociation (CID) energy. Positive MS-MS of the $(M+Na)^+$ precursor ions generated the *a*-series of product ions. MS-MS of $(M-H)^-$ in negative ion mode also formed the *y*-series, designated as y_N (N refers to negative mode). The majority of the diagnostic ions were identified *via* HPLC-ESI-MSⁿ (n = 2-4) from the specific precursor ions $(M+Na)^+$ and the fragment ions a_9 as well as a_7 . As an example the mass spectrum with diagnostic fragment ions of the a_4 - a_{10} -series TB III 10a after HPLC-ESI-MS in the positive ion mode is shown in Figure 4.

The a_2 fragment ions, which should be generated from *N*-Ac-Aib occurring in all peptides, were not detected under the conditions of positive ESI-MS. Thus the *N*-terminal amino acids were determined from fragments resulting from the *y*-series of negative ions generated from direct infusion MS-MS of (M-H)⁻ in the negative ionization mode. The mass differences between y_{10N} and (M-H)⁻ (128 amu) represent the *N*-terminal fragment Ac-Aib.

Diagnostic product ions y_{10N} to y_{4N} were also analyzed *via* negative ionization MS-MS from (M-H)⁻ and MS³ of fragment ion y_{6N} (Table 3).

The *C*-terminal positions of Valol and Lxxol in TB III peptides were deduced from the mass difference of 103 and 117 amu between a_{10} and $(M+Na)^+$.

The sequences of 34 TB III peptides could be assigned with the exception that isomeric amino acids Val/Iva and Leu/IIe and isomeric amino alcohols Leuol/IIeol could not be distinguished. However, the presence of *C*-terminal Valol in many of these peptides could be established. Notably, *C*-terminal fragments of m/z 199 which could not be assigned in several TB III peptides in previous work proved to be *C*- terminal Pro-Valinol. Minor peptides terminated TB III A and TB III B could not be detected in the experiments described here (see Figure 6).

The sequences determined in previous work are shown here for comparison (Figure 6). Note that the original numbering and designation of peptides is used in this figure and that positions of isomeric amino acids Val/Iva and of Leu could be assigned in TB I and TB II peptides as a result of the isolation and sequencing methods used previously, but not in TB III peptides. As can be seen data are in excellent agreement but many more sequences could be determined in this work. Notably, several sequences of TB II might be identical to longibrachins A (Leclerc et al., 1998).

3. Discussion and Conclusions

The group of trichobrachins represents a microheterogeneous mixture of metabolic fungal peptides belonging to the group of peptaibiotics. These microheterogeneous mixtures are the results of non-ribosomal biosynthesis by peptide synthetases (Szekeres et al., 2005). Application of TLC makes possible to separate these groups according to chain-length and hydrophobicity. HPLC enables the almost complete separation of individual peptides of these groups. On-line HPLC and a set of ESI-experiments provides, together with enantioselective GC-MS of hydrolysates, the sequences of the peptides. Even structures of co-eluting peptides can be determined. Restrictions of the methodology are that positions but not the kinds of isomeric amino acids and amino alcohols occurring in an individual peptide can not be distinguished using ESI-MS as applied. Assignment of the positions would require isolation of sufficient amounts of homogeneous peptides to characterize the *C*-terminal amino alcohols or the alignment of the position and kind of isomeric amino acids using the elegant method of methanolysis/acylation of peptaibiotics followed by GC-MS characterization of the small peptides formed (Jaworski et al., 1999). Assignment of positions of isomeric amino acids has been performed in previous experiments for TB I and TB II peptides (see Figure 6).

Monitoring of the production and degradation of trichobrachins during fermentation revealed that endogenous enzymic degradation of the *C*-terminus of the 20-residue peptides representing TB II lead to the cleavage of the *C*-terminal Pheol thus providing the 19–residue peptides of TB I. Further cleavage of the Gln then provided the 18-residue peptides TB II 1 and 2 with free carboxy-termini.

Comparison of the peptide sequences reported here show that they are in excellent agreement with those determined previously (see Figure 6) (Brückner et al., 1990; 1993). In particular deletion of Pheol and formation of 19- and 18-residue peptides could be confirmed. From these data it is also obvious that further *C*-terminal degradation occurs in the course of the fermentation thus providing 15- residue peptides with C-terminal Val (Brückner et al., 1990, 1993). The sequences of TB I 1 and 2 and TB II 1, 3 and 4 shown in Figure 5 are new sequences. The formation of very microheterogeneous TB III peptides comprising *N*-acetylated 11-residue peptides with a *C*-terminal amino alcohol could also be confirmed and many more sequences determined. In particular, a *C*-terminal domain to which in previous work the mass 199 Da had been assigned could be established as Pro-Valol.

Microheterogeneous peptide mixture as described here might also be considered as natural peptaibol libraries (Jaworski and Brückner, 2001; Jung 1996).

It should be emphasized that the fermentation experiments performed previously and described here are divided by a time period of about 15 years and have been conducted under similar but somewhat different conditions. This concerns materials, location, instrumentation, and personal. The data proof, however, that the fungal production of peptaibiotics and their structural features are of very good reproducibility.

The data also fully confirm and corroborate the concept that we have terminated the 'peptaibiom' and 'peptaibiomics' and defined as the entirety of Aib-containing peptides (peptaibiotics) produced by a fungus under defined conditions and by applying analytical techniques representing state of the art (Krause et al., 2006; Degenkolb et al., 2006). The data also demonstrate that the time domain and the resulting dynamics of the formation of peptaibiotics have to be considered

4. Experimental Part

Chemicals. MeCN (Chromasolve for HPLC) and MeOH (99.8%, gradient grade, for HPLC) were purchased from Merck-VWR (D-Darmstadt); aqueous HCl (32%, w/v), aqueous ammonia (25%, w/v), CH₂Cl₂ and CHCl₃ were from Carl Roth (D-Karlsruhe), CF₃COOH (TFA), and trifluoroacetic acid (TFA) were from Fluka (D-Deisenhofen).

For enantioselective amino acid analysis an DL-amino acid standard of TB constituents was prepared (Pätzold and Brückner, 2005) and suitable amounts of -methylalanine (Aib, U, from Sigma), DL-isovaline (Iva, synthesized in our laboratory *via* the Strecker procedure), L-phenylalaninol (Pheol, from Sigma), L-isoleucinol (Ileol, from Sigma), L-leucinol (Leuol, from Fluka) and D- and L-valinol (Valol, from Fluka) were added.

Malt extract medium. Amounts of 30.0 g light malt extract (Serva) and 3.0 g soy peptone (Oxoid, D-Wesel) were dissolved in 1 l demineralized water of final pH 6.0-6.5 and sterilization at 121 °C for 20 min. For preparing malt extract agar 15.0 g agar (Fluka) was admixed to 1 L of the liquid medium.

Chromatography

TLC. Analytical and preparative plates pre-coated with silica gel 60 of 0.25 mm and 20 mm thickness, respectively (from Merck-VWR) were used. The mobile phase was CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O (72/25/3/2, v/v/v). For analytical TLC about 10 μ l of 1% solutions of peptides were spotted onto plates. Peptides were visualized by spraying with water and, after drying, with chlorine/TDM reagent.

HPLC. A HP 1100 instrument comprising a Model G1322A degasser, G1312A binary pump, G1313A auto sampler, G1316A column thermostat, G1314A UV/VIS detector, and software HP ChemStation for LC (Rev. A.04.02) was used (from Agilent, D-Waldbronn). Trichobrachins were analyzed on a Kromasil KR100 column, 150 mm x 4.6 mm i. d., 3.5 μ m particle size (EKA Chemicals, S-Bohus) using a binary gradient at 35 °C (Table 4) and a detector wavelength of 205 nm. Eluent A consists of MeCN/MeOH/water (32/32/36, *v*/*v*/*v*), and eluent B consists of MeCN/MeOH (1/1, *v*/*v*); to both eluents 0.1% TFA (*v*/*v*) was added.

GC-SIM-MS. For enantioselective amino acid analysis a GC-MS Model HP 6890 with mass selective detector Model HP 5972 (Agilent D-Waldbronn, Germany) was used together with a Chirasil-L-ValTM (*N*-propionyl-L-valine-*tert*.-butylamide polysiloxane) quartz capillary column, 25 m x 0.25 mm ID., film thickness 0.12µm (Varian-Chrompack, D-Darmstadt). EI mass spectra were recorded at ionization energy of 70 eV. In the total ion current (TIC) and selection ion monitoring (SIM) mode. Aliquots of 10-30 µg of the microheterogeneous mixture of peptides from crude trichobrachin, and groups of trichobrachin I, II and III isolated by preparative TLC, or 100-300 µg of peptides isolated from filtered cultures broths by chromatography on LiChroprep RP-8 were analyzed. Peptides were hydrolyzed with 6 M HCl at 100 °C for 16 h. The chirality of amino acids and amino alcohols was determined after conversion into *N*-trifluoroacetyl-amino acid-(1)-propyl esters by GC-SIM–MS (Kirschbaum et al., 2003; Pätzold and Brückner, 2005). Isovaline was analyzed as *N*-acetylisovaline-(1)-propyl ester since the enantiomers of these derivatives of DL-Iva are much better resolved on Chirasil-Val in comparison to the corresponding *N*-perfluoroacyl esters (Brückner et al., 1980).

ESI-MS/MS. A LCQTM ion trap instrument MS (Thermo Electron, D-Dreieich) was used. Trichobrachins were analyzed either by on-line HPLC-MS or *via* direct infusion. Nitrogen served as sheath and auxiliary gas and helium (purity > 99.9990%, Messer-Griesheim, D-Krefeld) as collision gas. Sequence analysis was carried out by positive and negative ionization. The *m/z* values were recorded in the centroid mode and have an accuracy of 0.5 *m/z*. Values in Tables 1-3 are rounded up or down, respectively. Conditions for direct infusion and the positive (negative) ionization mode were: spray voltage 4.00 kV (-4.00 kV), heated capillary temperature 230 °C (230 °C), capillary voltage +3.0 V (-3.0 V), tube lens offset +30.0 V (-30.0 V), sheath gas 50 (relative)units, auxiliary gas 5 units, maximum ion time 1000 ms. For on-line HPLC-MS the temperature of the heated capillary was set at 250 °C, sheath gas at 65 units, auxiliary gas to 20 units. For automatic mass calibration a mixture of caffeine (*m/z* 195.1), Met-Arg-Phe-Ala (*m/z* 524.3) and the perfluoronated 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.

Direct infusion ESI-MS in the positive ion-mode was performed *via* infusion of solutions (c = 0.1%, w/v) of trichobrachins in MeOH/1% HCOOH (1/1, v/v). Analysis in the negative-ion mode was performed *via* infusion of solutions (c = 0.1%, w/v) of trichobrachins in MeOH/1% aqueous ammonia (1/1, v/v). For sequence analysis of TB peptides the (M+H)⁺ and (M)⁻ molecular ions were chosen as precursor ions for MSⁿ.

The notation used for fragment assignments in the positive-ion mode, referring to *a*, *b* and *c* acylium ions, is in accordance to those used previously by us (Psurek et al., 2006; Degenkolb et al., 2003, Jaworski and Brückner, 2000) and is based on the suggestion of Roepstorff, Fohlman, and Biemann. The negative-ion mode produced the *y* series of fragment ions without protonation (Jaworski and Brückner, 2000) and is denoted y_N in Tables 1-3.

Culture and fermentation of T. parceramosum CBS 936.69

Submers fermentation was performed *Trichoderma parceramosum* CBS 936.69 was obtained as freeze-dried culture from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, The Netherlands. The lyophilisate was suspended in sterile water (1.5 ml) and, after soaking for 15 min, transferred under sterile conditions to Petri dishes (9.5 cm diameter) containing malt extract agar medium. After 8 days at room temperature under diffuse daylight intensive growth of the mold was observed. For a preliminary culture agar discs (1 cm diameter) were used for the inoculation of 3 Erlenmeyer flasks (2 l), each containing 400 ml of malt extract medium. The flasks were shaken at 80 rpm at room temperature for 4 days using a rotary shaker Model G 25 (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA).

These cultures were used for the inoculation of fermentation broths. Inoculation of 12 Erlenmeyer flasks (2 l), each containing 400 ml of malt extract medium was performed by adding 20 ml of the preliminary culture. The flasks were shaken at 80 rpm at room temperature for 4 days.

For daily monitoring of peptaibol production, aliquots (25 ml) of filtered culture broth were passed through a cartridge packed with LiChroprep RP-8 (Merck,) particle size 40 - 63 μ m, size 15 x 50 mm, and the peptides adsorbed were eluted with 15 ml MeOH. The eluates were evaporated to dryness and the residues were dissolved in MeOH to a final concentration of 1% (w/v). Aliquots of 20 μ l were investigated by TLC and peptaibols visualized by spraying with water and chlorine/TDM.

Fermentation experiments for monitoring of peptaibol production and degradation

For monitoring the production and degradation of trichobrachins during the fermentation a separate experiment using 400 ml culture broth in 1 liter shake flask was executed under the same conditions as the large-scale fermentation described above. For a period of 14 days, aliquots of 25 ml were drawn under sterile conditions every 24 hours from the culture broth. The culture broths were cleaned-up with LiChroprep RP-8 as described above and analyzed with TLC and GC-SIM-MS as described above.

Isolation of trichobrachins from the culture broth and purification of peptides.

After shaking for 4 days intensive peptide production in the fermentation broth was detected via TLC. Culture broths (4.8 l) were separated from the mycelia by filtration under reduced pressure. The mycelia were washed with distilled water and the combined filtrates were pumped at a flow rate of 2.5 l/h through a MPLC column (380 x 37 mm i. d.) filled with XAD-2 polystyrene adsorber resin (Supelco, USA-Belefonte) of 0.3-1.0 mm particle size. A MD 80/100 pump, controller PS 1 (Labomatic, D-Sinsheim) and a Model FRAC-100 fraction collector (Pharmacia, D-Freiburg) were used. The resin was washed at flow rates of 2.5 l/h with water (1 l), MeOH/water mixture (30/70, v/v) (500 ml). The peptides adsorbed were eluted with a linear gradient from 30% to 100% MeOH at a flow rate of 7.5 ml/min (900 ml) and 100% MeOH (500 ml). The first 100 ml of the eluate were discarded and fractions (15 ml) were collected. Elution of peptides was monitored by TLC and HPLC. Fractions containing peptides were combined and evaporated to dryness yielding 471 mg trichobrachins. The raw material was dissolved in 9.5 ml of MeOH and applied to a column (100 cm x 5 cm i.d.) filled with Sephadex LH-20 resin, particle size 25 - 100 µm (Pharmacia, Freiburg, Germany). Elution was performed with MeOH at a flow rate of 2.5 ml/min. Fractions (15 ml) were collected and elution of peptides was monitored by TLC. Fractions containing TB were combined and evaporated to dryness yielding 309 mg of a pale yellow peptide powder consisting a mixture of TB I, TB II and TB III.

Separation of TB I, II and III

Repetitive preparative TLC allowed the separation and isolation of still microheterogeneous peptide mixtures named TB I, II and III. For their isolation approximately 63 mg of the trichobrachin resulting from Sephadex-LH20 chromatography was dissolved in MeOH yielding a 5% methanolic solution (w/v). Portions of 200 μ l were subjected to six preparative TLC plates pre-coated with silica gel SIL G-200 (Macherey-Nagel). As mobile phase a mixture of TCM/MeOH/AcOH/H₂O (80/20/2/1, $\nu/\nu/\nu/\nu$) was used. Trichobrachins were monitored by spraying with water and zones containing TB I, TB II and TB III peptaibol groups were marked. Then the six plates were dried for 24 h and zones containing TB I, II and III were scraped out with a lancet. The peptides were eluted from the silica by treatment with MeOH, then the silica was removed by centrifugation. The precipitate was treated (3x) with 10 ml of a mixture of CH₂Cl₂/MeOH (1:1, ν/ν), the silica removed by centrifugation (1.600 x g), and the combined organic extracts evaporated to dryness using a rotatory evaporator. These procedures provided in trichobrachin groups TB I (5.7 mg), TB II (11.7 mg) and TB III (45.1 mg).

References

Berg A, Grigoriev PA, Degenkolb T, Neuhof T, Härtl A, Schlegel B, Gräfe U (2003) Isolation, structure elucidation and biological activities of Trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from Trichoderma sp. HKI 0276. J Peptide Sci 9: 810-816

Boheim G, Janko K, Leibfritz D, Ooka T, König WA, Jung G. (1976) Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part B. Pore formation in black lipid films. Biochim. Biophys. Acta 433: 182-199

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

Brückner H, Kripp T, Kieß M (1990) Sequencing of new Aib-peptides by tandem mass spectrometry and automated Edman degradation. In: Giralt E, Andreu D (eds.) Peptides 1990 Proceedings of the twenty-first European Peptide Symposium. ESCOM Science, Leiden, Netherland: 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 112 A, Mainz Verlag, Aachen, Germany, 357-373

Chugh JK, Brückner H, Wallace BA (2002) Model for a helical bundle channel based on the high-resolution crystal structure of Trichotoxin A50E. Biochem 41: 12934-12941

Degenkolb T, Berg A, Gams W, Schlegel B, Gräfe U (2003) The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. J Peptide Sci 9: 666-678

Degenkolb T, Gräfenhan T, Berg A, Nirenberg H. I., Gams W, Brückner H (2006) Peptaibiomics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species.Chem. Biodiv. 3: 593-610

Duclohier H, Alder GM, Bashford CL, Brückner H, Chugh JK, Wallace BA (2004) Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications for channel structure. Biophys J 87: 1705-1710

Fox RO, Richards FM (1982) A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-A resolution. Nature 300: 325-330

Gräfe U, Ihn W, Ritzau M, Schade W, Stengel 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

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

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

Jaworski A, Brückner H (2000) New Sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. J. Peptide Sci.; 6: 149-167

Jaworski A, Brückner H (2001) Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flavipes*. J. Peptide Sci. 7: 433-447.

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

Jung G (1996) Natural peptide libraries of microbial and mammalian origin. In *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* Jung G (ed.), Wiley-VCH: Weinheim, 1-18

Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H (2003) Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. J Peptide Sci 9: 799-809

Kleinkauf H, von Döhren H (1996) A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. Eur J Biochem 236: 335-351

Krause C, Kirschbaum J, Brückner H (2006) Peptaibiomics – an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. Amino Acids 30: 435-443

Kripp T (1990) Isolierung und Sequenzierung von Peptid-Antibiotika (Trichobrachine) aus *Trichoderma longibrachiatum*. Dissertation, University of Hohenheim, Germany

Kronen M, Kleinwächter P, Schlegel B, Härtl A Gräfe U (2001) Ampullosporins B, C, D, E_1 , E_2 , E_3 and E_4 from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053: structures and biological activities. J Antibiot 54: 175-178

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

Pätzold R, Brückner H (2005) Chiral Separations of Amino Acids by Gas Chromatography. In: Ed. I Molnar-Perl, Journal of Chromatography Library, vol 70, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 98-118

Psurek A, Neusüß C, Balaguer E, Imhof D, Degenkolb T, Brückner H, Scriba GKE (2006) Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis – mass spectrometry. J Peptide Sci 12: 279-290

Raap J, Erkelens K, Ogrel A, Skladnev DA, Brückner H (2005) Fungal biosynthesis of nonribosomal peptide antibiotics and α,α -dialkylated amino acid constituents. J Peptide Sci, 11: 331-338

Ritzau M, Heinze S, Dornberger K, 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

Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Mancziger L, Vagvölgyi Cs (2005) Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. Acta Microbiol Immunol Hung 52: 137-168

Whitmore L, Wallace BA (2004) Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. Eur Biophys J 33: 233-237

Figure legends

Figure 1

(a) Monitoring of the production and degradation (dynamics) of trichobrachins (TB) from *Trichoderma parceramosum* by TLC; numbers 0-10 refer to days of fermentation in malt extract medium, (b) TLC of crude trichobrachin (TB), trichobrachin I (TB I), trichobrachin II (TB II) and trichobrachin III (TB III) resulting from preparative TLC; peptides were visualized by spraying with water.

Figure 2

Chromatograms on Chirasil[®]-L-Val of (a) derivatized total hydrolysates of crude trichobrachin (*N*-trifluoroacetyl-amino acid-(1)-propyl esters and N(O)-trifluoro-acetyl amino alcohols), and (b) of a standard of *N*-acetyl-DL-isovaline-(2)-propyl ester (upper trace) and *N*-acetyl-D-isovaline-(2)-propyl ester determined in a hydrolysate of crude trichobrachin (lower trace); (a) GC-SIM-MS, (b) TIC mode.

Figure 3

HPLC elution profiles of trichobrachin groups TB I, TB II and TB III. Numbers assigned to peaks in chromatograms correspond to peptide sequences presented in Fig. 5. Peaks marked with an x represent non-peptidic artefacts resulting from preparative TLC. For chromatographic conditions see experimental.

Figure 4

Characteristic mass spectra (positive ion mode) resulting from HPLC-ESI-MS analysis of (a) trichobrachin I 3, (b) trichobrachin II 5, and (c) of fragment ions of $(M+Na)^+$ of trichobrachin III 10a.

Figure 5

Sequences of trichobrachin peptides of group TB I (nos. 1-8), of group TB II (nos. 1-10), and of group TB III (nos. 1-18); abbreviations of protein amino acids according to three-letter code; Ac = acetyl; Aib = -aminoisobutyric acid; Vxx = Val or Iva (isovaline), Lxx = Leu or Ile, Lxxol = leucinol or isoleucinol; Valol = valinol. Chiral amino acids are of the L-configuration with the exception of D-Iva. For HPLC elution profiles of TB I – III see Figure 3.

Figure 6

Sequences and designation of trichobrachin peptides determined in previous work (Kripp, 1990); Lxx = Leu or Ile; $[N^{143/144}]$ and $[N^{210/211}]$ stand for unknown *N*-termini of *m/z* 143 or 144 and 210 or 211; $[C^{199}]$ was established as *C*-terminal Pro-Valol of *m/z* 199 in this work (see text).





(b)



95



Figure 3


Figure 4









TBI		~	2	ო	4	5	9	7	8	ი	10	1	12	13	14	15	16	17	18	19
-	Ac	Aib	Ala	Ala	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	V _{XX}	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	Aib	GIn	GIn
2	Ac	Aib	Ala	Ala	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	dib	Gln	GIn
S	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	dib	Gln	GIn
4a	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	dib	Gln	GIn
4b	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	GIn	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	VxX	Aib	Aib	GIn	GIn
5	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	Vxx	Gln	GIn
9	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	Vxx	Gln	GIn
7	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	dib	Gln	GIn
8a	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Vxx	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Vxx	Aib	Vxx	Gln	Gln
8b	Ac	Aib	Ala	dib	Ala	Aib	Aib	GIn	Aib	٧xx	Aib	G	Leu	Aib	Pro	٧xx	Aib	VXX	Gln	GIn

Figure 5

TB II		-	2	3	4	5	9	7	8	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	VxX	Aib	GIY	LxX	Aib	Pro	Vxx	Aib	Aib	GIn		
7	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	V _{XX}	Aib	GIY	Lxx	Aib	Pro	Vxx	Aib	XXX	GIn		
e	Ac	Aib	Ala	Ala	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	VxX	Aib	GIV	LxX	Aib	Pro	XXX	Aib	Aib	Gln	GIn	Pheol
4	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	VxX	Aib	GIV	LxX	Aib	Pro	XXX	Aib	Ala	Gln	GIn	Pheol
5	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	VxX	Aib	GIV	LxX	Aib	Pro	XXX	Aib	Aib	GIn	GIn	Pheol
9	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	V _{XX}	Aib	GIY	Lxx	Aib	Pro	Vxx	Aib	Aib	GIn	GIn	Pheol
7	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	VxX	Aib	GIV	LxX	Aib	Pro	XXX	Aib	XXX	GIn	GIn	Pheol
œ	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	VxX	Aib	GIV	LxX	Aib	Pro	XXX	Aib	XXX	GIn	GIn	Pheol
6	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	V×X	Aib	Gly	Lxx	Aib	Pro	٧xx	Aib	XX/	Gln	GIn	Pheol
10	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	GIn	Aib	V _{XX}	Aib	Gly	Lxx	Aib	Pro	٨x×	Aib	V×X	GIn	GIn	Pheol

Figure 5, continued (1)

TB III		-	2	З	4	5	9	7	8	6	10	11	TB III		٢	2	3	4	5	9	7	8	6	10	11
1 a	Ac	Aib	Asn	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Vxx	Aib	Pro	Lxxol	9d	Ac	Aib	Gln	Тхх	Vxx	Aib	Pro	Гxx	ГХХ	Aib	Pro	Valol
1b	Ac	Aib	Asn	Vxx	ГХХ	Aib	Pro	Lxx	Vxx	Aib	Pro	Valol	9e	Ac	Aib	Asn	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Valol
2a	Ac	Aib	Asn	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Lxxol	10a	Ac	Aib	Gln	Vxx	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
2b	Ac	Aib	Asn	Vxx	ГХХ	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Valol	10b	Ac	Aib	Gln	Тхх	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Valol
3а	Ac	Aib	Asn	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Lxxol	11a	Ac	Aib	Gln	Тхх	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
3b	Ac	Aib	Asn	ГХХ	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Valol	11b	Ac	Aib	Gln	Тхх	ΓХХ	Aib	Pro	Гxx	ГХХ	Aib	Pro	Valol
4	Ac	Aib	Gln	Vxx	ГXX	Aib	Pro	Lxx	Vxx	Aib	Pro	Lxxol	12a	Ac	Aib	Gln	Vxx	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	ГХХ	Aib	Pro	Lxxol
5	Ac	Aib	Gln	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Lxxol	12b	Ac	Aib	Asn	Тхх	ТХХ	Aib	Pro	Гxx	ГХХ	Aib	Pro	Lxxol
9	Ac	Aib	Asn	ГХХ	ГХХ	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Valol	13	Ac	Aib	Asn	Тхх	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
7a	Ac	Aib	Asn	Vxx	ГХХ	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Lxxol	14	Ac	Aib	Asn	Тхх	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
7b	Ac	Aib	Asn	ГХХ	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Lxxol	15a	Ac	Aib	Asn	Тхх	ΓХХ	Aib	Pro	Гxx	ГХХ	Aib	Pro	Lxxol
8a	Ac	Aib	Asn	ГХХ	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Lxxol	15b	Ac	Aib	Gln	Vxx	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
8b	Ac	Aib	Asn	ГХХ	ГХХ	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Valol	15c	Ac	Aib	Asn	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
8c	Ac	Aib	Gln	ГХХ	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ТXX	Aib	Pro	Valol	16a	Ac	Aib	Gln	ХХЛ	ΤХХ	Aib	Pro	Lxx	Тхх	Aib	Pro	Lxxol
9a	Ac	Aib	Asn	ГXX	VXX	Aib	Pro	Lxx	ГXX	Aib	Pro	Lxxol	16b	Ac	Aib	Asn	VXX	Vxx	Aib	Pro	ГXX	ТXX	Aib	Pro	Lxxol
9b	Ac	Aib	Gln	Vxx	Vxx	Aib	Pro	Lxx	ГXX	Aib	Pro	Lxxol	17	Ac	Aib	Gln	ГХХ	ХХЛ	Aib	Pro	Lxx	ТХХ	Aib	Pro	Lxxol
9с	Ac	Aib	Asn	ГXX	ГXX	Aib	Pro	Lxx	ГXX	Aib	Pro	Valol	18	Ac	Aib	Gln	ГХХ	ТXX	Aib	Pro	Lxx	TXX	Aib	Pro	Lxxol

Figure 5, continued (2)

		~	2	ო	4	5	9	7	ω	ດ	10		12	13	14	15	16	17	18	19	20
Trichobrachin I																					
TBIA	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	val ,	Aib ,	<i>dib</i> (ЧD	Gln	
TBIB	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	val ,	Aib	lva (ЧIJ	GIn	
TBIC	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	dib	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	val ,	Aib ,	Aib (ЧIJ	GIn	
TBID	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	ren '	Aib	Pro	Val ,	Aib	lva (u U	GIn	
Trichobrachin II																					
TB IIa A	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val					
TB lla B	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	dib	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu ,	Aib	Pro	Val					
TB IIa C	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu ,	Aib	Pro	val ,	Aib	lva (ЧIJ		
TB IIa D	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	val ,	Aib	lva (ЧIJ		
TB IIb A	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu ,	Aib	Pro	val ,	Aib ,	<i>dib</i> (ЧIJ	GIn	Pheol
TB IIb B	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu ,	Aib	Pro	val ,	Aib	lva (ЦП	GIn	Pheol
TB IIb C	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	dib	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu ,	Aib	Pro	val ,	Aib ,	<i>dib</i> (Ш	GIn	Pheol
TB IIb D	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	dib	GIn	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	val ,	Aib	lva (ЧD	GIn	Pheol

Figure 6

TB III A a	[N ²¹¹]	Gly	Lxx	Aib	Gly	Val	Leu	IOI					
TB III A b	[N ¹⁴³]	Lxx	Pro	Lxx	Gly	Val	Leu	ol					
TB III B a	[N ²¹⁰]	Gly	Lxx	Aib	Gly	Lxx	Leu	ol					
TB III B b	[N ¹⁴⁴]	Lxx	Pro	Lxx	Gly	Lxx	Leu	ol					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
				-	U		Ū	Ū		U	Ũ	10	
TB III C a	ŀ	٩c	Aib	Gln	Aib	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III C b	ŀ	Ac	Aib	Gln	Val	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	[C ¹⁹⁹]	
TB III D a	ļ	٩c	Aib	Asn	Val	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III D b	ŀ	Ac	Aib	Asn	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	[C ¹⁹⁹]	
TB III E a	ļ	Ac	Aib	Gln	Val	l xx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TBIIIEb		Ac	Aib	Gln	l xx	Val	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III E c	ļ	Ac	Aib	Gln	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	[C ¹⁹⁹]	
TB III F a	ŀ	٩c	Aib	Asn	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III F b ₁	ŀ	٩c	Aib	Gln	Lxx	Val	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III F b ₂	ŀ	٩c	Aib	Gln	Val	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III F c	ŀ	Ac	Aib	Gln	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	[C ¹⁹⁹]	
TB III G a	ŀ	٩c	Aib	Asn	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leu	Leu	Aib	Pro	Leuol
TB III G b	ŀ	Ac	Aib	Asn	Lxx	Lxx	Aib	Pro	lle	Leu	Aib	Pro	Leuol
TB III H a	ŀ	Ac	Aib	Asn	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III H b	ŀ	Ac	Aib	Gln	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	[C ¹⁹⁹]	
TB III I	ŀ	Ac	Aib	Gln	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol
TB III J	ŀ	٩c	Aib	Gln	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Lxx	Lxx	Aib	Pro	Leuol

Figure 6, continued

			t	richob	achin I					
Diagnostic ions										
	1	2	3	4a	4b	5	6	7	8a	8b
$(M+H)^+$	1790	1790	1804	1804	1818	1818	1832	1818	1818	1832
(M + Na) ⁺	1812	1812	1826	1826	1840	1840	1854	1840	1840	1854
b ₃	270	270	284	284	284	284	284	284	284	284
b ₄	341	341	355	355	355	355	355	355	355	355
b ₅	426	426	440	440	440	440	440	440	440	440
b ₆	479	479	511	511	525	511	525	525	511	525
b ₇	625	625	639	639	653	639	653	653	639	653
b ₈	710	710	724	724	738	724	738	738	724	738
b ₉	809	809	823	823	837	823	837	837	823	837
b ₁₀	894	894	908	908	922	908	922	922	908	922
b ₁₁	951	951	965	965	979	965	979	979	965	979
b ₁₂	1064	1064	1078	1078	1092	1078	1092	1092	1078	1092
b ₁₃	1149	1149	1163	1163	1177	1163	1177	1177	1163	1177
У _{6Р}	641	641	641	641	641	655	655	641	655	655
(y _{6P} - H ₂ O)	623	623	623	623	623	637	637	623	637	637
y _{6P} – AA (19)	495	495	495	495	495	509	509	495	509	509
y _{6P} – AA (19 - 18)	367	367	367	367	367	381	381	367	381	381
y _{6P} – AA (19 - 17)	282	282	282	282	282	282	282	282	282	282
y _{6P} – AA (19 - 16)	197	197	197	197	197	197	197	197	197	197
M	1789	1789	1803	1803	1817	1817	1831	1817	1817	1831
y _{2N}	274	274	274	274	274	274	274	274	274	274
y _{3N}	359	359	359	359	359	373	373	359	373	373
y _{4N}	444	444	444	444	444	458	458	444	458	458
y _{5N}	543	543	543	543	543	557	557	543	557	557
Убл	640	640	640	640	640	654	654	640	654	654
y _{12N}	1164	1164	1164	1164	1164	1178	1178	1164	1178	1178
y _{13N}	1292	1292	1292	1292	1292	1306	1306	1292	1306	1306
y _{14N}	1363	1363	1363	1363	1377	1377	1391	1377	1377	1391
У _{15N}	1448	1448	1448	1448	1462	1462	1476	1462	1462	1476
Y 16N	1519	1519	1519	1519	1533	1533	1547	1533	1533	1547
y _{17N}	1580	1580	1604	1604	1618	1618	1632	1618	1618	1632
y _{18N}	1661	1661	1675	1675	1689	1689	1703	1689	1689	1703

Table 1Diagnostic ions (m/z) of trichobrachin I peptides

			tı	richobr	achin II					
Diagnostic ions										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$(M+H)^{+}$	1676	1690	1923	1923	1937	1937	1951	1951	1951	1965
(M + Na) ⁺	1698	1712	1945	1945	1959	1959	1973	1973	1973	1987
b ₂	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199
b ₃	284	284	270	284	284	284	284	284	284	284
b ₄	355	355	341	355	355	355	355	355	355	355
b ₅	440	440	426	440	440	440	440	440	440	440
b ₆	511	511	497	511	511	511	511	511	511	525
b ₇	639	639	625	639	639	639	639	639	639	653
b ₈	724	724	710	724	724	724	724	724	724	738
b ₉	823	823	809	823	823	823	823	823	823	837
b ₁₀	908	908	894	908	908	908	908	908	908	922
b ₁₁	965	965	951	965	965	965	965	965	965	979
b ₁₂	1078	1078	1064	1078	1078	1078	1078	1078	1078	1092
b ₁₃	1163	1163	1149	1163	1163	1163	1163	1163	1163	1177
y _{5P}	513	527								
$(y_{5P} - H_2O)$	495	509								
$Y_{5P} - AA (18)$	367	381								
$Y_{5P} - AA (18 - 17)$	282	282								
Y _{5P} – AA (18 – 16)	197	197								
			774	760	774	774	700	700	700	700
у _{7Р}			776	760	774	774	700	700	700	660
$(y_{7P} - \Pi_2 O)$		-	600	600	600	622	627	627	627	627
$y_{7P} = AA(20)$			023 /05	481	1023	1025	509	509	509	509
$y_{7P} = AA(20 - 13)$			367	353	367	367	381	381	381	381
$y_{7P} = AA (20 - 10)$ $y_{7D} = AA (20 - 17)$			282	282	282	282	282	282	282	282
$y_{7P} = AA(20 - 16)$			197	197	197	197	197	197	197	197
<i>y</i> /p ///(20 10)			107	107	107	107	107	101	107	107
M	1675	1689	1922	1922	1936	1936	1950	1950	1950	1964
V _{2N}	231	245	279	279	279	279	279	279	279	279
V _{3N}	316	330	407	407	407	407	407	407	407	407
y _{4N}	415	429	492	478	492	492	506	506	506	506
y _{5N}	512	526	577	563	577	577	591	591	591	591
y _{6N}			676	662	676	676	690	690	690	690
У _{7N}			773	759	773	773	787	787	787	787
y _{10N}	951	965	1028	1014	1028	1028	1042	1042	1042	1042
y _{11N}	1036	1050	1113	1099	1113	1113	1127	1127	1127	1127
y _{12N}	1164	1178	1212	1198	1212	1212	1226	1226	1226	1226
У _{13N}	1235	1249	1297	1283	1297	1297	1311	1311	1311	1311
y _{14N}	1320	1334	1425	1411	1425	1425	1439	1439	1439	1439
y _{15N}	1391	1405	1496	1482	1496	1496	1510	1510	1510	1524
y _{16N}	1476	1499	1581	1567	1581	1581	1565	1565	1565	1609
y _{17N}	1547	1561	1652	1638	1652	1652	1666	1666	1666	1680
y _{18N}	1632	1646	1723	1723	1737	1737	1751	1751	1751	1765
y _{19N}			1794	1794	1808	1808	1822	1822	1822	1836

Table 2Diagnostic ions (*m/z*) of trichobrachin II peptides

I peptides
=
of trichobrachin
N
<i>(m/</i>
Diagnostic ions
Table 3

	6a 16b 17 18	190 1148 1190 1190	212 1170 1212 1212	251 n.d. 251 251	364 336 364 364	177 435 477 477	562 520 562 562	359 617 659 659	72 730 772 772	385 843 885 885)70 928 970 970	067 1025 1067 1067	188 1146 1188 1188	213 213 213 213	298 298 298 298	11 411 411 411 411	524 524 524 524	321 621 621 621	n.d. n.d. n.d.	319 805 819 819)32 904 932 932	060 1018 1060 1060
	b 15c	76 1148	38 1170	1 n.d.	0 336	3 435	8 520	5 617	8 730	1 843	6 928	53 1025	74 1146	d. 213	d. 298	1 411	4 524	1 621	6 n.d.	9 805	8 904	46 1018
	15a 15	1176 117	1198 119	n.d. 25	350 35	463 46	548 54	645 64	758 75	871 87	956 95	1053 105	1174 117	213 n.c	n.d. n.d	411 41	524 52	621 62	706 70	819 81	932 91	1046 102
	3 14	 76 1176	98 1198	37 n.d.	50 350	63 463	48 548	45 645	58 758	71 871	56 956	53 1053	 74 1174	 13 213	.d. n.d.	11 411	24 524	21 621	06 706	19 819	32 932	1046
	12b 1	1176 11	1198 11	237 2	350 3	463 4	548 5	645 6	758 7	871 8	956 9	1053 10	1174 11	213 2	n.d. n	411 4	524 5	621 6	706 7	819 8	932 9	1046 10
	o 12a	 6 1176	8 1198	1 251	1 350	7 463	2 548	9 645	2 758	5 871	956	7 1053	4 1174	9 n.d.	4 n.d.	7 411	524	621	2 706	5 819	3 918	6 1046
	1a 11	176 117	198 119	n.d. 25	364 36	t63 47	548 56:	345 659	77:	371 88!	976	053 106	174 117	.d. 19:	n.d. 28.	111 39	524 510	321 60	206 69	305 80	918 918	046 104
	10b	1176 1	1198 1	251	364 ;	477	562 (659 (772	885 8	970 (1067 1	1174 1	199	284	397	510 (607 (692	805 {	918	1046 1
	; 10a	4 1176	6 1198	7 251	350	5 463	3 548	7 645	J 758	3 871	3 956	5 1053	1174	 . n.d.	4 n.d.	7 411	524	7 621	2 706	1 819	0 918	4 1046
	d 9e	 62 113	84 115	d. 237	64 33(63 435	48 52(45 617	58 73(71 84:	56 928	102	 60 113	 d. n.d	84 284	97 397	10 51(07 601	.d. 69	91 79	04 89(100
	5 36	1162 11	1184 11	237 n.	350 3	463 4	548 5	645 6	758 7	871 8	956 9	1053 10	1160 11	n.d.	284 2	397 3	510 5	607 6	n.d. n.	805 73	918 9	1032 1C
	q6	1162	1184	n.d.	350	449	534	631	744	857	942	1039	1160	n.d.	298	411	524	621	706	805	904	1032
	: 9a	32 1162	34 1184	1 n.d.	4 350	3 449	8 534	5 631	8 744	1 857	6 942	53 1039	30 1160	 l. n.d.	4 298	7 411	0 524	7 621	i. 706	1 805	4 918	32 1032
	8b 8	162 116	184 118	237 25	350 36	163 46	548 54	345 64	758 75	371 87	956 95	053 10	160 116	.d. n.d	n.d. 28	397 39	510 51	307 60	n.d. n.o	305 79	918 90	032 10:
	8a	1162 1	1184 1	n.d. 2	350 3	449 4	534 5	631 6	744 7	857 8	942 9	1039 1	1160 1	n.d. r	298 r	411 3	524	621 6	706 r	805 8	918 9	1032
	7b	 2 1162	1184	n.d.	350	449	534	631	744	857	942	1039	1160	n.d.	298	411	524	621	706	805	918	2 1032
	5 7a	 52 1162	94 1184	d. n.d.	336	3 449	8 534	5 631	8 744	1 857	6 942	53 1035	 50 1160	 d. n.d.	d. n.d.	11 411	0 524	17 621	d. 706	5 819	8 918	32 1032
	5 6	 162 116	184 118	.d. n.c	350 35	149 46	534 54	331 64	75	357 87	95	039 10	 160 116).d. n.(:98 n.(111 39	524 51	321 60	206 n.c	305 80	91	032 10:
	4	1162 1	1184 1	251 r.	350 3	463 4	548 5	645 6	758 7	857 8	942 6	1039 1	1160 1	n.d. r	n.d.	397 4	510 5	607 £	692 7	805 8	904 5	1032
	3b	1148	1170	237	350	449	534	631	744	857	942	1039	1146	199	n.d.	397	510	607	692	791	904	1018
) 3a	 8 1148	0 1170	7 n.d.	3 336	9 435	4 520	1 617	4 730	7 843	2 928	9 1025	 6 1146	 . 213	. 298	7 411	524	7 621	. n.d.	5 805	4 904	8 1018
	a 2b	 48 114	70 117	d. 237	36 336	35 446	20 534	17 631	30 744	43 857	28 942	25 103	 46 114	 13 n.d	98 n.d	11 397	24 510	21 607	d. n.d	35 80£	904	18 101
	1b 2	4 1134 11	3 1156 11	n.d. n.	336 35	449 45	534 52	631 6:	744 75	843 84	928 92	1 1025 10	2 1132 11	n.d. 2	n.d. 2(383 41	496 52	. 593 62	678 n.	791 8(890 90	4 1004 10
diagnostic ions	1a	(M+H) ⁺ 1134	(M + Na) ⁺ 1156	a ₂ n.d.	a ₃ 336	a ₄ 435	a ₅ 520	a ₆ 617	a ₇ 730	a ₈ 829	a ₉ 914	a ₁₀ 1011	(M-H) ⁻ 1132	/ _{2N} n.d.	/an n.d.	γ₄N n.d.	y _{5N} 510	y _{6N} 607	/ _{7N} 692	/ _{8N} 791	/ _{9N} 890	/10N 1004

Anhang III - Originalpublikationen und Entwurf

107

n.d. = not detected

Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	0	45	0	100
25	100	0	50	0	100
30	70	30	51	100	0
35	50	50	56	100	0

Table 4 Gradient program for analytical HPLC separation.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans Brückner

gebührt mein herzlicher Dank für die interessante Themenstellung und die engagierte Förderung der vorliegenden Arbeit. Besonders danke ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und die Vermittlung seines Wissen, von dem ich profitieren konnte.

Bei Herrn AkOR PD Dr. G. Benckiser bedanke ich mich für die Zweitkorrektur.

Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit und Unterstützung, einen Teil der mikrobiologischen Arbeiten am Institut für Angewandte Mikrobiologie durchführen zu können.

Herrn Dr. Jochen Kirschbaum gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Untersuchungen am ESI-MS und der Interpretation der Massenspektren sowie die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Nina Lodahl, Susanne Skrbek und Sabine Kempff danke ich für die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten durchgeführten Arbeiten.

Meinen Kollegen und Kolleginnen im Arbeitskreis, insbesondere Herrn Dr. Ralf Pätzold und Ruth Schüttler danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. G. Jung, Universität Tübingen, danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Aufklärung von Suzukacillin A.

Bei Herrn Prof. Dr. M Leplawy, Technische Universität Lódz, Polen, bedanke ich mich für Überlassung der synthetischen Alamethicine.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und auch Großeltern, die durch ihre unentwegte Hilfe und Unterstützung meiner Ausbildung diese Arbeit erst ermöglicht haben, sowie meinem Partner Jens Heiderich für seine moralische Unterstützung!

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen gefördert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Corina Krause Schönbacher Str. 7 35745 Herborn geb. am 06. September 1976 in Jena ledig Staatsangehörigkeit deutsch

Schulausbildung

1983 - 1991	Friedrich Wolf Schule (Polytechnische Oberschule) in Jena
1991 – 1995	Ernst Abbe Gymnasium in Jena
	Abitur: 21.06.1995

Hochschulausbildung

10/1995 - 09/2001	Studium der Oecotrophologie an der Justus-Liebig-Universität
	in Gießen
24.09.2001	Studienabschluss: Diplom Oecotrophologin
04/2002 - 07/2006	Dissertation am Institut für Ernährungswissenschaft, Professur
	für Lebensmittelwissenschaften am IFZ (Interdisziplinäres
	Forschungszentrum) der Justus-Liebig-Universität Gießen,
	betreut durch Prof. Dr. Hans Brückner