

Több diszulfidhíd kötést tartalmazó peptidek szintézise

VÁRADI Györgyi,^a RÁKOSI Kinga,^a KELE Zoltán,^a BATTÁ Gyula^b és TÓTH K. Gábor^{a*}

^aSzegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet, Dóm tér 8., 6720 Szeged, Magyarország

^bDebreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Szerves Kémiai Tanszék, Egyetem tér 1., 4010 Debrecen, Magyarország

1. Bevezetés

A cisztein az egyik legérdekesebb fehérjealkotó aminosav. Szulfhidril csoportja számos egyedi tulajdonsággal ruházta fel, így fontos szerepet játszik fémionok komplexálásában, biológiai redox rendszerek (pl. glutation), acil donor vegyületek (koenzim A) képzésében. A fentiek mellett a cisztein-cisztin rendszer a fehérje-konformáció stabilizálásában fontos szerepet játszó diszulfidhidak miatt is alapvető jelentőségű.

V. du Vigneaud 1955-ben Nobel díjjal jutalmazott munkássága is diszulfidhidas peptidek szintézise volt, amelyek azonban csak egyetlen diszulfidhidat tartalmaztak.¹ Még ez az egy is kétféleképpen alakulhat ki, intra- és intermolekuláris módon.

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben számos előrelépés történt a peptidkémiaiban, a szabad tiolfunkciók kontrollált módon a megfelelő diszulfidhiddá történő alakítása továbbra is kihívás maradt.^{2,3} Ennek fő oka a többszörös regioszelektív diszulfidképzés nehézsége. Napjainkban már számos olyan fontos biológiailag aktív peptid ismert, amelyek több diszulfidhidat tartalmaznak (peptid toxinok, endotelinek, inzulinok, defenzinek, miniproteinek). E peptideknél nemcsak a regioszelektív szintézis, hanem a szerkezetigazolás is kihívásnak tekinthető. Célunk volt új szintézisek kidolgozása, több diszulfidhidat tartalmazó peptidek (farmakológiailag fontos peptid toxinok) racionális előállítás, és a kapott diszulfidhidak helyzetének igazolása.

2. Eredmények

A többszörös diszulfidhidat tartalmazó peptidek népes családjából kétféle vegyülettel foglalkoztunk: peptid toxinokkal és antifungális miniproteinekkal. Az előbbi képviselői például a skorpió toxinok, míg az utóbbiak közé tartoznak a gombák által termelt defenzinszerű kis fehérjék.

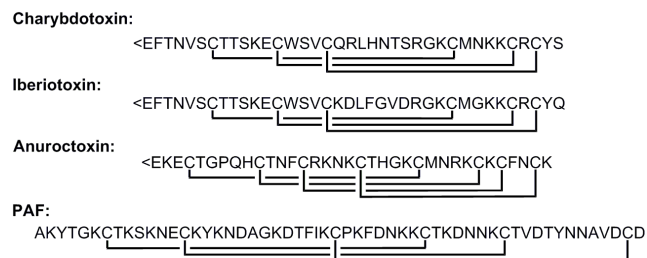
E peptidek szintézisére két fő megközelítés adódik:^{4,5,6}

1. Azonos védőcsoportok használata a szulfhidril csoportok védelmére, majd ezek után alkalmas körülmények keresése a természetesnek megfelelő diszulfidhíd mintázat elérésére.
2. Ortogonális védőcsoportok alkalmazása a cisztein oldalláncok védelmére, és a diszulfidhidak egymás utáni kiépítése.

2.1. A charybdotoxin és iberiotoxin racionális előállítása

A két skorpió toxin, amelynek szintézisével megpróbálkoztunk, a 37 aminosavból álló, 3 diszulfidhidat tartalmazó charybdotoxin és a vele 68%-os homológiát mutató iberiotoxin. Szekvenciáik az 1. ábrán láthatók. Mindkét polipeptid a Ca²⁺ aktivált K⁺ csatornát blokkolja, amely ioncsatorna fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában.

Biológiai vizsgálatok céljára kívántuk szintetizálni a két polipeptidet – ezt részben igen magas áruk, részben pedig az indokolta, hogy a 90-es évek elején az iberiotoxin kémiai szintézise még nem volt ismert az irodalomban, és a charybdotoxin szintézisééről is viszonylag kevés adat állt rendelkezésre.



1. Ábra. A szintetizált peptidek szekvenciái (<E = Glp).

Mivel ortogonális védőcsoportok alkalmazása esetén komoly nehézségekbe ütközött a részlegesen védett, diszulfidhidat tartalmazó köztitermékek izolálása és szerkezetbizonyítása, valamint e módszer lényegesen drágább, ezt a megközelítést elvetettük.

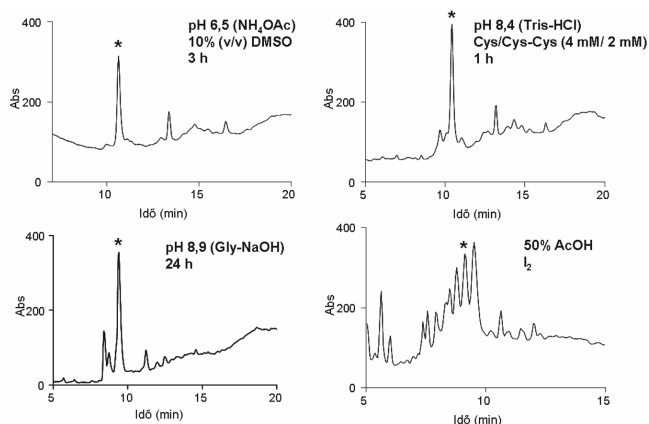
Az első módszer szerint, amelyet sikerrel alkalmaztunk, a peptideket Boc-Gln-PAM, ill Boc-Ser(Bzl)-PAM polimeren építettük fel. A folyékony hidrogén-fluoridos védőcsoport eltávolítás után kapott nyers hexaszulfhidril peptideket 2M karbamid tartalmú, pH=8,7 glicin-NaCl pufferben szolubilizáltuk, majd levegő bekeverésével oxidáltuk. A reakcióelegyet szűrés után közvetlenül RP-HPLC oszlopra vittük fel. A tiszta peptidek szerkezetbizonyítását részben tömegspektrometriával, részben természetes standarddal való koelúcióval végeztük.⁷

2.2. Az anuroctoxin szintézise

Az anuroctoxint az *Anuroctonus phaiodactylus* nevű mexikói skorpió termeli. A peptid szekvenciáját az 1. ábra mutatja. A 35 aminosavból álló, 8 cisztein tartalmú polipeptidet Boc-Lys(2ClZ)-PAM polimeren szintetizáltuk,

* Tel.: 62/545-726; fax: 62/545-139; e-mail: toth.gabor@med.u-szeged.hu

standard Boc-kémiával. A ciszteinek szulfhidril csoportjait azonos védőcsoporttal, 4-metil-benzilrel (Meb) láttuk el. A lineáris peptid hasítása a hordozóról folyékony hidrogén-fluoriddal történt. A ciklizálásra több különböző módszert próbáltunk ki, az eredmény a 2. ábrán látható.



2. Ábra. Az anurotoxin oxidálása különböző körülmények között. (A * -gal jelölt csúcs felel meg a természetes diszulfidhíd mintázatú toxinnak.)

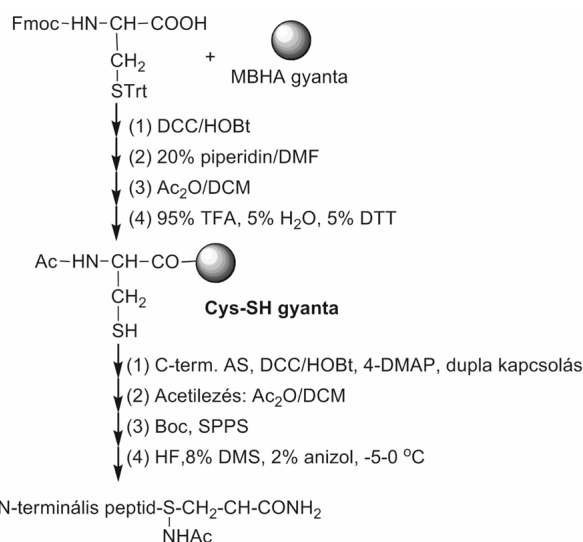
Megállapítható, hogy megfelelő körülmények kiválasztásával túlnyomó részben a természetes diszulfid-mintázat jön létre. Ezt részben tömegspektrometriával, részben biológiai mérésekkel igazoltuk. Savas körülmények között, jóddal oxidálva azonban jelentős mennyiségben képződött két, nem természetes diszulfid-mintázatot hordozó izomer is.⁸

2.3. A PAF antifungális miniprotein előállítása

A PAF (Penicillium antifungal protein) a defenzinszerű antifungális peptidok csoportjába tartozó, a *Penicillium chrysogenum* (*P. notatum*) fonalas gomba által termelt miniprotein.^{9,10} A PAF az egyik legtöbbet tanulmányozott gombaellenes peptid, ami azzal magyarázható, hogy emlősökre bizonyítottan veszélytelen.¹¹ 55 aminosavból áll és szerkezetét 3 diszulfidhíd stabilizálja (1. ábra).¹⁰ Vizsgálataink megkezdése előtt – NMR alapján – két lehetséges diszulfidhíd mintázat volt feltételezhető: *abcabc* és *abbacc*.

Előállítását szilárd-fázisú peptidszintézissel végeztük. Méreténél fogva kérdéses volt a lépésenkénti kondenzáció alkalmazhatósága. Fmoc kémiával nem is sikerült a szintézis, Boc kémiával pedig csak kb. 1%-os termelést sikerült elérni. A ciszteinek jelenléte miatt ezért a peptid két darabból történő szintézise, majd ezek natív kémiai ligációval (NCL) való összekapcsolása mellett döntöttünk.^{12,13,14} A natív kémiai ligáció kulcsvegyülete az N-terminális peptid tioésztere. Ez ellen indít támadást a folyamat első lépésében a C-terminális peptid N-terminálisán lévő cisztein szulfhidril csoportja. Az így létrejött tioészter köztitermék azután intramolekuláris S→N acilvándorlással átrendeződik és kialakul a két peptid között a természetes savamid kötés. A tioészter szintézisét egy általunk kidolgozott polimeren, a Cys-SH gyantán végeztük.¹⁵

Ennek előállítása úgy történik, hogy Fmoc-Cys(Trt)-OH-t kapcsolunk metil-benzhidril-amino (MBHA) polimerre, majd az Fmoc csoportot acetyl-csoportra cseréljük. Ezt követően lehasítjuk a tritil-csoportot. A szabaddá váló



3. Ábra. A Cys-SH polimer szintézise. (A rövidítések feloldása a szövegben található.)

szulfhidril-csoportot ezután acilezzük az N-terminális peptid C-terminális aminosavával úgy, ahogy karboxil-végű peptidok szintézisére alkalmas polimerek hidroxil-csoportjaihoz kapcsoljuk az első aminosavat. A továbbiakban a peptid szintézise a szokásos módon történik. A Cys-SH polimer előállítását a 3. ábra mutatja: Trt (tritil), diciklohexil-karbodiimid (DCC), trifluor-ecetsav (TFA), 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt), 4-dimetilaminopiridin (4-DMAP), szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS). A munkánkhoz szükséges tioésztereket minden esetben ezen a hordozón állítottuk elő. A tisztított peptidok natív kémiai ligációval történő összekapcsolása 3% tiofenol jelenlétében, közel semleges pH-jú pufferben jó termeléssel szolgáltatva a terméket. A natív diszulfidhíd mintázat kiépítését két különböző módon kíséreltük meg: a cisztein SH csoportok ortogonális és azonos védelmével.

Ortogonális stratégiánál a cisztein oldallánc védelmére legerjedtebb Meb mellett acetamido-metil (Acm) és fluorenil-metil (Fm) csoportokat választottunk (4. ábra). A Meb lehasad a peptidnek a hordozóról történő hidrogén-fluoridos hasításával egyidejűleg. Az Acm jóddal, vagy átmenetifém sókkal (pl. Ag(I)- és Tl(III)-sók) hasítható, előbbi esetben össze is záródik a diszulfidhíd, míg az utóbbiban nem. Az Fm csoportot bázissal, például piperidinnel, lehet eltávolítani. A ligációt követően 7,5-es pH-jú pufferben, oxigén bekeverésével összezártuk az első diszulfidhidat. Az Acm és Fm csoportok eltávolítását és az diszulfidhidak zárását mindkét lehetséges sorrendben megkíséreltük, de egyik esetben sem sikerült a természetesnek megfelelő mintázat kiépítése. A közti termékek enzim hasítása és a fragmensek tömegspektrometriás vizsgálata bizonyította, hogy a bázis felbontotta a már meglévő diszulfid hidakat. Így a PAF esetében nem használható bázissal hasítható védőcsoport.

Ezt figyelembe véve terveztük meg a védőcsoport kombinációt az újabb szintézisnél: az Fm helyett fenil-acetamido-metil csoportot (Phacm) használtunk (4. ábra).¹⁶ A Phacm azon reagenseken kívül, melyek az Acm-et hasítják, penicillin G aciláz (PGA) enzimmel is

N-terminális peptid

$$\text{AKYTGKCTKSKNECKYKNDAGKDTFIK-S-CH}_2\text{-CH-CONH}_2$$

Acm	Fm	
Acm	Phacm	NHAc
Meb	Meb	

C-terminális peptid

$$\text{CPKFDNKKCTKDNNKCTVDTYNNAVDCD}$$

Meb	Acm	Fm	Meb
Meb	Acm	Phacm	Meb
Meb	Meb	Meb	Meb

4. **Ábra.** A PAF natív kémiai ligációval történő előállításához használt peptidok és az egyes szintéziseknél alkalmazott védőcsoportok.

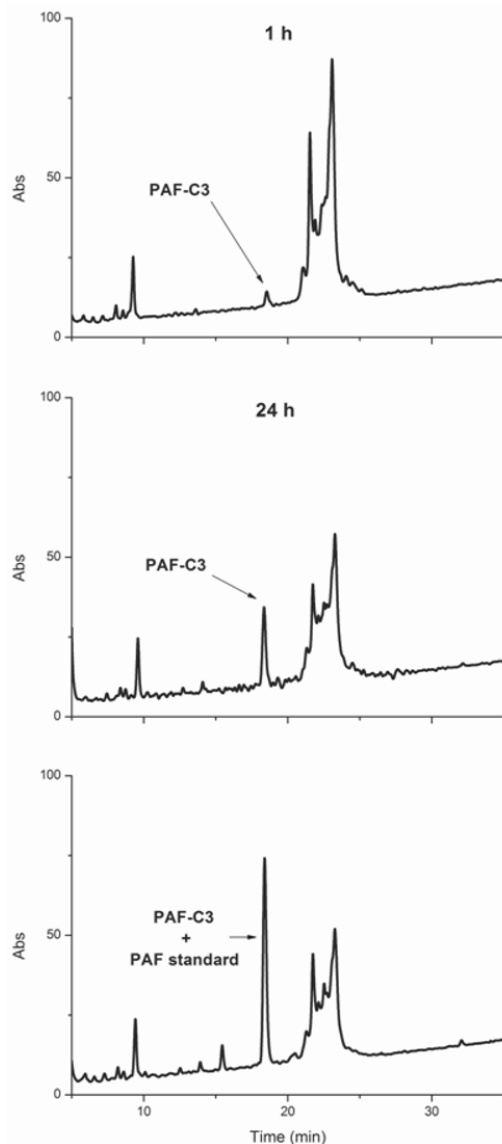
eltávolítható.¹⁷ A PGA-t penicillin származékok szintézisére használják, immobilizált, tehát hordozóhoz kötött formában. A nagy méretű és erősen kationos jellemű PAF esetén azonban nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Néhány órás reakcióidő alatt a peptid „elfogyott” a reakcióelegyből, feltehetően a hordozóhoz történt aspecifikus kötődés következtében.

Az ortogonális stratégia sikertelensége miatt próbálkoztunk meg a cisztein oldalláncok azonos védelmével, a már említett Meb védőcsoport használatával. Ebben az esetben a ligációt követően 6 szabad SH csoport található a peptidben. Az előző fejezetekben tárgyalt toxinok példájából kiindulva azt vártuk, hogy az oxidatív folding a természetes diszulfidhid mintázathoz vezet. De az első próbálkozások nem ezt mutatták. Megkíséreltük az oxidációt jóddal, savas közegben, kaotróp reagens használatával és anélkül, O₂ bekeverésével különböző pH-jú pufferekben (pH 7,5-10,5), CLEAR-OX gyantával, amelyet diszulfidhidak megfelelő kiépítésére fejlesztettek ki. De az említett módszerek egyikének használatával sem sikerült a természetes diszulfidhid mintázat kiépítése. Egyetlen módszer bizonyult csak alkalmazhatónak: az ún. kis molekulák által közvetített oxidatív folding.¹⁷ Ezt olyankor használják, ha a natív diszulfidhid mintázat kialakulása kinetikailag nem a legkedvezményezettebb. Ilyen esetekben – az oxidálószer mellett - szükség van egy redukálószerként funkcionáló kis molekulára (pl. cisztein, redukált glutation, cisztamin, 2-hidroxi-tiantiol, ditiotreitól) is. Legjobb termelést akkor értünk el, ha kis mennyiségű cisztein jelenlétében, oxigén bekeverésével alakítottuk ki az –S-S- hidakat. A sikeres oxidatív foldingot az 5. ábra mutatja.

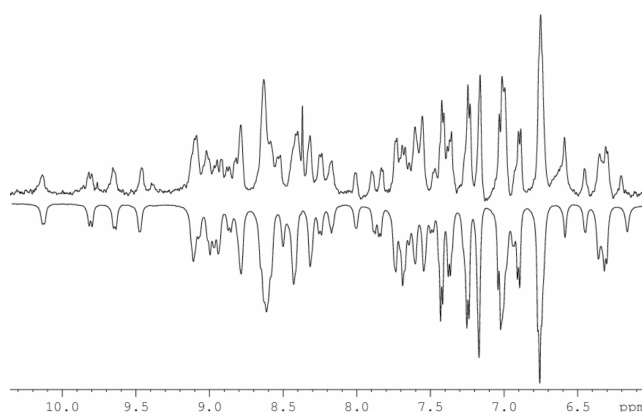
Kevésbé volt hatékony a glutation oxidált és redukált formáját tartalmazó rendszer. A termék enzimes emésztése és a fragmensek tömegspektrometriás vizsgálata, valamint NMR (6. ábra) és mikrobiológiai vizsgálatok is azt mutatták, hogy a szintetikus peptid minden tekintetben azonos a natívval. Tömegspektrometriás vizsgálatokkal sikerült bizonyítani a PAF *abcabc* diszulfidhid mintázatát is.

3. Összefoglalás

A több diszulfidhidat tartalmazó polipeptidok szintézise még napjainkban sem számít rutin feladatnak. Ha azonos védőcsoportokat használunk a ciszteinek szulfhidril-csoportjainak védelmére, akkor az oxidatív folding a



5. **Ábra.** A PAF oxidatív foldingja a levegő oxigénjével, kis mennyiségű cisztein jelenlétében. (A PAF-C3 a szintetikus miniprotein.)



6. **Ábra.** A szintetikus (fent) és natív (lent) PAF ¹H-NMR spektruma.

kérdéses. Minden egyes peptidre meg kell találni azokat a körülményeket, amelyek között a természetes diszulfidhid mintázat alakul ki. Ha ortogonális stratégiával próbálkozunk, akkor két probléma okoz nehézséget. Az egyik a

rendelkezésre álló szulfhidril védőcsoportok viszonylag szűk köre, amely Boc kémiát és natív kémiai ligációt alkalmazva különösen igaz. A másik pedig az a tény, hogy egyes védőcsoport eltávolítási módszerek felbontják az előzetesen kialakított diszulfid hidakat. Ez utóbbi esetben elveszítjük az ortogonális stratégia előnyét: a diszulfidhidak irányított kialakításának lehetőségét. Az általunk vizsgált esetekben, néhány toxin (charybdotoxin, iberiotoxin és anuroctoxin), valamint a PAF antifungális peptid szintézise során a cisztein oldalláncok azonos védőcsoporttal való ellátása vezetett jobb eredményre.

Köszönetnyilvánítás

A munka az Európai Unió és Magyarország támogatásával, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047 keretei között valósult meg.

Hivatkozások

1. Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J. M., Roberts, C. W., Katsyannis, P. G., Gordon, S. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *19*, 4879–4880.
2. Steiner, A. M., Bulaj, G. *Journal of Peptide Science* **2011**, *17*, 1–7.
3. Góngora-Benítez, M., Mendive-Tapia, L., Ramos-Tomillero, I., Breman, A. C., Tulla-Puche, J., Albericio, F. *Organic Letters* **2012**, *14*, 5472–5475.

4. Liu, H., Boudreau, M. A., Zheng, J., Whittal, R. M., Austin, P., Roskelley, C. D., Roberge, M., Andersen, R. J., Vederas, J. C. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1486–1487.
5. Camarero, J. A., Giralt, E., Andreu, D. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1137–1140.
6. Cuthbertson, A., Indrevoll, B. *Organic Letters* **2003**, *5*, 2955–2957.
7. Tóth, G. K., Pataricza, J., Janáky, T., Mák, M., Zarándi, M., Papp, J. G., Penke, B. *Peptides* **1995**, *16*, 1167–1172.
8. Varga, Z., Panyi, G., Tóth, G. K., Rákosi, K. WO Patent WO2013061106A1 **2013**, *PCT Int. Appl.* 27pp. Patent 2013 CODEN:PIXXD2
9. Marx, F., Haas, H., Reindl, M., Stoffler, G., Lottspeich, F., Redl, B. *Gene* **1995**, *167*, 167–171.
10. Batta, G., Barna, T., Gáspári, Z., Sándor, S., Kövér, K. E., Binder, U., Sarg, B., Kaiserer, L., Chhillar, A. K., Eigentler, A. et al. *Febs Journal* **2009**, *276*, 2875–2890.
11. Palicz, Z., Fűzi, M., Szentesi, P., Hegedűs, C., Leiter, É., Pócsi, I., Csernoch, L. *Acta Physiologica Hungarica* **2010**, *97*, 468–468.
12. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776–779.
13. Dawson, P. E., Kent, S. B. H. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 923–960.
14. Kent, S. B. H. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 338.
15. Váradi, G., Tóth, G. K., Kele, Z., Galgóczy, L., Fizil, Á., Batta, G. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 12684–12692.
16. Xiang, H., Xiang, G. Y., Lu, Z. M., Guo, L., Eckstein, H. *Amino Acids* **2004**, *27*, DOI 10.1007/s00726-003-0061-5
17. Lees, W. J. *In Folding of Disulfide Proteins*; Chang, R. J. Y and Ventura, S. Eds.; Springer: New York, **2011**, pp 109–132.

Synthesis of multiple disulfide bond containing peptides

Cysteine is one of the most interesting amino acids. Its sulfhydryl group plays an important role in complexation of metal ions, in biological redox systems (e.g. glutathione), and also in acyl donor compounds (coenzyme A). Besides, sulfhydryl groups form disulfide bridges which are essential in stabilization of the three-dimensional structures of proteins. The Nobel prize in 1955 was awarded to Vincent du Vigneaud for his work on the synthesis of disulfide bridge containing hormones.¹ Those hormones he worked on had only one disulfide bond. Even this can form in two different ways: either in an intra- or in an intermolecular manner.

Many biologically active peptides are known to contain multiple disulfide bridges, e.g. peptide toxins, endothelins, insulins, and antimicrobial miniproteins. In spite of the progresses and efforts in peptide chemistry, the regioselective formation and verification of the disulfide bond pattern are still challenging.^{2,3} The present study shows new methods for the synthesis of multiple disulfide-bridged peptides such as pharmacologically important toxins and antifungal miniproteins, and determination of the disulfide bond pattern in the synthesized compounds.

There are two strategies for the preparation of multiple disulfide bond containing peptides:^{4,5,6}

1. Nonselective protection of cysteine side chains and subsequent oxidative folding of polythiol precursors.
2. Stepwise formation of the disulfide bonds using orthogonal protection of the cysteine thiols.

First the synthesis of charybdotoxin and iberiotoxin, two 37-mer scorpion toxins containing 3 disulfide bridges was carried out (see Figure 1). These toxins block the Ca²⁺ activated K⁺ channel that

has importance in the regulation of the cardiovascular system. The toxins were synthesized by solid-phase peptide synthesis applying standard Boc chemistry and nonselective protection of the cysteines. Folding was carried out in a pH 8.7 glycine-NaCl buffer containing 2M urea as chaotropic agent. The disulfide bond pattern of the synthetic peptides was proved by mass spectrometry (MS) and HPLC coelution with native standard toxins.⁷

Beside these two potassium channel blockers, anuroctoxin, a polypeptide produced by the Mexican scorpion *Anuroctonus phaidodactylus* was also synthesized. Anuroctoxin contains 35 amino acids and 8 cysteines (Figure 1). The synthesis was carried out on the solid phase using Boc chemistry. Sulfhydryl groups of cysteines were protected in a nonselective manner. Different folding methods were tried and found to be successful, among them oxidation with DMSO in a pH 6.5 ammonium acetate buffer, or with cystine-cysteine in a pH 8.4 Tris buffer, and also air oxidation in a pH 8.9 glycine-NaCl buffer. But, when iodine was used in an acidic solution, two peptides having unnatural disulfide bridge pattern were formed beside the native one (see Figure 2).⁸

Antimicrobial peptides represent another class of naturally occurring peptides that contain multiple disulfide bonds. PAF is a 55-mer antifungal protein produced by the fungus *Penicillium chrysogenum*.^{9,10} (The sequence can be seen in Figure 1.) PAF is harmless for mammals as it was proven in recent PET experiments.¹¹ The structure of PAF is stabilized by three disulfide bridges.¹⁰ According to NMR investigations, two different patterns were possible: *abcabc* and *abbacc*.

The first attempt to synthesize PAF was a stepwise synthesis on the solid phase. The usage of Fmoc chemistry did not lead to the

desired product at all. The application of Boc chemistry found to be more successful, but the yield of the synthesis was only 1%. Since PAF has 6 cysteine residues, we decided to synthesize the peptide by native chemical ligation (NCL). Native chemical ligation is a type of orthogonal chemical ligation.^{12,13,14} The key compound of it is the thioester of the N-terminal peptide. The process starts with the nucleophilic attack of the thioester on the SH group of the N-terminal cysteine of the C-terminal peptide. We worked out the synthesis of a new, universally applicable solid support named as Cys-SH resin for the preparation of peptide thioesters in Boc chemistry (see Figure 3), and all of the thioesters of this work were prepared on this resin.¹⁵

Both strategies, namely selective and nonselective protection of cysteine side chains were tried for PAF. On our first attempt, 4-methylbenzyl (Meb), acetamidomethyl (Acm), and fluorenylmethyl (Fm) protecting groups were used (see Figure 4). Meb is cleaved in parallel with the detachment of the peptide from the resin, Acm can be removed by iodine or transition metal ions, e.g. Ag(I)- and Tl(III) salts, while Fm can be cleaved by a base such as piperidine. If iodine is used for the cleavage of Acm, it oxidizes the SH groups to disulfide bridge, too. But the basic treatment for the removal of Fm requires an additional oxidation step after that. Two possible orders of the cleavage of these protection groups were tried: Acm first, Fm after that and the opposite order. But, in both cases, an unnatural disulfide bridge pattern formed. Enzymatic cleavage of the intermediates and their MS investigation proved that basic treatment rearranged the previously formed disulfide bonds. To overcome this problem, phenylacetamidomethyl (Phacm) was used instead of Fm on our second attempt (see Figure 4).¹⁶ Beside those reagents that cleaves Acm, Phacm can be removed enzymatically by penicillin G amidase (PGA).¹⁷ Unfortunately, the highly cationic and relatively large molecule of PAF nonspecifically bound to the

carrier of immobilized PGA, therefore, Phacm could not be used in the preparation of this miniprotein.

Because of the failure of orthogonal protection, sulfhydryl groups of cysteines were protected nonselectively on our next attempt. Detachment of the peptide from the resin cleaved the protecting groups from all of the 6 cysteine residues. Different conditions were tested for the folding of the hexasulfhydryl peptide: usage of iodine in an acidic solution, oxidation with the oxygen of air in buffers having different pH from 7.5 to 10.5 both in the presence and in the absence of a chaotropic agent, application of CLEAR-OX, a special resin for the formation of disulfide bridges. But none of these provided native peptide. Only one condition was found in which cysteines paired correctly: folding of PAF with the help of a small molecule reducing agent. This method used to be successful for the folding of those peptides and proteins whose thermodynamically most stable disulfide pattern is not the same as the native one. In these cases, the applied reducing agent reduces the previously formed, incorrect S-S bridges, and thus, allows the right fold. In our most successful procedure, folding of PAF was carried out in a pH 7.5 ammonium acetate buffer with the use of the oxygen of the air in the presence of small amount of cysteine as reducing agent (see Figure 5). Beside this, the application of oxidized and reduced glutathione led to the desired product, too. According to MS, NMR and microbiological investigations, synthetic PAF was found to be identical with the native miniprotein (see Figure 6). MS studies revealed the *abcabc* disulfide pattern for both the synthetic and the native peptide.

Based on our results, it can be concluded, that nonselective protection of the sulfhydryl groups of cysteines was found to be more successful for the synthesis of some toxins and an antifungal miniprotein.