

Peptidkonformationen, II¹⁾**¹H-NMR-Untersuchungen zur Konformation von
cyclo(-Phe₃Gly₂-)**

Yves A. Bara, Axel Friedrich, Horst Kessler* und Michael Molter

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M., Laboratorium Niederrad,
Theodor-Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt am Main 70

Eingegangen am 7. Juni 1977

Aus der Äquivalenz der fünf Aminosäuren in *cyclo*(-Phe₅-) und *cyclo*(-Gly₅-) kann man auf ein im Sinne der NMR-Zeit-Skala schnelles Konformationsgleichgewicht schließen. Die Titelverbindung liegt dagegen überwiegend in einer Konformation vor und eignet sich daher für detaillierte Untersuchungen. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte durch Synthese und Messung von drei Derivaten, in denen jeweils eine Aminosäure der Sequenz in α -Stellung deuteriert wurde. Aus der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der NH-Signale bzw. deren Veränderung beim Zusatz von Trifluorethanol oder Chloroform folgt, daß in DMSO die NH-Protonen von Phe² und Gly⁵ zwei intramolekulare Wasserstoffbrücken bilden. Das Phe²-NH ist Bestandteil einer γ -Schleife, während man aus der geminalen Kopplungskonstanten der α -Protonen von Gly⁴ schließen kann, daß das NH-Proton von Gly⁵ an einer β -Schleife vom Typ II beteiligt ist. Die an Cyclopentapeptiden gewonnenen Ergebnisse zeigen übereinstimmend das Vorliegen wenigstens einer γ -Schleife, die offenbar in kleineren Peptiden nicht so ungünstig ist, wie bisher angenommen wurde.

Conformation of Peptides, II¹⁾**¹H NMR Investigation of the Conformation of *cyclo*(-Phe₃-Gly₂-)**

The equivalence of the five amino acids of *cyclo*(-Phe₅-) and *cyclo*(-Gly₅-) indicates a fast equilibration on the NMR time scale. However, *cyclo*(-Phe₃-Gly₂-) is conformationally homogeneous and hence was selected for detailed NMR investigations. For signal assignments three derivatives, each of which contains one α -deuterated amino acid in the sequence, were synthesized. The temperature dependence of the chemical shift of the NH signals in DMSO proves intramolecular hydrogen bonds of Phe²- and Gly⁵-NH. This is supported by the spectral change after addition of trifluoroethanol or chloroform. Phe²-NH is involved in a γ -loop, whereas it is concluded from the geminal coupling constants of the Gly⁴ α -protons that Gly⁵-NH is part of a β -loop of type II. The results from conformational investigations of so far known cyclopentapeptides show that in each of them at least one γ -loop is formed. Obviously in smaller peptides the γ -loop is less unfavourable as usually assumed.

Die NMR-Spektroskopie ist zur Untersuchung von Peptidkonformationen in Lösung besonders geeignet²⁾. Probleme treten jedoch immer dann auf, wenn die Bewegungs-

¹⁾ I. Mitteil.: D. Demel und H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2801.

²⁾ Übersichten für cyclische Peptide: ^{2a)} Yu. A. Ovchinnikov und V. T. Ivanov, *Tetrahedron* **31**, 2177 (1975). — ^{2b)} C. M. Deber, V. Madison und E. R. Blout, *Acc. Chem. Res.* **1976**, 106. —

^{2c)} K. Wüthrich, *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1976.

möglichkeit eines Peptids so vielfältig ist, daß mehrere Konformationen in nennenswertem Umfang am Gleichgewicht beteiligt sind. Da die meisten intramolekularen Beweglichkeiten eines Peptids schnell im Sinne der NMR-Zeit-Skala³⁾ sind, wird in solchen Fällen nur ein statistisch gemittelttes Spektrum beobachtet, dessen Aussagekraft beschränkt ist. Wir haben die cyclischen Pentapeptide aus Phenylalanin und Glycin (Synthesen voranstehend⁴⁾) im Hinblick auf deren Konformation systematisch untersucht. Wir wählten cyclische Pentapeptide dafür aus, weil einerseits durch den Ringschluß die Bewegungsmöglichkeiten stark eingeschränkt sind und andererseits Pentapeptide die kleinsten Ringsysteme aufbauen können, in denen die energetisch günstigere *trans*-Konformation für alle Peptidbindungen spannungsfrei möglich ist⁵⁾. Aus dieser Sicht ist es erstaunlich, daß nur wenige Arbeiten über die Konformation solcher Ringsysteme vorliegen^{1, 6)}. Neben Phenylalanin verwendeten wir Glycin für unsere Untersuchungen, weil dieses konformativ auch die Rolle einer *D*-Aminosäure übernehmen kann. Es stellte sich allerdings im Laufe der Arbeit heraus, daß die Löslichkeiten der Cyclopentapeptide nur Messungen in DMSO und DMSO-haltigen Lösungsmittelgemischen erlaubten. Wir berichten hier über die Konformationsstudien an *cyclo*-(Phe₃Gly₂-).

NMR-Spektren von *cyclo*-(Phe₃Gly₂-)

Das 270-MHz-¹H-NMR-Spektrum der Titelverbindung in DMSO bei 20°C ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Erwartungsgemäß sind die Signale der aromatischen Protonen und der β -Protonen der Phenylalaninreste nicht vollständig aufgelöst. Die NH-Protonen der Phenylalanine sind von denjenigen der Glycine anhand des Aufspaltungsbildes sofort zu unterscheiden. Die α -Protonen der Glycinreste erscheinen als AB-Teile von ABX-Spektren; diejenigen der Phenylalaninreste als drei sich teilweise überlagernde Quartetts, die jedoch eine unterschiedliche Abhängigkeit von der Temperatur zeigen. Aus dem Bereich der β -Protonen der Phenylalanine ist eine Signalgruppe (A von ABMX) eines Protons zu tiefem Feld verschoben. Die Zugehörigkeit dieses Signals zu den entsprechenden Signalen für das α - und NH-Proton wurde durch Doppelresonanzexperimente sichergestellt. Dies gilt gleichermaßen für die restlichen α - und NH-Protonen.

Zur Interpretation der Konformation war die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Aminosäuren der Sequenz des Peptidringes erforderlich. Wir haben daher drei Derivate der Verbindung hergestellt, in denen jeweils bei einer Aminosäure (Phe¹, Phe² und Gly⁴) die α -Stellung deuteriert war. Die entsprechenden α -Protonensignale sind dann im Spektrum verschwunden und die zugehörigen NH-Signale vereinfachen sich zu Singulettts (Abb. 1). In den deuterierten Derivaten waren teilweise Überlappungen so weit reduziert,

³⁾ H. Kessler, *Angew. Chem.* **82**, 237 (1970); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **9**, 219 (1970).

⁴⁾ Y. A. Bara, A. Friedrich, W. Hehlein, H. Kessler, P. Kondor, M. Molter und H.-J. Veith, *Chem. Ber.* **111**, 1029 (1978), voranstehend.

⁵⁾ C. Ramakrishnan und K. P. Sarathy, *Int. J. Protein Res.* **1**, 63 (1969); vgl. jedoch die Struktur von Dihydrochlamydocin: I. L. Karle, *Peptides: Chemistry, Structure, Biology*, Ed. R. Walter und J. Meienhofer, S. 61 ff., Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor Mich. 1975.

⁶⁾ J. P. Meraldi, R. Schwyzer, A. Tun-kyi und K. Wüthrich, *Helv. Chim. Acta* **55**, 1962 (1972). — Cyclische Pentapeptide mit *N*-alkylierten Aminosäuren⁷⁾ weisen sowohl *trans*- als auch *cis*-Peptid-Bindungen auf und können mit unserer Verbindung nicht verglichen werden.

⁷⁾ K. Titlestad, *Acta Chem. Scand., Ser. B* **29**, 153 (1975); **30**, 753 (1976).

daß Doppelresonanzexperimente zur Zuordnung der C_βH-Signale vereinfacht wurden. Die somit vollständig zugeordneten NMR-Daten des Cyclopentapeptids sind in Tab. 1 aufgeführt.

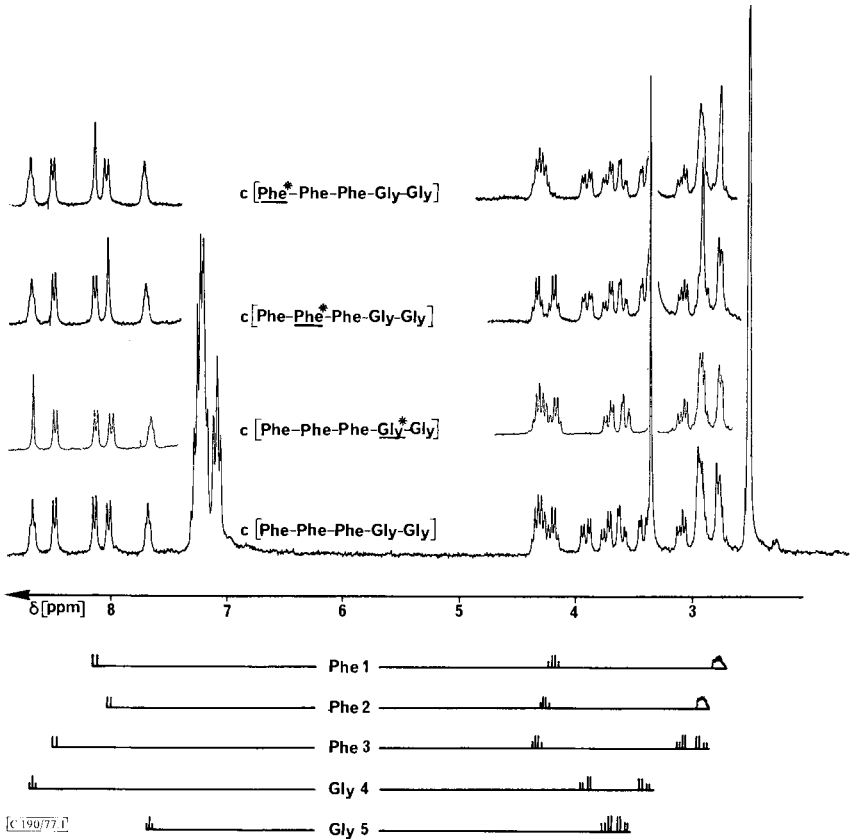


Abb. 1. 270-MHz-¹H-NMR-Spektren von *cyclo*-(Phe₃-Gly₂-) und einiger deuterierter Derivate in DMSO bei 20 °C. Die α-Protonen der unterstrichenen Aminosäuren sind jeweils gegen Deuterium ausgetauscht

Tab.: ¹H-NMR-Spektrum von *cyclo*-(Phe¹-Phe²-Phe³-Gly⁴-Gly⁵-) in DMSO bei 20 °C. δ-Werte, bezogen auf TMS, Meßfrequenz 270 MHz

	Phe ¹	Phe ²	Phe ³	Gly ⁴	Gly ⁵
NH	8.14 d	8.02 d	8.49 (d)	8.68 (t)	7.69 (t)
C _α H	4.19 q	4.28 q	4.33 (q)	A 3.42 B 3.90	A 3.60 B 3.72
C _β H	um 2.70 (m)	um 2.90 (m)	A 2.90 B 3.09		
³ J _{NH-C_αH}	7.85	8.56	7.65	A 5.18 B 6.35	A 5.03 B 6.34
² J _{HC_αH}	—	—	—	15.39	15.06

Die Temperaturabhängigkeit der NH-Signale in DMSO ist in Abb. 2 dargestellt. Im Bereich von 295 bis 365 K verschieben sich alle NH-Signale unterschiedlich stark, aber linear zu höherem Feld. Abweichungen von der Linearität werden bei höheren Temperaturen beobachtet.

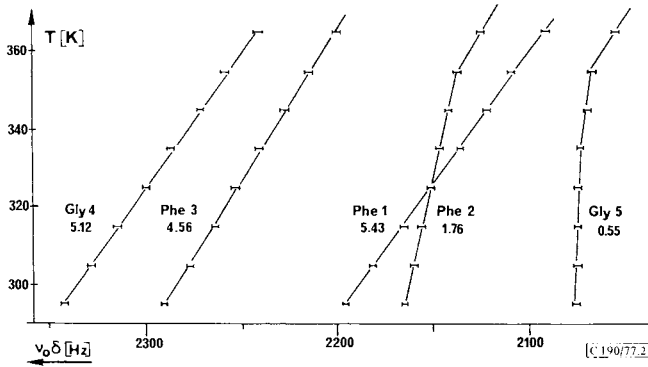


Abb. 2. Temperaturabhängigkeit der NH-NMR-Signale von *cyclo*-(Phe¹-Phe²-Phe³-Gly⁴-Gly⁵-) in DMSO. Meßfrequenz $\nu_0 = 270$ MHz

Der Einfluß des Zusatzes von Trifluorethanol (TFE) zur DMSO-Lösung des Cyclopeptids auf die chemischen Verschiebungen der NH-Signale konnte bis zu einem Anteil von 55% TFE beobachtet werden (Abb. 3).

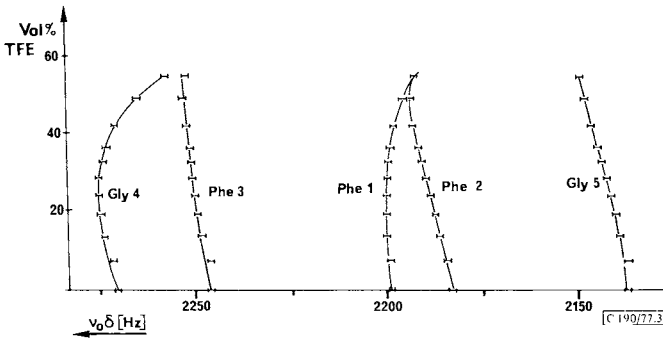


Abb. 3. Einfluß des Zusatzes von Trifluorethanol zur DMSO-Lösung von *cyclo*-(Phe³-Gly²-) auf die Lage der NH-NMR-Signale

Bei höheren TFE-Konzentrationen löst sich das Substrat nicht mehr hinreichend. Ein Zusatz von CDCl_3 zur DMSO-Lösung des Cyclopeptids (Abb. 4) bewirkt zunächst eine Hochfeld-Verschiebung des NH-Signals von Phe¹, während die übrigen NH-Signale bis zu einem Verhältnis $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ (1:1) nahezu unbeeinflusst bleiben. Bei höheren Chloroformkonzentrationen werden die NH-Signale von Gly⁴, Phe³ und Phe¹ stark nach hohem Feld verschoben. Das NH-Dublett von Phe² erscheint nahezu unverändert, während das NH-Signal von Gly⁵ sogar zu tiefem Feld verschoben wird. Auffallend ist weiterhin, daß die Signale der beiden diastereotopen Methylenprotonen von Gly⁵ aufeinander

zu wandern, um bei einem Anteil von ca. 58% CDCl_3 zu einem Dublett zusammenzufallen. Bei noch höheren Chloroformkonzentrationen tritt jedoch wieder der typische AB-Teil eines ABX-Spektrums in Erscheinung.

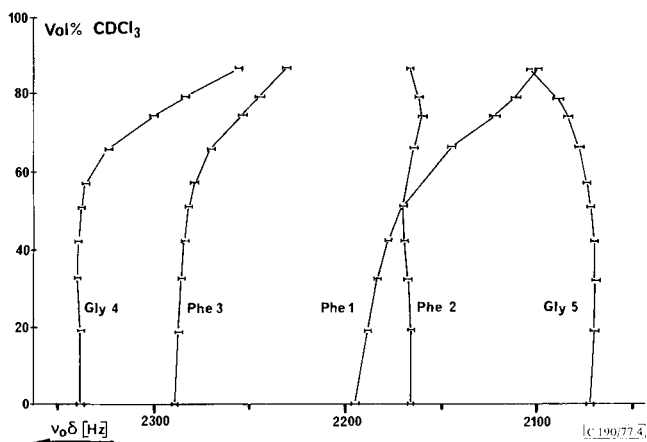


Abb. 4. Einfluß des Zusatzes von CDCl_3 zur DMSO-Lösung von *cyclo*-(Phe_3 - Gly_2 -) auf die Lage der NH-NMR-Signale

Die Austauschgeschwindigkeit der NH-Protonen gegen Deuterium wurde durch Zusatz von wenig D_2O zur DMSO-Lösung des Peptids bei 22°C gemessen. Am schnellsten wird der Wasserstoff von Gly^4 ausgetauscht (Halbwertszeit $t_{1/2}$ ca. 1.9 h). Die anderen NH-Signale zeigen eine geringere Differenzierung ($t_{1,2}$: Phe^3 4.7 h, Gly^5 5.2 h, Phe^1 6.8 h, Phe^2 7.4 h)⁸⁾.

Das ^{13}C -Spektrum der Titelverbindung in ^{12}C -DMSO läßt fünf CO-Signale ($\delta = 171.1, 171.0, 170.5, 169.2$ und 168.8) erkennen; die Signale für die α -Kohlenstoffatome erscheinen bei 43.4, 42.8 (Gly^4 und Gly^5) und bei 37.4, 36.8 und 36.4 (Phe^1 bis Phe^3); die C_β -Kohlenstoffkerne kommen bei 56.3 (Intensität 2) und 54.9 zur Resonanz, während die zu erwartenden 12 Signale der Phenylreste unvollständig aufgelöst werden.

Weitere NMR-Spektren von Cyclopentapeptiden

Die ^1H -NMR-Spektren sämtlicher Phenylalanin und Glycin enthaltenden Cyclopentapeptide⁴⁾ wurden ebenfalls gemessen. Die Temperaturgradienten⁹⁾ der NH-Verschiebung sind in Abb. 5 dargestellt.

Es zeigt sich durch die Äquivalenz aller Aminosäuren in den Cyclohomopeptiden, daß *cyclo*-(Gly_5 -) eine D_{5h} -Symmetrie und *cyclo*-(Phe_5 -) bei Raumtemperatur eine C_5 -Symmetrie aufweisen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum von *cyclo*-(Gly_5 -) in ^{12}C -DMSO wurden dementsprechend auch nur zwei Signale beobachtet: dasjenige der Carbonylkohlenstoffe bei $\delta = 169.4$ und ein C_α -Signal bei 43.0 von TMS.

⁸⁾ Fehler in den Halbwertszeiten ca. 0.5 h. Die relative Reihenfolge der Austauschgeschwindigkeiten der einzelnen NH-Protonen ist eindeutig bestimmbar.

⁹⁾ Die Messungen wurden am 90-MHz-Gerät im Temperaturbereich von 30 bis 120°C durchgeführt.

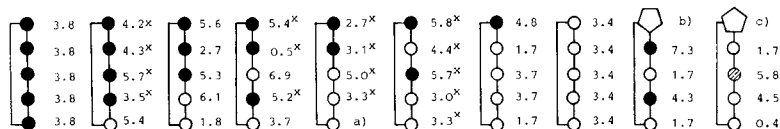


Abb. 5. Temperaturgradienten der NH-Signale [$\cdot 10^{-3}$ ppm/Grad] im Bereich von 50–120°C. Messungen bei 90 MHz in DMSO. Die mit \times bezeichneten Signale sind in der Sequenz nicht zugeordnet. Die Symbole für die Aminosäuren bedeuten: ● Phe; ○ Gly; ◇ Pro; ⊗ Ala.
 a) Der Wert für dieses Signal ist bei 90 MHz wegen Signalüberlappung nicht zu ermitteln.

b) Lit. ¹⁾

c) Lit. ⁶⁾

Diskussion

Für die Bestimmung der Gerüstkonformation ("backbone") eines Peptids in Lösung liefert der Nachweis der internen bzw. externen Orientierung der NH-Protonen eine erste wichtige Information. Eine interne Ausrichtung der NH-Protonen bedingt den Verlust der Wasserstoffbrücke zu einem Lösungsmittel, das als H-Brücken-Acceptor fungieren kann (z. B. DMSO). Dies wird oft durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke energetisch kompensiert. In Cyclopentapeptiden sind intramolekulare Wasserstoffbrücken zum Carbonylsauerstoff der Aminosäure 1 nur von NH-Gruppen der Aminosäure 3 (3 → 1-Brücke, 7-gliedriger Ring, γ -Schleife) oder 4 (4 → 1-Brücke, 10-gliedriger Ring, β -Schleife) möglich (Abb. 6)¹⁰⁾. 5 → 1-Wasserstoffbrücken, die dem Strukturelement der α -Helix entsprechen, können in Cyclopentapeptiden nicht ausgebildet werden, weil neben dem 13-gliedrigen Ring ein 8-gliedriges Ringsystem mit einer *trans*-Peptidbindung gebildet würde, das energetisch relativ ungünstig sein sollte. Die dominierende Konformation in *cyclo*-(Phe₃Gly₂-) ergibt sich daher weitgehend durch die Festlegung der vom Solvens abgeschirmten NH-Protonen in der Aminosäuresequenz. Diese Aussage wird durch die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der NH-Signale ermöglicht.

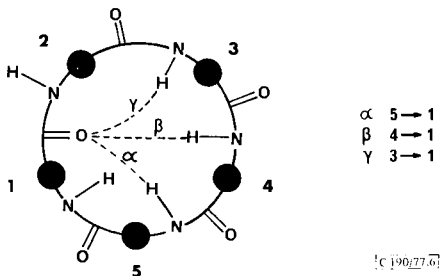


Abb. 6. Interne Wasserstoffbrücken in Cyclopentapeptiden

Die Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel DMSO sind wegen der notwendigen Fixierung der Solvensmoleküle stark von der Temperatur abhängig. Temperaturgradienten von 5 bis $7 \cdot 10^{-3}$ ppm/K gelten allgemein^{2,12)} als Nachweis für die Existenz externer

¹⁰⁾ Die von Neel¹¹⁾ aufgrund der Interpretation von IR-spektroskopischen Daten vorgeschlagene 2 → 1-Brücke konnte bislang in Peptiden nicht bestätigt werden. Sie sind von uns nicht in Betracht gezogen worden.

¹¹⁾ J. Neel, Pure Appl. Chem. 31, 201 (1972).

¹²⁾ Eigene Messungen an *cyclo*-(Gly₂-) und *cyclo*-(Gly-Ala-) ergaben für die externen NH-Protonen des Glycins Koeffizienten von 5.0 bzw. $4.5 \cdot 10^{-3}$ ppm/K und für das externe NH-Proton des Alanins $5.6 \cdot 10^{-3}$ ppm/K.

Wasserstoffbrücken zum DMSO¹³⁾, während Werte unter $2 \cdot 10^{-3}$ ppm/K als Hinweis auf „interne Wasserstoffbrücken“ interpretiert werden. Dabei ist zunächst die Aussage richtig, daß die NH-Protonen mit kleinen Temperaturkoeffizienten vom Solvens abgeschirmt sind; ob jedoch interne NH-Protonen gleichzeitig Brückenbindungen zu Peptid-carbonylgruppen eingehen, geht hieraus nicht unmittelbar hervor. Beispielsweise wurden im C₂-symmetrischen Cyclohexapeptid *cyclo*-(L-Ala-L-Pro-D-Phe)₂ aufgrund der Temperaturgradienten der NH-Signale in den NMR-Spektren zwei intramolekulare Wasserstoffbrücken NH-L-Ala → CO-L-Ala' abgeleitet¹⁴⁾, während die Röntgenstrukturanalyse dieses Peptids einen O–N-Abstand von 3.20 Å und einen Winkel von ca. 132° zeigt, was einer „extrem schwachen Wasserstoffbrücke“ entspricht¹⁵⁾. Als ein sehr grobes Maß für die Stärke einer internen H-Brücke kann die chemische Verschiebung der NH-Protonen angesehen werden. Anisotropieeffekte müssen dabei jedoch vernachlässigt werden (vgl. Lit.¹⁴⁾).

Im Gegensatz zu früheren Annahmen scheint die Konformation eines Peptids in DMSO-Lösung mehr durch die starken Brücken zum Solvens als durch intramolekulare Brücken bestimmt zu werden.

Die Äquivalenz der NMR-Signale aller Aminosäuren der Cyclopentahomopeptide, *cyclo*-(Gly₅-) und *cyclo*-(Phe₅-), zeigt eine hohe Symmetrie an. Diese augenscheinliche Gleichwertigkeit kann aber auch von einem im Sinne der NMR-Zeit-Skala häufigen³⁾ Austausch von Konformationstopomeren¹⁶⁾ und Konformationsisomeren hervorgerufen werden. Obwohl Berechnungen an symmetrischem *cyclo*-(Ala₅-) ergeben haben, daß eine C₅-symmetrische Konformation möglich ist⁵⁾, neigen wir zu der Annahme eines schnellen Gleichgewichtes, wie es ähnlich in Cyclohexapeptiden aus Alanin und Glycin bereits vorgeschlagen wurde¹⁷⁾.

Es ist auffallend, daß in den Glycin und Phenylalanin enthaltenden Cyclopentapeptiden entweder mittlere Temperaturgradienten der NH-Verschiebung beobachtet werden, oder daß es zwei relativ kleine und drei relativ große Werte gibt. Es liegt die Annahme nahe, daß diejenigen Peptide, die extreme Temperaturgradienten aufweisen, eine Konformation im Gleichgewicht mit anderen Konformationen bevorzugen. Wir haben daher diese Cyclopentapeptide ausgewählt und zum detaillierten Konformationsstudium benutzt. Das in dieser Arbeit untersuchte *cyclo*-(Phe₃Gly₂-) weist deutlich zwei kleinere Temperaturkoeffizienten für die NH-Protonen von Gly⁵ und Phe² auf (Abb. 5).

Wir gehen bei unserer Diskussion davon aus, daß nur *trans*-Peptidbindungen vorkommen. Selbst in prolinhaltigen Cyclopentapeptiden^{1,6)} dominiert die *trans*-Konformation des Prolins, so daß für die hier besprochenen Peptide kein Grund zur Annahme

¹³⁾ Teilweise werden diese Werte auch auf andere Lösungsmittel übertragen. Dies ist unserer Meinung nach jedoch nicht ohne weiteres erlaubt.

¹⁴⁾ K. D. Kopple, T. J. Schamper und A. Go, J. Am. Chem. Soc. **96**, 2597 (1974).

¹⁵⁾ J. N. Brown und R. G. Teller, J. Am. Chem. Soc. **98**, 7565 (1976). Da in der Elementarzelle (2 Moleküle Peptid) 16 Moleküle Wasser auftreten, kann eine weitgehende Übereinstimmung mit der Struktur in Lösungsmitteln, die als H-Brückenakzeptor wirken können, angenommen werden.

¹⁶⁾ G. Binsch, E. L. Eliel und H. Kessler, Angew. Chem. **83**, 618 (1971); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **10**, 570 (1971).

¹⁷⁾ V. T. Ivanov, S. L. Portnova, T. A. Balashova, V. F. Bystrov, V. V. Shilin, J. Biernat und Bu. A. Orchinikov, Khim. Prir. Soedin. **7**, 339 (1971), und dort zitierte Literatur [Chem. Abstr. **75**, 130121z (1971)].

einer um ca. 2 kcal/mol energiereicheren *cis*-Peptidbindung zu sehen ist. In der unter den Meßbedingungen stabilsten Konformation müßten daher die Carbonylgruppen nach außen gerichtet sein, die mit den intern orientierten NH-Gruppen der Aminosäuren 2 und 5 verknüpft sind. Folglich kommen als Acceptoren für intramolekulare Wasserstoffbrücken nur die Carbonylgruppen der Aminosäuren 2, 3 und 5 in Frage (Abb. 7). Nach den oben angeführten Argumenten steht somit für das intramolekular orientierte NH-Proton von Phe² nur die Carbonylgruppe von Gly⁵ unter Ausbildung einer γ -Schleife zur Verfügung. Das NH-Gly⁵ könnte dagegen mit CO-Phe² (β -Schleife) oder CO-Phe³ (γ -Schleife) eine zweite Wasserstoffbrücke ausbilden.

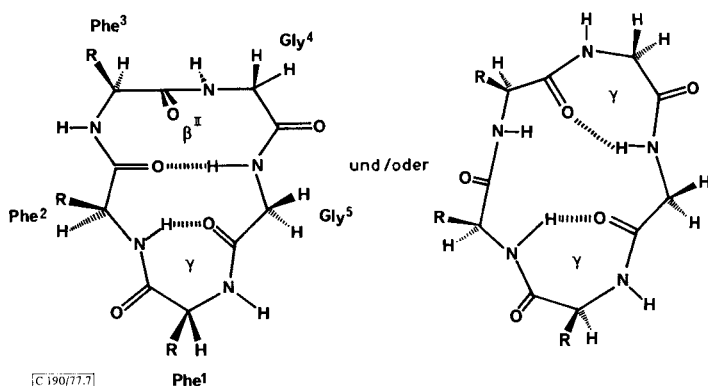


Abb. 7. Konformation von *cyclo*-(Phe₃-Gly₂) in DMSO

Nähere Aussagen kann man aus der Lösungsmittelabhängigkeit gewinnen. Der Zusatz von TFE^{18, 19)} führt zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken vom TFE zu allen „externen“ Carbonylgruppen. Dadurch werden die Signale der benachbarten NH-Protonen zu tiefem Feld verschoben. Bei höheren TFE-Konzentrationen bewirkt der Ersatz des starken Wasserstoffbrückenacceptors DMSO eine Hochfeldverschiebung. Mit den bisherigen Überlegungen im Einklang ist somit die Tieffeldverschiebung der NH-Signale für Phe² und Gly⁵ (Abb. 3), deren benachbarte Carbonylgruppen extern orientiert sein müssen. Auffallend ist weiterhin, daß das NH-Signal von Phe¹ wegen der benachbarten internen Carbonylgruppe zunächst unbeeinflusst bleibt, wodurch die γ -Schleife NH-Phe²-CO-Gly⁵ bestätigt wird. Das Verhalten der NH-Signale von Phe³ und Gly⁴ gibt kein Entscheidungskriterium zugunsten einer der beiden Konformationen in Abb. 7, da ein TFE-Zusatz eine schwache Tieffeldverschiebung bewirkt. Erst bei Konzentrationen über 30% wandert das NH-Signal von Gly⁴ deutlich zu hohem Feld (vgl. NH-Phe¹). Da der Zusatz von TFE konformationelle Änderungen bewirken kann, halten wir die Schlußfolgerungen aus den Kopplungskonstanten (s. u.) für sicherer.

Eine weitere Bestätigung der bisher diskutierten Resultate liefern die durch Chloroform induzierten Verschiebungen. Dieses Lösungsmittel ist ebenfalls ein Wasserstoffbrücken-donator, es wirkt im Vergleich zu TFE jedoch schwächer. Ein geringer Chloroformzusatz macht sich zunächst wenig bemerkbar, da die Adduktbildung mit dem DMSO das CDCl₃

¹⁸⁾ Vgl. z. B. D. W. Urry und M. M. Long, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4**, 1 (1976), und dort zitierte Literatur.

¹⁹⁾ M. Llinas und M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4731 (1975).

nahezu quantitativ abfängt²⁰⁾. Erst oberhalb einer 1:1-Konzentration wirkt sich der DMSO-Unterschub in einer Hochfeldverschiebung der externen peptidischen NH-Signale aus. Folglich verschieben sich nun die NH-Signale für Phe¹, Phe³ und Gly⁴ zu höherem Feld, während die Signale der intern orientierten NH-Gruppen für Phe² und Gly⁵ wegen der nun z. T. brückegebundenen benachbarten CO-Gruppen leicht nach tiefem Feld verschoben werden.

Die Austauschgeschwindigkeit der NH-Protonen gegen Deuterium kann als ein kinetisches Experiment für die Thermodynamik eines Konformationsgleichgewichtes nur Anhaltspunkte liefern. So kann der Austausch eines NH-Protons über eine nur wenig populierte Konformation eine Exposition zum Solvens vortäuschen, obwohl in der thermodynamisch stabilsten Form das NH-Proton intern orientiert ist. Daher kann zwar die relativ kleine Austauschgeschwindigkeit von Gly⁵ im Vergleich zu Gly⁴ und von Phe² im Vergleich zu Phe³ und Phe¹ als ein weiterer Hinweis für die oben abgeleitete Konformation von *cyclo*-(Phe₃Gly₂-) gewertet werden; wir möchten diesem Argument jedoch keine zu große Bedeutung beimessen.

Die Analyse der Kopplungskonstanten kann in günstigen Fällen weitere Anhaltspunkte über die Konformation in Lösung liefern²¹⁾. Hauptnachteil dieser Methode ist die Vieldeutigkeit der Karplus-Kurve, die jeweils mehrere Winkelbereiche zur Interpretation der gemessenen Kopplungskonstanten erlaubt. In einem Fall²²⁾ ist es gelungen, durch Isotopenanreicherung über die ¹H-Heteroatom-Kopplung eindeutige Antworten zu erhalten. Dieses Verfahren ist jedoch extrem aufwendig. Eine zusätzliche Schwierigkeit tritt in unserem Fall auf, da bei Festlegung der oben bewiesenen γ -Schleife NH-Phe²-CO-Gly⁵ noch drei mögliche Strukturen verbleiben, die sich bezüglich der über die Kopplung meßbaren Winkel nur geringfügig unterscheiden. Die NH-Gruppe von Gly⁵ kann dabei entweder in eine γ -Schleife zum CO-Phe³ oder in eine β -Schleife vom Typ I oder Typ II zum CO-Phe² einbezogen sein. Die wesentlichen Unterschiede liegen weniger am ϕ -Winkel von Gly⁴ (Definition der Winkel gemäß IUPAC-Nomenklatur²³⁾; nach Lit.²⁴⁾ gilt für ϕ in γ $77 \pm 10^\circ$; β^I $66 \pm 10^\circ$; β^{II} $62 \pm 5^\circ$), der über die vicinale NH-C₂H-Kopplungskonstante zugänglich ist, als im ψ -Winkel von Gly⁴ (γ $70 \pm 10^\circ$; β^I $22 \pm 10^\circ$; β^{II} $132 \pm 10^\circ$). Die vicinalen Kopplungskonstanten an Gly⁴ (5.18 und 6.35 Hz) lassen sich mit dem ϕ -Winkel von $60 - 80^\circ$ gut interpretieren. Als Unterscheidungskriterium bietet sich jedoch die geminale Kopplung der Glycinprotonen an. Die Größe dieser Kopplung wird durch die Orientierung der Carbonylgruppe bestimmt²⁵⁾, so daß daraus der ψ -Winkel ermittelt werden kann. Leider ist das verfügbare experimentelle Material noch relativ beschränkt. Die beobachtete Kopplung J_{HH} an Gly⁴ beträgt 15.4 Hz und entspricht daher einem ψ -Winkel von $30 - 53^\circ$ bzw. $130 - 155^\circ$ ²¹⁾. Bei aller notwendigen Vorsicht der Interpretation spräche dies mehr für eine 4 \rightarrow 1 Wasserstoffbrücke vom Typ II (Abb. 7 links).

²⁰⁾ Das CHCl₃-Signal ist folglich bei geringen Chloroformkonzentrationen deutlich zu tiefem Feld verschoben. Erst oberhalb 50% CHCl₃ wandert das Signal auf den normalen Wert von $\delta = 7.24$ zu.

²¹⁾ V. F. Bystrov, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectros. **10**, 41 (1976).

²²⁾ V. F. Bystrov, Vortrag auf der 17th Experimental NMR Conference in Pittsburgh, USA 1976.

²³⁾ IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Biochemistry **9**, 3471 (1970).

²⁴⁾ I. L. Karle in Peptides - Chemistry, Structure, Biology, Edit. R. Walter und J. Meienhofer, S. 61 ff., Ann Arbor Science, Ann Arbor Mich. 1975.

²⁵⁾ K. Titlestad, P. Groth, J. Dale und M. I. Ali, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1973**, 346.

Schlußbemerkung

Zur Bestimmung der stabilsten Konformation von *cyclo*-(Phe₃Gly₂-) in DMSO wurde die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der NH-Protonen, deren Austauschgeschwindigkeit gegen Deuterium, die spektroskopischen Veränderungen bei Zugabe von Chloroform bzw. TFE und die Kopplungskonstanten analysiert. Alle Methoden zeigten übereinstimmend die interne Orientierung der NH-Protonen von Phe² und Gly⁵. Die vorgeschlagene stabilste Konformation enthält eine 3 → 1-Wasserstoffbrücke von Phe² nach Gly⁵. Die intramolekulare Orientierung des NH-Protons von Gly⁵ erlaubt entweder eine 4 → 1-Brücke vom Typ II zum Carbonylsauerstoff von Phe² oder – weniger wahrscheinlich – eine 3 → 1-Brücke zum CO von Phe³. Die Spektren sind auch mit einem dynamischen Gleichgewicht zwischen diesen beiden Strukturen vereinbar (Abb. 7).

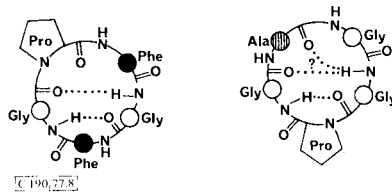


Abb. 8. Konformation von *cyclo*-(Pro-Phe-Gly-Phe-Gly-) und *cyclo*-(Pro-Gly-Ala-Gly₂-) (s. Text)

Es ist interessant, dieses Ergebnis mit den bisher bekannten Cyclopentapeptid-Konformationen mit *all-trans*-Peptidbindungen zu vergleichen. In dem von uns untersuchten *cyclo*-(Pro-Phe-Gly-Phe-Gly-) (Abb. 8) wird eine sehr ähnliche Struktur (mit zwei intramolekularen Wasserstoffbrücken unter Ausbildung einer β - und einer γ -Schleife) bewiesen, in der ein Phenylalanin in einer γ -Schleife steht¹⁾. Die Struktur entspricht damit weitgehend den hier beschriebenen Resultaten. Eine andere Deutung wurde von Wüthrich et al. für die dominierende Konformation von *cyclo*-(Pro¹-Gly²-Ala³-Gly⁴-Gly⁵-) gegeben^{6, 26)}. Auch dort beobachtet man zwei kleine Temperaturkoeffizienten der Verschiebung der NH-NMR-Signale, die jedoch von den Autoren nur durch 4 → 1-Brücken (β -Schleifen) interpretiert werden. Die kleinen Koeffizienten von Gly² und Gly⁵ werden durch ein dynamisches Gleichgewicht zweier Strukturen erklärt²⁶⁾. Dafür sind unseres Erachtens aber die erwähnten Temperaturkoeffizienten zu klein. Die Ergebnisse lassen sich jedoch zwanglos durch eine Struktur erklären, die zwei intramolekulare NH-Orientierungen unter Ausbildung mindestens einer 3 → 1-Brücke aufweist (Gly² zu CO-Gly⁵, s. Abb. 8)^{26a)}.

Es scheint uns durchaus denkbar, daß die γ -Schleife gegenüber der β -Schleife energetisch nicht sehr benachteiligt ist. Der Befund, daß β -Schleifen bei Röntgenstrukturanalysen von Proteinen viel häufiger gefunden wurden, ist wohl eher geometrisch zu erklären, da bei einer β -Schleife die Peptidkette um 180° zu einer zum Aufbau der Falblattstruktur

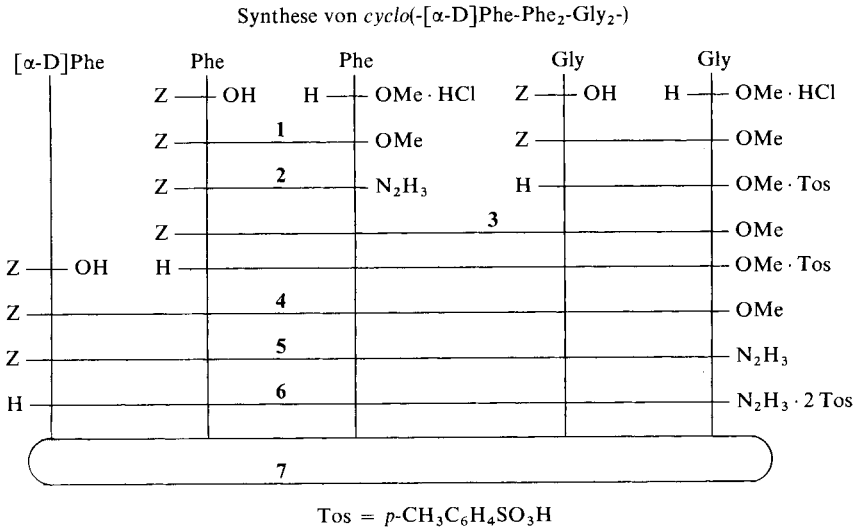
²⁶⁾ K. Wüthrich, A. Tun-Kyi und R. Schwyzer, FEBS-Lett. **25**, 104 (1972).

^{26a)} Anm. bei der Korrektur (9. 1. 1978): Kürzlich wurde unabhängig von unseren Arbeiten in dem Cyclopentapeptid *cyclo*-(Gly-Pro-Gly-D-Ala-Pro-) durch NMR-Untersuchungen (L. Pease, persönliche Mitteilung) und Röntgenstrukturbestimmung (I. L. Karle, Pure Appl. Chem. **49**, 1291 (1977)) die β, γ -Konformation nachgewiesen.

optimalen Anordnung zurückgefaltet wird. Eine γ -Schleife hingegen führt nur zu einer Rückbiegung von ca. 120° , die weiteren Stabilisierungsmöglichkeiten fehlen dann. Zur Unterbrechung einer α -Helix ist eine γ -Schleife ohnehin zu schwach. Ausgehend von den Erfahrungen an Proteinen wird bei Strukturvorschlägen für cyclische und acyclische Peptide die β -Schleife meist bevorzugt. Bei Konformationsuntersuchungen von kleineren Peptiden erfordern solche Analogieschlüsse nach unserer Meinung jedoch eine detaillierte experimentelle Überprüfung.

Synthese der spezifisch deuterierten Titelverbindung

Der anfänglich beschriebene Weg zur Darstellung von *cyclo*(-Phe₃-Gly-[α,α -D₂]Gly-) über Trityl-Gly-[α,α -D₂]Gly-Phe₃·NHNH₂ führte nur in höchst unbefriedigender Gesamtausbeute zu unsauberem Produkt. Die im Verlauf der Synthese der linearen Vorstufen auftretenden Reinigungsprobleme umgingen wir durch Änderung des Syntheseweges (jetzt wurde Gly⁴ in α -Stellung deuteriert, vgl. Synthese der undeuterierten Verbindung in Lit.⁴⁾). Die in Phe² und Gly⁴ deuterierten cyclischen Pentapeptide wurden analog der undeuterierten Verbindung erhalten. Bei der Synthese von Phe¹-deuteriertem Cyclopentapeptid wurde mit Rücksicht auf eine minimale Zahl deuterierter Zwischenstufen das Z-geschützte lineare Pentapeptid durch eine (1 + 4)-Kupplung dargestellt (Schema).



Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für Sachbeihilfen. A. F. dankt der *Studienstiftung des Deutschen Volkes* für die Gewährung eines Promotionsstipendiums. Ein Teil der Arbeiten wurde in dem Robert Robinson Institut der Universität Liverpool durchgeführt. Wir danken Prof. G. W. Kenner für seine Unterstützungen.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Kofler, nicht korrigiert. — Drehwerte: Polarimeter LEP A2 der Firma Carl Zeiss, 1-dm-Küvette. — Dünnschichtchromatographie (DC): Fertigfolien SIF Riedel de Haën. Als Laufmittel wurden folgende Systeme verwendet: A n-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1); B Chloroform/Methanol/Eisessig (95:5:1); C Ethylacetat/Pyridin/n-Butanol/Wasser (20:3:10:5). — ¹H-NMR-Spektren: Bruker HX 90, 90 MHz, und Bruker WH 270, 270 MHz, PFT-Spektren; wenn nicht anders angegeben, ca. 0.03 M Lösungen in DMSO bei 50°C (HX 90) bzw. 22°C (WH 270). Für die Zuordnung werden die Aminosäuren vom N-Terminus ausgehend durchnummeriert. — Verbindungen, die deuterierte Aminosäuren enthielten, wurden nur durch DC und NMR (270 MHz) charakterisiert, um Substanzerluste möglichst gering zu halten.

[α , α -D₂]Gly war von der Firma Merck Sharp & Dohme erhältlich; [α -D]Phe mußte dagegen nach Lit.²⁷⁾ dargestellt werden. Die Racemattrennung gelang mit Ephedrin analog Lit.²⁸⁾.

Z-Phe₂-N₂H₃ (2): 4.6 g (10 mmol) Z-Phe₂-OMe (1)²⁹⁾ werden in wenig heißem Ethanol gelöst und mit 10 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 20 min Kochen unter Rückfluß wird über Nacht stehengelassen, das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit kaltem Ethanol und Ether gewaschen und i. Vak. über P₂O₅/KOH getrocknet. Ausb. 4.2 g (91%), Schmp. 198–201°C, [α]_D²⁵ = +2.4° (5% in DMF). DC: R_F A 0.78, B 0.62, C 0.93. — ¹H-NMR (DMSO): δ = 7.0–7.4 (m, 16H, NH-Phe¹ und Arom.); 7.96 (d, J = 8.3 Hz, NH-Phe²); 4.26 (M-Teil von ABMX, 1H, C₂H-Phe¹); 4.52 (M-Teil von ABMX, 1H, C₂H-Phe²); 2.54–3.12 (m, 4H, C₆H₂-Phe^{1,2}); 9.05 (s, breit, 1H, NHNH₂); die Protonen der NH₂-Gruppe tauschen relativ schnell mit Restwasser aus und werden nicht beobachtet.

C₂₆H₂₈N₄O₄ (460.5) Ber. C 67.81 H 6.13 N 12.16 Gef. C 68.00 H 5.97 N 12.25

Z-Phe₂-Gly₂-OMe (3): 1.93 g (4.22 mmol) 2 in 50 ml DMF werden bei –20°C nacheinander mit 2.09 ml (50.4 mmol) konz. Salzsäure und 3.06 ml (6.3 mmol) 14proz. wäßriger NaNO₂-Lösung versetzt. Nach 30 min Rühren bei –15°C wird mit 6.29 ml N-Ethylpiperidin neutralisiert und die neutralisierte Lösung von 1.2 g H-Gly₂-OMe·Tos (3.77 mmol) in 20 ml DMF zugegeben. Man läßt über Nacht bei 0°C rühren und anschließend auf Raumtemp. erwärmen. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. im Rotationsverdampfer wird mit 5proz. Citronensäure ausgefällt, gewaschen, getrocknet und über eine LH20-Säule mit DMF chromatographiert. Ausb. 2.0 g (93%), Schmp. 173–176°C, [α]_D²⁵ = –27.7° (2% in DMF). DC: R_F A 0.76, B 0.59, C 0.89. — ¹H-NMR (DMSO): δ = 7.0–7.4 (m, 15H, Arom.); 4.94 (s, 2H, Z-CH₂); 7.52 (d, J = 8.70 Hz, NH-Phe¹); 8.24 (d, J = 7.78 Hz, NH-Phe²); 8.25 (t) und 8.37 (t) (NH-Gly^{3,4}); 4.27 (M-Teil von ABMX, 1H, C₂H-Phe¹); 4.60 (M-Teil von ABMX, 1H, C₂H-Phe²); δ_A = 3.75, δ_B = 3.81 (AB von ABX, J_{AB} = 16.94, J_{AX} = J_{BX} = 5.95 Hz, 2H) und 3.89 (d, J = 5.95 Hz, 2H) (C₂H₂-Gly^{3,4}); ν_A = 2.66, ν_B = 2.93 (AB von ABMX, J_{AB} = 13.73, J_{AM} = 10.59, J_{BM} = 3.14 Hz, C₆H₂-Phe¹); ν_B = 3.08 (AB von ABMX, J_{AB} = 13.73, J_{BM} = 9.21, J_{BM} = 4.98 Hz, C₆H₂-Phe²); 3.62 (OCH₃).

C₃₁H₃₄N₄O₇ (574.6) Ber. C 64.80 H 5.96 N 9.75 Gef. C 64.90 H 5.87 N 9.94

Z-[α -D]Phe-Phe₂-Gly₂-OMe (4): 575 mg (1 mmol) 3 in 50 ml DMF werden in Gegenwart von 190 mg (1 mmol) p-Toluolsulfonsäure-monohydrat und 50 mg Katalysator (5% Pd auf Aktivkohle) über Nacht hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. auf 20 ml eingengt, bei –5°C mit 0.14 ml (1 mmol) N-Ethylpiperidin neutralisiert und anschließend unter Rühren nacheinander mit 4.10 mg (1.4 mmol) Z-[α -D]Phe-OH, 80 mg 1-Hydroxybenzotriazol und 200 mg DCC versetzt. Nach etwa 30 min bei ca. 0°C wird das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert, das Filtrat im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Nach Fällen

²⁷⁾ J. W. Thanassi, J. Org. Chem. **36**, 3019 (1971).

²⁸⁾ M. Oki, K. Suzuki, S. Tsuchida, T. Saito und H. Kotake, Bull. Chem. Soc. Jpn. **43**, 2554 (1970).

²⁹⁾ K. Blaha, Collect. Czech. Chem. Commun. **34**, 4000 (1969).

mit 5proz. Citronensäure und sorgfältigem Waschen wird in DMF aufgenommen und über eine LH20-Säule mit DMF chromatographiert. Ausb. 618 mg (85%), $[\alpha]_{25}^{578} = -33.4^\circ$ (1% in DMF). DC: R_F A 0.76, B 0.33, C 0.77. – $^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 6.9\text{--}7.4$ (m, 20 H, Arom.); 4.91 (s, Z-CH₂); 7.46 (s, NH-Phe¹); 8.31 (d, $J = 7.31$ Hz) und 8.08 (d, $J = 7.78$ Hz) (NH-Phe^{A,B}); 8.26 (t, NH-Gly^C); 8.24 (t, NH-Gly^D); 4.50–4.60 (M-Teile von ABMX, 2H, C₂H-Phe^{A,B}); $\delta_A = 3.73$, $\delta_B = 3.78$ (AB von ABX, $J_{AB} = 16.9$, $J_{AX} = 5.87$, $J_{BX} = 6.04$ Hz, C₂H₂-Gly^C); 3.87 (d, $J = 5.35$ Hz, C₂H₂-Gly^D); $\delta_A = 2.77$, $\delta_B = 3.00$ (AB von ABMX, $J_{AB} = 13.73$, $J_{AM} = 9.22$, $J_{BM} = 4.52$ Hz) und $\delta_A = 2.85$, $\delta_B = 3.06$ (AB von ABMX, $J_{AB} = 13.73$, $J_{AM} = 8.34$, $J_{BM} = 5.05$ Hz) (C_βH₂-Phe^{A,B}); 3.61 (OCH₃).

cyclo(-[α-D]Phe-Phe₂-Gly₂-) (7): 600 mg (0.83 mmol) **4** werden in 10 ml Methanol analog **2** zu **5** hydrazinolytisch. Nach Aufarbeiten wird mit 315 mg (1.66 mmol) *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat in Gegenwart von 100 mg Pd-Katalysator über Nacht hydriert (**6**). Die Cyclisierung erfolgte, wie bereits für die undeuterierte Verbindung beschrieben⁴). Ausb. 124.8 mg (27%), DC: R_F A 0.69, B 0.08, C 0.68. – $^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 8.49$ (s, NH-Phe¹); vgl. Abb. 1.

[190/77]