

## 29. Konformationsanalysen von Modell-Tripeptiden: Der Einfluss von $\alpha,\alpha$ -disubstituierten $\alpha$ -Aminosäuren auf die Sekundärstruktur

Teil II

### Röntgenstrukturanalyse und Konformationsenergie-Berechnungen

von Peter Wipf<sup>1)</sup>, Roland W. Kunz, Roland Prewo und Heinz Heimgartner\*

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich

(3.XII.87)

#### Conformational Analysis of Tripeptide Models: The Influence of $\alpha,\alpha$ -disubstituted $\alpha$ -Amino Acids on the Secondary Structure. X-Ray Analysis and Conformational Energy Calculations

The X-ray analysis of tripeptide Z-Ile-Val(2-Me)-benzocaine (**1f**) reveals the presence of a type-III  $\beta$ -turn. Moreover, MMP2 calculations on tripeptides, e.g. Z-Ile-Aib-benzocaine (**1c**), Z-Ile-D-Val(2-Me)-benzocaine (**1g**), Z-Ile-Gly(2,2-Pr<sub>2</sub>)-benzocaine (**1h**), Z-Ile-Gly-benzocaine (**1a**), and **1f**, fit well into the frame of NMR and CD investigations. They allow considerations on the relative stability of different types of  $\beta$ -turns depending on the peptide sequence, e.g. the kind of  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino-acid moieties.

Im Teil I dieser Arbeit [1] wurde die Sekundärstruktur einer Reihe von Modell-Tripeptiden vom Typ **1** (Fig. 1) aus <sup>1</sup>H-NMR- und CD-Messungen hergeleitet. Neben diesen spektroskopischen Verfahren wurden zur Bestimmung der Sekundärstruktur vor allem Konformationsenergie-Berechnungen verwendet. Die Struktur von **1f** im Festkörper konnte zudem durch eine Röntgen-Kristallstrukturanalyse gesichert werden.

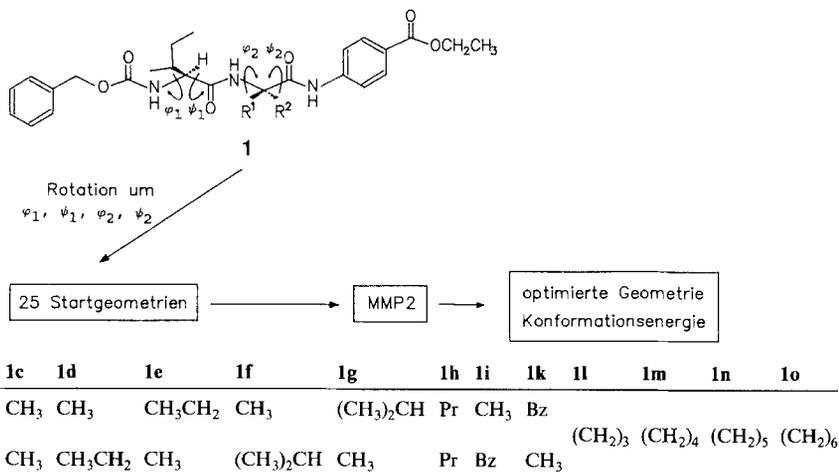
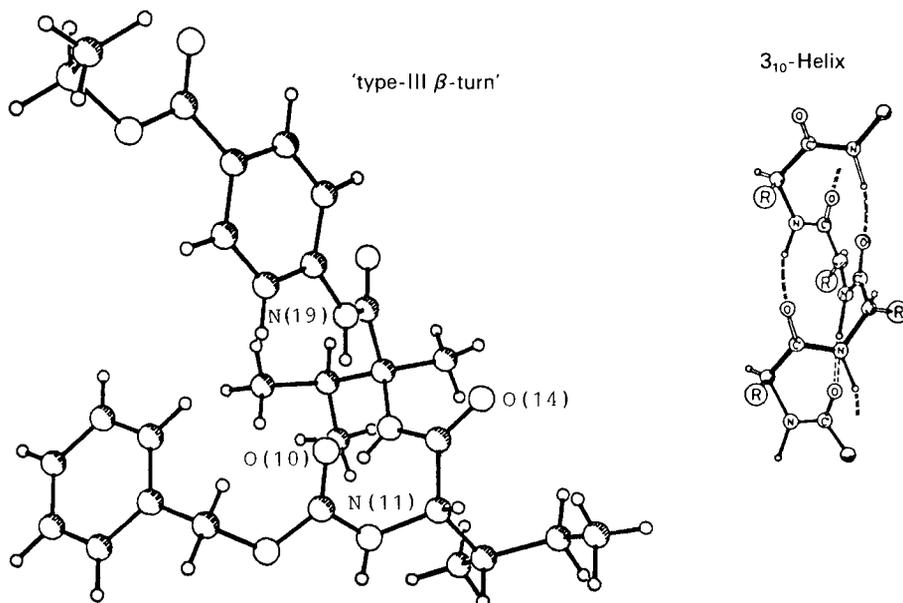


Fig. 1. Modell-Tripeptide Z-Ile-AS-Benzocain **1** und Berechnung der energieärmsten Konformation

<sup>1)</sup> Teil der Dissertation von P. W., Universität Zürich, 1987.

Z-Ile-Val(2-Me)-Benzocain (**1f**)Fig. 2. Projektion der Molekülstruktur von **1f** im Kristall

**1. Röntgen-Kristallstrukturbestimmung von 1f<sup>2)</sup>.** – Die Intensitätsmessungen wurden auf einem Nicolet-R3-Vierkreisdiffraktometer bei ca.  $-140^\circ$  mit  $\text{MoK}_\alpha$ -Strahlung ( $\omega$ -scan) bis  $2\theta$  (max) =  $75^\circ$  durchgeführt. Die Intensitäten der Reflexe wurden den üblichen Korrekturen unterworfen; auf eine Absorptionskorrektur wurde verzichtet. Die Strukturaufklärung durch direkte Methoden und die Verfeinerungen erfolgten mit dem Programmsystem SHELXTL 4.1 [2]. Alle H-Atome wurden durch Differenzelektronendichteberechnungen lokalisiert. Sie wurden mit isotropen, die übrigen Atome mit anisotropen Temperaturfaktoren bis zu einem  $R$ -Wert von 0,072 ( $R_w = 0,064$ ) verfeinert. In einer geblockten Kaskadenverfeinerung (mit ca. 100 Variablen/Block) wurden die 499 Variablen unter Einschluss aller 8225 symmetrie-unabhängigen Reflexe zur vollständigen Konvergenz gebracht (Gewichtsschema  $1/w = \sigma^2(F) + 0,0009F^2$ ).

**Kristalldaten.** Farblose Kristalle aus  $\text{Et}_2\text{O}$  bei  $-20^\circ$ , Formel in der asymmetrischen Einheit  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6$ ,  $\text{MG} = 525,65$ . Orthorhombische Raumgruppe  $P2_12_12_1$ ; Gitterkonstanten<sup>3)</sup>:  $a = 10,341(1)$ ,  $b = 11,559(1)$ ,  $c = 23,847(2)$  Å;  $V = 2850,3$  Å<sup>3</sup>.

Die Röntgenstrukturanalyse von **1f** bestätigte die bereits aufgrund des CD-Spektrums postulierte stabile Konformation. Bei der Sekundärstruktur, die das Tripeptid im Kristall annimmt, handelt es sich um den in Fig. 2 gezeichneten Ausschnitt aus einer  $3_{10}$ -Helix, einen 'type-III  $\beta$ -turn' (vgl. dazu z. B. [3]).

Das Anilid-NH (Temperatur-Koeffizient  $d\delta/dT = -1,0 \times 10^{-3}$  ppm/ $^\circ$ ) ist an einer intramolekularen H-Brücke zur Urethan-Carbonylgruppe beteiligt (N(19)–O(10) = 3,12 Å). Das Amid-NH, das ebenfalls einen relativ niedrigen Temperatur-Koeffizienten aufweist ( $d\delta/dT = -1,6 \times 10^{-3}$  ppm/ $^\circ$ ), wird durch die Me- und die (i-Pr)-Seitenkette abge-

<sup>2)</sup> Die Atomkoordinaten wurden beim Cambridge Crystallographic Data Centre, University Chemical Laboratory, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, England, deponiert.

<sup>3)</sup> Zur Berechnung wurden 104 automatisch zentrierte Reflexe einer Hemisphäre mit  $40^\circ < |2\theta| < 45^\circ$  verwendet,  $\lambda = 0,71069$  Å.

Tab. 1.  $\varphi/\psi$ -Werte von **1f** aus der Röntgenstruktur. In Klammern sind die durchschnittlichen  $\varphi/\psi$ -Werte eines 'type-III  $\beta$ -turns' [4] angegeben.

$\varphi_1$	$\psi_1$	$\varphi_2$	$\psi_2$
$-65,5^\circ$ ( $-60^\circ$ )	$-31,0^\circ$ ( $-30^\circ$ )	$-67,1^\circ$ ( $-60^\circ$ )	$-12,1^\circ$ ( $-30^\circ$ )

schirmt, und das Urethan-NH ( $d\delta/dT = -3,2 \times 10^{-3}$  ppm/°) ist an einer intermolekularen H-Brücke (N(11)–O(14) = 2,96 Å) zur Ile-Carbonylgruppe eines zweiten Peptids beteiligt. In Tab. 1 sind die für einen 'type-III  $\beta$ -turn' charakteristischen Torsionswinkel (s. Fig. 1) von **1f** aufgeführt.

**2. Konformationsenergie-Berechnungen.** – Strukturen und thermodynamische Eigenschaften organischer Moleküle können mittels eines 'force-field'- oder 'molecular-mechanics'-Ansatzes ermittelt werden [5].

In solchen Berechnungen werden, ausgehend von einer vorgegebenen Verknüpfung der Atome innerhalb des Moleküls, die intramolekularen Kräfte mit dem Ziel der Rekonstruktion der Energie-Hyperfläche in Modellkräfte zerlegt (Deformation von Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkeln; *van-der-Waals*-, Dipol-Dipol- und elektrostatische Wechselwirkungen sowie bestimmte Kreuzterme). Die Summe dieser Beiträge wird minimiert, während der dem Molekül freistehende konformationelle Raum abgesucht wird.

Die Methode hat sich als sehr erfolgreich erwiesen und hat eine breite Verwendung gefunden [6] [7]. Gegenwärtige Anstrengungen zielen auf eine Ausweitung solcher Simulationen auf den Bereich von Polypeptiden und globulären Proteinen [8].

Die Suche nach dem Energie-Minimum von Peptiden wird durch das Problem der multiplen Minima beträchtlich erschwert (auf der Energie-Hyperfläche liegen eine grössere Anzahl von Minima mit ähnlicher Energie; vgl. [9]). Bei kleineren Peptiden ist es praktisch noch realisierbar, den konformationellen Raum punktweise abzutasten.

Als Ausgangspunkt für die Konformationsenergie-Berechnungen der Verbindungen **1c**, **1f**, **1g**, **1h** und **1a** (s. Fig. 1) wurden für jedes Peptid je 25 Startgeometrien erzeugt, die eine möglichst breite Erfassung der Energie-Hyperfläche der zentralen Dipeptid-Substruktur gewährleisten sollten (vgl. [10]). Diese Startgeometrien unterscheiden sich im wesentlichen durch die Torsionswinkel  $\varphi_1$ ,  $\psi_1$ ,  $\varphi_2$ ,  $\psi_2$  in **1**, denen die Werte  $\pm 60^\circ$  (alle Kombinationen) sowie die von Chou und Fasman [4] zur Definition der klassischen ' $\beta$ -turns' angegebenen Werte zugeordnet wurden. Ausgehend von diesen Startgeometrien wurde mit dem 'force-field'-Programm MMP2 [11] in allen Koordinaten optimiert und die Konformationsenergie des nächstgelegenen Minimums berechnet (Fig. 1).

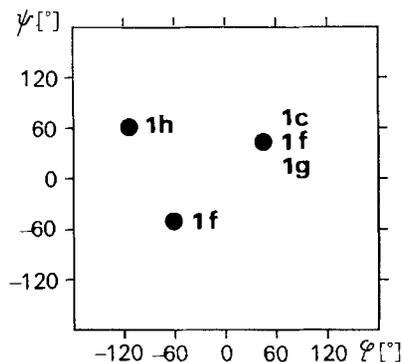


Fig. 3. Ramachandran-Diagramm für die disubstituierten Aminosäuren in **1**

Tab. 2. Minimal-Energie-Konformationen von Tripeptiden des Typs Z-Ile-AS-Benzocain 1<sup>a)</sup>

Verbindung	$\varphi_1$	$\psi_1$	$\varphi_2$	$\psi_2$	$\Delta E$	Typ <sup>b)</sup>
Z-Ile-Gly-Benzocain (1a)	-64	-40	-117	58	0	I <sup>c)</sup>
	-70	122	50	49	0,1	II
	-64	-41	-79	-55	0,6	III
Z-Ile-Aib-Benzocain (1c)	-70	126	47	47	0	II
	-65	-39	-117	54	1,0	I <sup>c)</sup>
	-67	-49	-71	-50	1,4	III
Z-Ile-Val(2-Me)-Benzocain (1f)	-76	117	49	53	0	II <sup>c)</sup>
	-77	-45	-62	-49	0,1	III
	39	68	59	57	1,7	III'
Z-Ile-D-Val(2-Me)-Benzocain (1g)	-74	131	44	39	0	II
	-114	58	48	40	1,8	IV
	-53	-46	43	41	2,1	IV
Z-Ile-Gly(2,2-Pr <sub>2</sub> )-Benzocain (1h)	-68	-35	-113	57	0	I <sup>c)</sup>
	-84	119	50	51	0,6	II <sup>c)</sup>
	-60	-38	-57	-51	1,3	III

a) Die Energien sind in kcal/mol angegeben. Nur die drei Konformationen mit den tiefste Energien bezogen auf die jeweiligen Minimum-Energie-Konformationen sind aufgeführt.

b) Die Typenbezeichnungen beziehen sich auf die jeweiligen ' $\beta$ -turns'.

c) Konformationen, die in einem einzigen Torsionswinkel um mehr als 50° von den idealen Werten abweichen [4].

Die Daten der Konformationen mit tiefster Energie sind in Tab. 2 aufgeführt. In Fig. 3 ist zudem ein *Ramachandran*-Diagramm [12] [13] mit den Torsionswinkeln  $\varphi$  und  $\psi$  der disubstituierten Aminosäuren aufgezeichnet. Beim Aib- und noch ausgeprägter beim D-Val(2-Me)-Derivat **1c** bzw. **1g** entspricht die Konformation mit minimaler Energie einem leicht verzerrten 'type-II  $\beta$ -turn', für den nach [4] die Torsionswinkel  $\varphi_1 = -60^\circ$ ,  $\psi_1 = 120^\circ$ ,  $\varphi_2 = 80^\circ$  und  $\psi_2 = 0^\circ$  ideal wären. Die Verzerrung bedingt, dass sich keine stabile intramolekulare H-Brücke ausbilden kann, was im Einklang mit den NMR-Temperaturkoeffizienten der Amid-Protonen (s. [1]) steht. Die Torsionswinkel für die disubstituierten Aminosäuren nehmen somit Werte an, die typisch für die  $\alpha$ -Helix sind und in einem Bereich des *Ramachandran*-Diagramms liegen, der für L-Aminosäuren verboten und für D-Aminosäuren erlaubt ist (Fig. 3).

Bemerkenswert ist auch, dass beim D-Val(2-Me)-Derivat **1g** dieser 'type-II  $\beta$ -turn' in bezug auf die nächsthöhere Konformation energetisch noch deutlich stärker stabilisiert ist als beim Aib-Derivat **1c**. Die Resultate der Konformationsberechnung werden dadurch bestätigt, dass nach Röntgenstrukturanalysen die Aib-haltigen Peptide Boc-Ala-Aib-Ala-OMe [14] und Ac-Ala-Aib-Ala-OMe [15] im Kristall ebenfalls in einem verzerrten 'type-II  $\beta$ -turn' vorliegen und deren CD-Spektren eine sehr grosse Ähnlichkeit mit den für **1c** und **1g** gemessenen aufweisen, jedoch völlig unterschiedlich von demjenigen des Tripeptids Boc-Gly-Ala-Aib-OMe [16] sind, das im Kristall einen 'type-III  $\beta$ -turn' einnimmt.

Bei **1f** liegt der 'type-II  $\beta$ -turn' zwar auch noch in einem Energie-Minimum, der 'type-III  $\beta$ -turn', der beim Aib-Derivat **1c** noch um 1,4 kcal/mol und beim D-Val(2-Me)-Derivat **1g** um 3 kcal/mol weniger stabil war, ist jedoch nahezu energiegelich. Der 'type-III  $\beta$ -turn' hat zudem praktisch ideale Torsionswinkel für eine stabile intramoleku-

lare H-Brücke, deren zusätzlicher stabilisierender Effekt bei der verwendeten Version des MMP2 nur unvollständig berücksichtigt wird.

Nach Röntgenstrukturanalysen von Gly(2,2-Pr<sub>2</sub>)-Homooligopeptiden sowie spektroskopischen und theoretischen Untersuchungen sollte Gly(2,2-Pr<sub>2</sub>) im Gegensatz zu Aib keine gewinkelte, sondern eine ausgestreckte, eine sog. 'extended' oder C<sub>s</sub>-Struktur bevorzugen [17–20].

Die MMP2-Berechnungen liefern als Resultat für Z-Ile-Gly(2,2-Pr<sub>2</sub>)-Benzocain (**1h**) tatsächlich einen nicht idealen 'type-I β-turn' mit einer Kombination von Torsionswinkeln für Gly(2,2-Pr<sub>2</sub>), die im Gegensatz zu Aib oder Val(2-Me) im Bereich der (ausgestreckten) β-Faltblatt-Struktur liegen (vgl. Fig. 3). Bereits die NH-Temperaturkoeffizienten sowie das CD-Spektrum deuteten in diese Richtung. Die lineare Verlängerung der Seitenketten symmetrisch dissubstituierter Aminosäuren induziert eine lokale Symmetrisierung der Struktur. Dabei gehen die Seitenketten eine Vielzahl von sterischen Wechselwirkungen ein, die mit steigender Kettenlänge immer weiter in das Molekül hinaus reichen. Die durch die symmetrische Disubstitution bereits vorgegebene Begünstigung einer lokalen C<sub>s</sub>-Symmetrie wird damit verstärkt, d. h. die ausgestreckte Struktur relativ zu den gewinkelten Konformationen stabilisiert. Der 'type-II β-turn' ist nur wenig destabilisiert, und die Torsionswinkel des Ile-Restes liegen immer noch im α-helicalen Bereich. Der Übergang von einem 'β-turn' zur β-Faltblatt-Struktur ist somit für solche Moleküle leicht möglich und könnte die beobachtete Lösungsmittelabhängigkeit des CD-Spektrums von **1h** erklären.

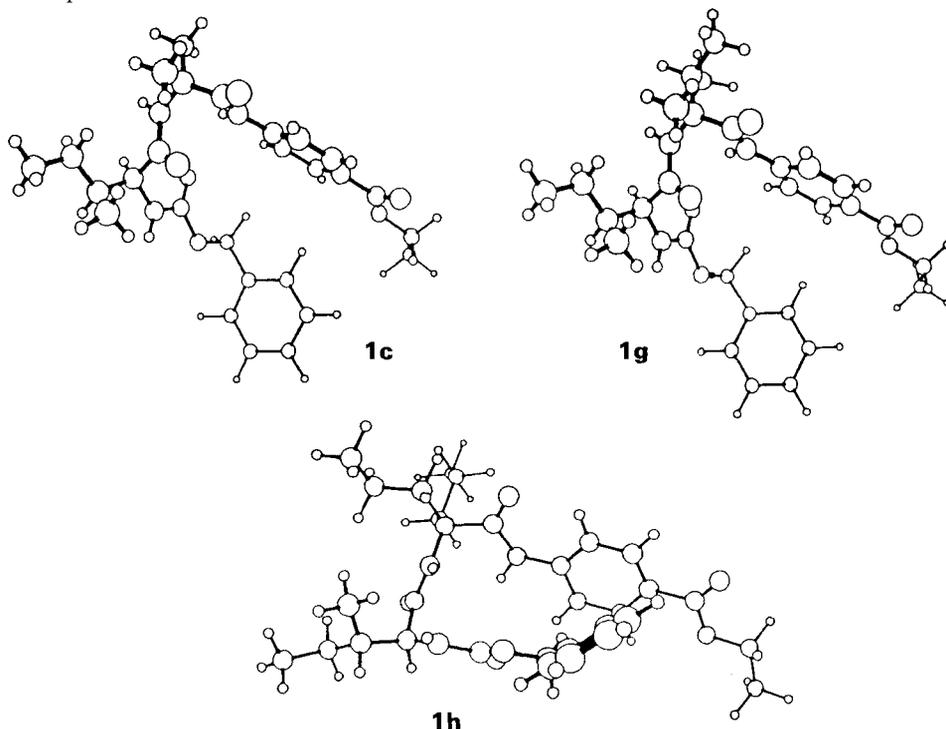


Fig. 4. MMP2-optimierte Geometrien mit minimaler Energie für **1c**, **1g** und **1h**

In *Fig. 4* sind die Strukturen, die den für **1c**, **1q** und **1h** berechneten Energie-Minima entsprechen, abgebildet. Die Energie-Hyperfläche des konformationellen Raumes des Gly-Derivates **1a** wurde zum Vergleich mit den Tripeptiden **1c**, **1q** und **1h** ebenfalls untersucht. Die Konformationsenergien der verschiedenen ' $\beta$ -turn'-Typen liegen hier erwartungsgemäss nahe beieinander, und auch die Energie-Differenzen zu andern Minima sind nur gering. Die Energie-Hyperfläche ist bei **1a** vergleichsweise wenig strukturiert.

Die Übereinstimmung der Daten aus der Computeranalyse der Modell-Tripeptide **1** mit den experimentellen Beobachtungen (CD-Spektren, NH-Temperaturkoeffizienten) ist sehr befriedigend. Insbesondere die relative Stabilisierung bzw. Destabilisierung verschiedener Typen von ' $\beta$ -turns' in Abhängigkeit der Aminosäure-Sequenz erlaubt grundlegende Rückschlüsse auf das Konformationsverhalten  $\alpha,\alpha$ -disubstituierter  $\alpha$ -Aminosäuren (s. [1]).

#### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* S. Teil I dieser Arbeit [1]; zur Synthese von **1** s. [21]. Abkürzungen gemäss IUPAC/IUB-Kommission [22]; Aib = 2-Methylalanin (= 2-Aminoisobuttersäure), Gly(2,2-Pr<sub>2</sub>) = 2,2-Dipropylglycin, Val(2-Me) = 2-Methyl-L-valin ((2*S*)-Konfiguration), D-Val(2-Me) = 2-Methyl-D-valin ((2*R*)-Konfiguration).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. Wipf, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 258.
- [2] G. M. Sheldrick, SHELXTL, an Integrated System for Solving, Refining, and Displaying Crystal Structures from Diffraction Data, Version 4.1, 1983.
- [3] C. Toniolo, G. Valle, G. M. Bonora, M. Crisma, F. Formaggio, A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, *Biopolymers* **1986**, *25*, 2237; R. Bardi, A. M. Piazzesi, C. Toniolo, P. A. Raj, S. Raghothama, P. Balaram, *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8*, 201, und dort zit. Lit.
- [4] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* **1977**, *115*, 135.
- [5] U. Burkert, N. L. Allinger, 'Molecular Mechanics', ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington D. C., 1982.
- [6] T. Clark, 'A Handbook of Computational Chemistry', Wiley, New York, 1985.
- [7] A. Karlen, A. M. Johansson, L. Kenne, L. E. Arvidsson, U. Hackseil, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 917; P. E. Peterson, R. L. Breedlove Leflew, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1948.
- [8] H. A. Scheraga, *Biopolymers* **1983**, *22*, 1; G. H. Paine, H. A. Scheraga, *ibid.* **1986**, *25*, 1547.
- [9] F. Maser, K. Bode, V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Adv. Polymer Sci.* **1984**, *65*, 177.
- [10] S. S. Zimmerman, H. A. Scheraga, *Biopolymers* **1977**, *16*, 811.
- [11] N. L. Allinger, Y. Yuh, C. J. Tai, J. T. Sprague, *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 581.
- [12] G. N. Ramachandran, V. Sasikharan, *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 282; C. M. Venkatachalan, G. N. Ramachandran, *Ann. Rev. Biochem.* **1969**, *38*, 45.
- [13] H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, 'Aminosäuren, Peptide, Proteine', Verlag Chemie, Weinheim, 1982, S. 420.
- [14] R. Bosch, G. Jung, K.-P. Voges, W. Winter, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1117.
- [15] G. Jung, H. Brückner, R. Bosch, W. Winter, H. Schaal, J. Strähle, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1096.
- [16] R. Bosch, G. Jung, W. Winter, *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 1322.
- [17] E. Benedetti, C. Toniolo, P. Hardy, V. Barone, A. Bavoso, B. di Blasio, P. Grimaldi, F. Lejl, V. Pavone, C. Pedone, G. M. Bonora, I. Lingham, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8146.
- [18] V. Barone, F. Lejl, A. Bavoso, B. di Blasio, P. Grimaldi, V. Pavone, C. Pedone, *Biopolymers* **1985**, *24*, 1759.
- [19] A. Bavoso, E. Benedetti, B. di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, in 'Peptides, Structure and Function, Proceedings of the 9th American Peptide Symposium', Eds. C. M. Deber, V. J. Hruby und K. D. Kopple, Pierce, Rockford, 1985, S. 193.
- [20] G. M. Bonora, C. Toniolo, B. di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, E. Benedetti, I. Lingham, P. Hardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8152.
- [21] P. Wipf, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 140; *ibid.* **1987**, *70*, 354; *ibid.* **1986**, *69*, 1153.
- [22] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595.