

SIGNALZUORDNUNG IN  $^{13}\text{C}$ -NMR-SPEKTREN VON OLIGOPEPTIDEN UND SEQUENZ-  
BESTIMMUNG MIT HILFE VON  $\text{Pr}(\text{ClO}_4)_3$  ALS VERSCHIEBUNGSREAGENS

E. Bayer und K. Beyer

Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen

D 74 Tübingen-1, Auf der Morgenstelle

(Received in Germany 24 January 1973; received in UK for publication 26 February 1973)

NMR-Verschiebungsreagenzien finden zunehmende Verbreitung zur Lösung von Strukturproblemen. Die gebräuchlichen Lanthanidverschiebungsreagenzien sind wasserunlöslich und können daher bei Peptiden keine Anwendung finden, obwohl im Prinzip Aussagen über die Sequenzzuordnung mit Hilfe von Verschiebungsreagenzien möglich sein sollten.

Es ist nun bekannt, daß Lanthanide in wässriger Lösung bevorzugt mit Carboxylgruppen Komplexe bilden und - bei Abwesenheit eines Chelateffekts - weniger mit Amino-, Keto- und Hydroxylgruppen<sup>1</sup>. Hart, Moss und Staniforth haben dies bestätigt bei der Anwendung des Pr(III)-aquokomplexes als Verschiebungsreagens für Carbonsäuren<sup>2</sup>.

Wir untersuchten nun, ob sich Pr(III)-perchlorat als Verschiebungsreagens zur Sequenzbestimmung bei Peptiden, besonders zur Feststellung der C-terminalen Aminosäure, eignet. Es ist hierbei günstiger, die Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanzsignale zu messen.

Die Messungen wurden mit einem Bruker HFX-90-Spektrometer durchgeführt. Zur Fourier-Transformation des Pulsinterferogramms wurde ein PDP-8 Computer verwendet. Alle Proben wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst, dessen Deuteriumsignal zur Stabilisierung des Feld/Frequenz-Verhältnisses diente.

Abb. 1 zeigt das  $^{13}\text{C}$ -PFT-Spektrum des Glycyl-L-Alanins ohne und mit  $\text{Pr}(\text{ClO}_4)_3$ . Das Signal des C-terminalen Carboxylkohlenstoffs wird nach hohem Feld, alle anderen

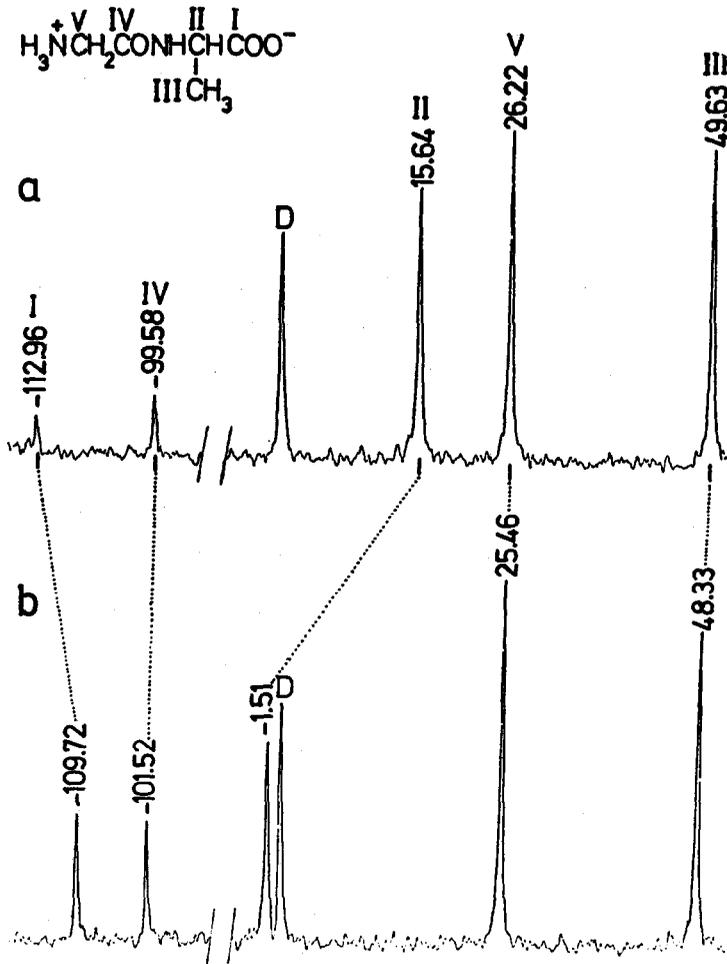


Abb. 1: 22.63 MHz PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR von Glycyl-L-Alanin,  
 $^1\text{H}$ -Breitbandenkoppelt. 1mM/3ml  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 3.4, 25°C. In-  
 terner Standard Dioxan. a) Ohne b) mit Praseodymperchlorat,  
 Konzentrationsverhältnis Pr/Dipeptid 0.86.  
 (Alle Pr-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt<sup>8</sup>.)

Signale nach tiefem Feld verschoben. Bei den in Abb. 1 genannten Konzentrationsverhältnissen ist keine Signalverbreiterung beobachtbar. Der Verschiebungseffekt ist für das Alanin- $\alpha$ -C-Atom besonders groß. Das legt den Schluß nahe, daß alle  $^{13}\text{C}$ -Signale außer dem des Carboxylkohlenstoffs reine Pseudokontaktverschiebungen erfahren<sup>3</sup>. Eine Komplexbildung dürfte daher ausschließlich mit dem C-terminalen Ende des Peptids eintreten. Das

stimmt mit Beobachtungen von McDonald und Phillips an Co-Histidin-Komplexen bei pH 1-3,5 überein<sup>4</sup>. Daß die Peptidbindung nicht bei der Komplexbildung beteiligt ist, zeigt auch die pH-Abhängigkeit der <sup>13</sup>C-Signalverschiebungen in Abb. 2. Bei der Protonierung der Carboxylgruppe verschiebt sich das Alanyl-C- $\alpha$ -Signal des Glycyl-L-Alanins nach höherem Feld, ein Effekt, der der entsprechenden Verschiebung des  $\alpha$ -Protons im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum entgegengesetzt ist<sup>5</sup>. Dieser Sprung in der chemischen Verschiebung am Äquivalenzpunkt (pH 3,15) ist auch in Gegenwart von Pr(ClO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> zu beobachten. Bei pH 0,4 verschwindet

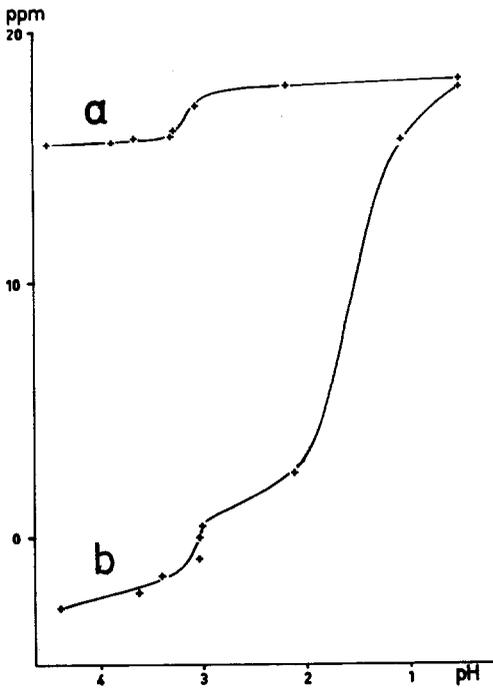


Abb. 2: pH-Abhängigkeit der <sup>13</sup>C-Verschiebung des Alanin-C- $\alpha$ -Signals von Glycyl-L-Alanin gegen internes Dioxan. a) Ohne b) mit Praseodymperchlorat, Konzentrationsverhältnis Pr/Dipeptid 1. 71. T 25° C.

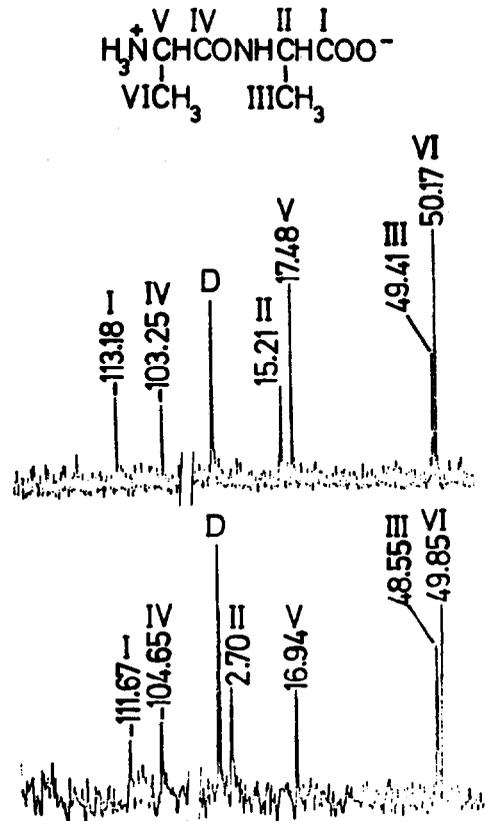


Abb. 3: Zuordnung der <sup>13</sup>C-Signale von L-Alanyl-L-Alanin. 0,5 mM Alanylalanin + 0,12 mM Pr(III) in 3 ml D<sub>2</sub>O, pH 5,1, T 25° C. Standard Dioxan.

die Pseudokontaktverschiebung für alle C-Atome vollständig, es wird also kein Komplex mehr gebildet.

Aus diesen Experimenten folgt, daß die Pseudokontaktverschiebung ein gutes Hilfsmittel zur  $^{13}\text{C}$ -Signalzuordnung ist. Abb. 3 zeigt die Zuordnung für das Spektrum des L-Alanyl-L-Alanins, bei dem die Off-Resonance-Entkopplungstechnik nicht zum Ziel führt.

Diese Methode eignet sich demnach hervorragend zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäure eines wasserlöslichen Oligopeptids. Auch bei der nächstfolgenden Aminosäure ist die Verschiebung noch deutlich bemerkbar. Der Vorteil der "Verschiebungsmethode" liegt gegenüber anderen Methoden darin, daß das Peptid nicht abgebaut und auch nicht langwierig derivatisiert werden muß.

Bei den von uns untersuchten Peptiden (Diglycin, Triglycin, Alanylglycin, Glycylalanin, Alanylalanin) zeigt sich auch bei einem Verhältnis von Pr zu Substrat  $> 1$  noch keine Sättigung des Verschiebungseffektes, wie dies schon früher bei Nucleotiden<sup>6</sup> und Carbonsäuren<sup>2</sup> beobachtet wurde. Offenbar ist der Komplex nur relativ wenig stabil.

Berechnungen von molekülinternen, mittleren Abständen und Winkeln unter der Voraussetzung reiner Pseudokontaktwechselwirkung sind schon am Beispiel von Nucleotiden in wässrigem Medium durchgeführt worden<sup>6</sup>. Eine analoge Rechnung am Beispiel des Glycyl-L-Alanins zeigt, daß das Metallion in der O-C-O-Ebene der Carboxylgruppe liegen sollte<sup>7</sup>.

#### Literatur

1. T. Moeller, D. F. Martin, L. C. Thompson, R. Ferrus, G. R. Feistel und W. J. Randall, Chem. Rev., **65**, 1 (1965).
2. F. A. Hart, G. P. Moss und M. L. Staniforth, Tetrahedron Letters, **37**, 3389 (1971).
3. H. M. McConnel und R. E. Robertson, J. Chem. Phys., **29**, 1361 (1958).
4. C. C. McDonald und W. D. Philips, J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3736 (1963).
5. W. J. Horsley und H. Sternlicht, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 3738 (1968).
6. C. D. Barry, A. C. T. North, J. A. Glasel, R. J. P. Williams und A. V. Xavier, Nature, **232**, 236 (1971).
7. K. Beyer, Diss. Tübingen 1973
8. L. Holleck und L. Hartringer, Angew. Chem., **67**, 648 (1955).