

# <sup>13</sup>C-NMR UND KONFORMATION EINES MEMBRAN-MODIFIZIERENDEN SYNTHETISCHEN NONA-DEKAPEPTID-ANALOGONS VON ALAMETHICIN UND SEINER ZWISCHENSTUFEN

RAYMOND OEKONOMOPULOS und GÜNTHER JUNG

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen, West Germany

und

DIETER LEIBFRITZ

Fachbereich Chemie der Universität Bremen, NW 2, Leobener Straße, D-2800 Bremen 33, West Germany

(Received in Germany 7 October 1981)

**Abstract**—The <sup>13</sup>C-NMR spectra of the synthetic membrane modifying nonadecapeptide Boc-(Aib-L-Ala)<sub>5</sub>-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Aib = α-aminoisobutyric acid), and of synthetic intermediates were used for conformational analysis in solution. The assignments of the <sup>13</sup>C-NMR signals of Aib are based on the magnetic nonequivalence (MNE) of the geminal C<sub>β</sub>-signals in asymmetric environment resulting in a shift difference of 0.2–0.5 ppm due to neighbouring chiral residues. More than 4 ppm MNE are observed due to α-helical conformation and about 2.5 ppm for Aib situated in the corners of a rigid β-turn. The Ala-C<sub>α</sub> signal is also sensitive to different secondary structures. The C<sub>α</sub> signal for C-terminal alanine is found at 49–50 ppm, and for alanine within unordered oligopeptides it absorbs at 50–51 ppm. α-Helical environment shifts the Ala-C<sub>α</sub> signal to lower field down to 54 ppm. In methanolic solution the nonadecapeptide shows a α-helical N-terminal region. For the C-terminus beginning with proline-14 no periodically ordered conformation is observed, and we suggest a sequence of β-turns. Furthermore the typical *E/Z* isomerism of the prolyl-peptide bond can be observed on proline itself and on its neighbour alanine.

**Zusammenfassung**—Die <sup>13</sup>C-NMR-Spektren des synthetischen, membranmodifizierenden Nonadekapeptids Boc(Aib-L-Ala)<sub>5</sub>-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Aib = α-Aminoisobuttersäure) und seiner Synthesezwischenstufen werden zur Konformationsaufklärung in Lösung herangezogen. Die Zuordnung der <sup>13</sup>C-Signale von Aib basiert u.a. auf der magnetischen Nichtequivalenz (MNE) ihrer geminalen C<sub>β</sub>-Signale in asymmetrischer chemischer Umgebung, die bei optisch aktiver benachbarter Aminosäure zu einer Aufspaltung um 0.2–0.5 ppm führen kann. In α-helikaler Umgebung zeigen Aib-C<sub>β</sub> eine MNE von über 4 ppm, bei Aib in den Ecken von β-Turns beträgt die MNE bis zu 2.5 ppm. Ferner erwies sich Ala-C<sub>α</sub> als empfindlicher Indikator für unterschiedliche Sekundärstrukturen. Dabei liegt das C<sub>α</sub>-Signal für C-terminales Alanin bei 49–50 ppm und innerhalb von Oligopeptiden in ungeordneter Konformation bei 50–51 ppm. In α-helikaler Umgebung verschiebt sich das Ala-C<sub>α</sub>-Signal nach tiefem Feld bis über 54 ppm. Das Nonadekapeptid weist im N-terminalen Bereich in methanolischer Lösung eine α-helikale Konformation auf, während der C-Terminus ab Pro-14 keine periodisch geordnete Konformation, sondern vermutlich β-Turns besitzt. Ferner wurde eine Signalaufspaltung durch *E/Z*-Isomerie der Prolyl-Peptidbindung an Prolin selbst und am benachbarten Alanin festgestellt.

Die <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie erwies sich bei der Strukturklärung der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin,<sup>1–3</sup> Suzukacillin<sup>4,5</sup> und Trichotoxin<sup>6</sup> als ausserordentlich hilfreich. Dabei fiel in den <sup>13</sup>C-NMR-Spektren die magnetische Nichtäquivalenz (MNE) der beiden β - Methyl - Signale in den α-Aminoisobuttersäure (Aib)-Resten auf, die in kleineren Aib-Peptiden nicht bzw. nur in geringem Ausmass beobachtet wurde.<sup>7</sup> Zur Ermittlung der chemischen Verschiebung der Bausteine Alanin und α-Aminoisobuttersäure konnten u.a. die durch <sup>13</sup>C {<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H} - Tripelresonanz - Technik erhaltenen Spektren der mit Polyoxyethylen (POE) veresterten Oligopeptide Boc - (Aib - L - Ala)<sub>n</sub> - OPOE und H - (Aib - L - Ala)<sub>n</sub> - OPOE (n = 1 bis 5) herangezogen werden.<sup>8</sup> Während der stufenweisen Synthese dieser polyoxyethylenveresterten Peptide erhält man mit jeder Verlängerung der Peptidkette eine sukzessive Änderung der Konformation.<sup>9,10</sup> Dabei werden die Aib-C<sub>α</sub>-Signale und die Ala-C<sub>β</sub>-Signale nur relativ schwach beeinflusst. Andererseits zeigen die Ala-C<sub>α</sub>-Atome in α-helikaler Umgebung eine deutliche Tieffeldverschiebung. Besonders auffallend sind die Signale der beiden CH<sub>3</sub>-Gruppen in Aib, die bei Di- und Tripeptiden und uneingeschränk-

ter Rotationsfreiheit (ψ, Ψ) oft zusammenfallen bzw. nur wenig aufspalten (0–0.5 ppm), dagegen bei chiraler Umgebung und stabiler Konformation eine MNE von 0.5 bis 4 ppm aufweisen.<sup>7</sup>

## <sup>13</sup>C-NMR-Spektren helikaler Aib-Peptide

Besonders stark spalten die Aib-C<sub>β</sub> durch elektrische Feldeffekte des Helixdipols auf. Mit zunehmender Helixausbildung bis zum Dekapeptid lässt sich eine beträchtliche Verschiebung des gesamten Carbonyl - Signal - Bereiches zu tiefem Feld bis 178.8 ppm beobachten, wie dies für zunehmend stärkere Wasserstoffbrücken zu erwarten ist. Im Falle des Pentapeptids Boc - L - Ala - (Aib - Ala)<sub>2</sub> - OPOE konnten wir feststellen, dass die Aib - C<sub>β</sub> - Signale noch um den vergleichsweise geringen Betrag von 1.8 ppm und über den gesamten Aib - C<sub>β</sub> - Aufspaltungsbereich verteilt sind. Dagegen erfolgt bei den bereits über einen signifikanten α-Helixanteil verfügenden Peptid-Polymer-Estern Boc - L - (Aib - Ala)<sub>4</sub> - OPOE und Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OPOE eine Aufspaltung der Aib - C<sub>β</sub> - Signale um 3.5 ppm bzw. 3.2 ppm. Die Aufspaltung in Alamethicin liegt bei 3.5 ppm<sup>1</sup> und weist ebenso wie die oben

beschriebenen helikalen Peptide je eine  $C_{\beta}$ -Signalgruppe gleicher Intensität bei hohem und tiefem Feld auf. Dieselbe Übereinstimmung wird auch zwischen den Ala -  $C_{\alpha}$  - Signalen der obigen Nona- bzw. Dekapeptide mit 53.5 ppm bzw. 53.8 ppm und Alamethicin mit 53.4 ppm gefunden. Diese Tieffeldlage von Ala- $C_{\alpha}$  ist charakteristisch für Alanin in helikaler Umgebung. Sie unterscheidet sich um 2-3 ppm von den Verschiebungen der terminalen Alaninreste mit 50.9 ppm im Nonapeptid bzw. 51.0 ppm im Dekapeptid. Für C-terminales Alanin mit Esterschutzgruppen wird andererseits ein etwas hochfeldverschobenes Ala -  $C_{\alpha}$  - Signal zwischen 49 und 50 ppm gefunden.

Auch bei den N-protonierten Peptid-Polymerestern<sup>8,9-11</sup> ergaben sich neben der Tendenz der zunehmenden Tieffeldverschiebung der Ala -  $C_{\alpha}$  - Signale bei der Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix vor allem bei den Aib -  $C_{\beta}$  - Signalen gewisse Gesetzmäßigkeiten. So liegen z.B. die Methylsignale bei Peptiden mit N-terminal protonierter  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure stets bei höherem Feld als bei vergleichbaren Peptiden mit N-terminal protoniertem Alanin. Ferner zeigte sich beim protonierten Nonapeptid, dass trotz einer Aib -  $C_{\beta}$  - Signalaufspaltung über einen Bereich von 2.7 ppm keine zwei völlig getrennte Signalgruppen auftreten, sondern man beobachtet auch Signale bei 25.9 und 24.7 ppm wie bei kürzeren Aib-Peptiden.

Mit Hilfe dieser Peptide unterschiedlicher Kettenlänge, die ausschliesslich L-Ala und Aib in alternierender Sequenz enthalten,<sup>9</sup> zeigte sich also sowohl eine Abhängigkeit der MNE der  $^{13}\text{C}$ -Resonanz von Aib- $C_{\beta}$  von der Konformation<sup>8</sup> als auch eine helixbedingte starke Tieffeldverschiebung des Ala -  $C_{\alpha}$  - Signals von normalerweise *ca.* 50 ppm bis über 54 ppm. Da diese beiden Aminosäurebausteine in den Peptidantibiotika Alamethicin<sup>1,12,13</sup> Suzukacillin<sup>4,5</sup> und Trichotoxin<sup>14,15</sup> vorkommen, wurde eine  $^{13}\text{C}$  - NMR - Konformationsstudie an dem membranmodifizierenden Alamethicin - Modellpeptid Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - Gly - Ala - Aib - Pro - Ala - Aib - Aib - Glu(OBzl) - Gln - OMe<sup>16</sup> durchgeführt. Ferner wurden einige helikale und kleinere Synthesegmente dieses Peptids  $^{13}\text{C}$  - NMR - spektroskopisch untersucht. Die CD - Konformationsanalyse und die  $^{13}\text{C}$  - NMR - Untersuchungen ergaben übereinstimmende Resultate bezüglich der Ausbildung geordneter Konformationen.

Der Vergleich der  $^{13}\text{C}$  - NMR - Spektren des nach der Liquid - Phase - Methode aufgebauten Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - POE<sup>9</sup> mit dem konventionell synthetisierten Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OH bzw. Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OMe<sup>16</sup> zeigte, dass die aus spektroskopischen Untersuchungen an Peptid - Polyoxyethylenestern gewonnenen Erkenntnisse übereinstimmen.<sup>8,10,17</sup> Am Beispiel des im folgenden diskutierten  $^{13}\text{C}$  - NMR - Spektrums von Boc -

Tabelle 1. C-13-NMR-Chemische Verschiebungen

Verbindung <sup>*)</sup>	CO-Signale			Aib		Ala		Gly		
				$C_{\alpha}$	$C_{\beta}$	$C_{\alpha}$	$C_{\beta}$			
BOC-Gly-L-Ala-Aib-OMe	176.3	173.9	172.0	57.1	25.2	25.3	49.8	18.3	44.8	
BOC-L-Pro-L-Ala-Aib-OMe <sup>***)</sup>	174.9(2) 174.7(E)	172.4(E) 172.0(2)	171.3(2) 171.2(E)	55.9(E) 55.8(2)	24.9/24.5(2) 24.8/24.6(E)		48.5(2) 48.3(E)	19.5(E) 18.0(2)		
BOC-L-Ala-Aib-L-Ala-OMe	176.8	175.4	174.6	57.7	24.6	24.4	51.9 49.8	17.7 17.5		
BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe	177.3	175.4	174.7	57.6 57.2	26.2 25.4	25.6 25.2	50.7	17.8		
BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe <sup>**)a)</sup>	177.6 173.3	177.4	177.4	173.6	57.5	26.1	25.3			
BOC-L-Ala(Aib-L-Ala) <sub>2</sub> -OMe	176.7 173.9	176.5	175.6	174.2	57.6 57.2	25.9(2) 25.6	25.2 31.3 49.3	17.0(2) 16.4		
BOC-Aib(L-Ala-Aib) <sub>2</sub> -OMe	178.7 174.4	176.8	176.3	175.7	58.0 57.2 57.0	27.3 26.5 24.4(2)	25.5 25.0	53.2 50.8	17.4 16.9	
BOC-(Aib-L-Ala) <sub>4</sub> -NH-NH <sub>2</sub>	179.4 174.4	178.5(2) 176.5(3)	177.5		58.0 57.7 57.5 57.3	27.7 26.8 24.4 23.7	27.1 26.7 24.0 23.5	54.0 53.6 53.5 49.2	17.3(3) 17.0	
BOC-(Aib-L-Ala) <sub>5</sub> -OMe	179.4 177.2 174.5	178.6 176.8	178.5 176.5	177.6 174.6	58.0 57.9 57.7 57.5 57.3	27.8 26.8 24.5 23.7 23.5	27.0 26.7 24.4 23.6 23.5	54.0 53.8 53.7 51.3 49.4	17.8 17.3 17.0(2) 16.9	
BOC-L-Pro-L-Ala-Aib-Aib-1-Glu(OBzl)-Gln-OMe <sup>**)b)</sup>	177.5(2) 175.4	176.8 174.1	175.7 173.3	175.5	58.1 57.8	25.7 25.0	25.5	51.8(2) 51.1(E)	17.7(E) 17.1(2)	
BOC-(Aib-L-Ala) <sub>4</sub> -Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib <sup>2</sup> -Glu(OBzl)-Gln-OMe <sup>**)c)</sup>	180.3 179.4(2) 177.8 176.6 175.2	179.9 178.8 177.7 176.3 174.0	179.7 178.5 177.5(2) 176.2 173.6	179.6 178.3 176.7 175.4	58.4 57.9 57.7(2) 57.4(3)	27.1(3) 26.8(3) 24.5 24.3	24.1 24.1 23.6(2) 23.2	54.4 54.0(2) 53.7(3) 51.2	17.7 17.1(5) 16.8	46.9

\*) in  $^2\text{H}$ -Methanol; TMS als Standard; relative Intensitäten in Klammern

\*\*) a) Glutaminsäure; b) Glutamin

\*\*\*) Temp. T = -25°C



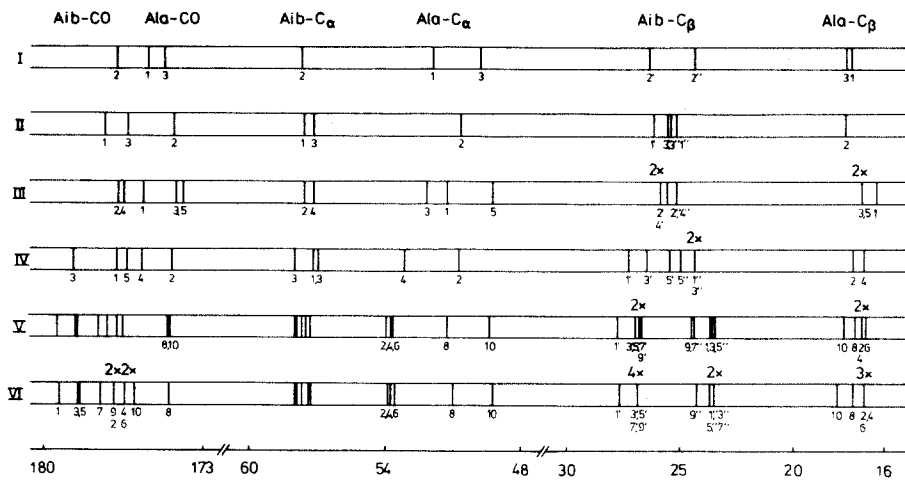


Abb. 1. Korrelationsdiagramm der C-13-Chemischen Verschiebung von Aib/Ala - Peptiden in  $^2\text{H}$ -Methanol bezogen auf TMS. I. Boc - L - Ala - Aib - Ala - OMe. II. Boc - Aib - L - Ala - Aib - OMe. III. Boc - L - Ala - (Aib - Ala)<sub>2</sub> - OMe. IV. Boc - Aib - (L - Ala - Aib)<sub>2</sub> - OMe. V. Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OMe. (Die kleingedruckten Zahlen geben die Sequenzposition an). VI. Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OH.

eine sehr starke Aufspaltung der Aib - C<sub>β</sub> - Signale von 2.4 ppm. Wie die Untersuchung an einer Vielzahl kleiner Aib - Peptide<sup>1,7</sup> zeigt, lässt sich eine derart starke MNE nicht allein durch das Asymmetriezentrum am α-Kohlenstoff der benachbarten Aminosäure erklären. Es muss ausserdem noch eine stabile Molekülkonformation vorliegen. Im CD - Spektrum dieses Tripeptids<sup>9</sup> wurden bereits Hinweise auf einen β-Turn gefunden. Die temperaturabhängige chemische Verschiebungsänderung des C-terminalen Ala - NH - Protons ( $1.2 \times 10^3$  ppm/Grad) bestätigt dies. Desgleichen weist die Kristallstruktur von

Ac - Ala - Aib - Ala - OMe einen β-Turn mit einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Acetyl-CO und <sup>3</sup>Ala - NH aus.<sup>25</sup> In dieser Konformation besitzt die pro - (R) - Methylgruppe von <sup>2</sup>Aib einen sehr kleinen Diederwinkel zur Aib - CO - Gruppe (< 30°). Das gleiche gilt für die <sup>1</sup>Ala - CO - Gruppe und die pro - (R) - Methylgruppe von <sup>2</sup>Aib. Beide Einflüsse führen zu einer Hochfeldverschiebung der Methylgruppe.<sup>23,24</sup> Demgegenüber erscheint die pro - (S) - Methylgruppe wie bei den β-Kohlenstoffen der natürlichen Aminosäuren bei tieferem Feld.

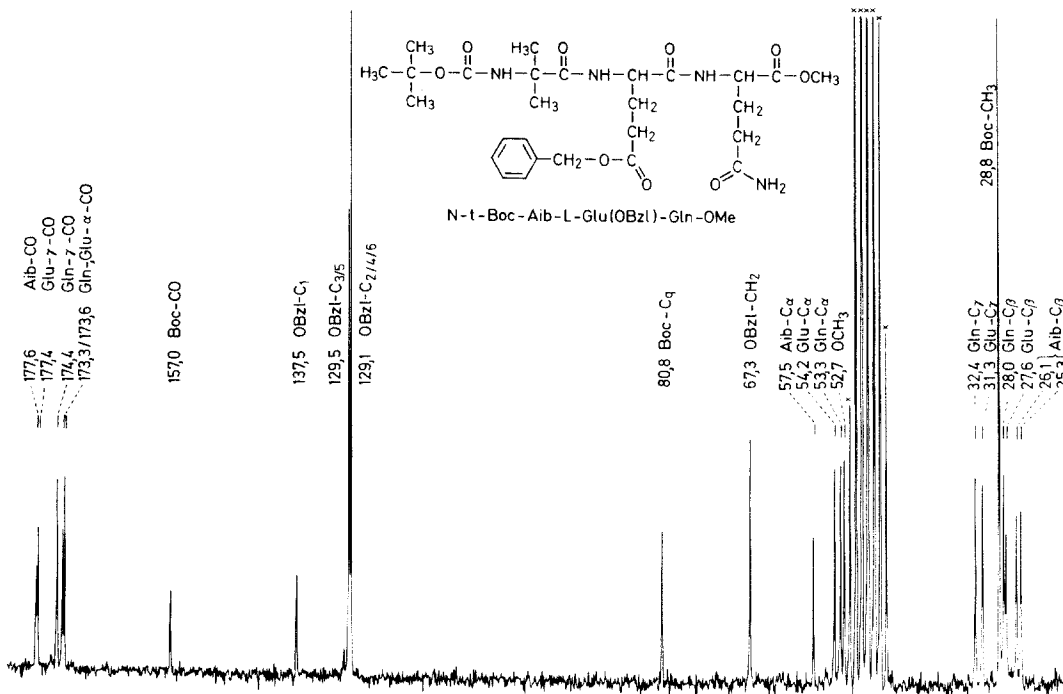


Abb. 2. C-13-NMR-Spektrum von Boc - Aib - L - Glu(OBzl) - Gln - OMe in  $^2\text{H}$ -Methanol.

Ferner fällt im <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Boc - L - Ala - Aib - Ala - OMe die starke Tieffeldverschiebung des N-terminalen Ala-C<sub>α</sub> mit 51.9 ppm auf, gegenüber dem vergleichbaren Ala-C<sub>α</sub> von Boc - L - Ala - Aib - OBU<sup>1</sup> mit 50.7 ppm.<sup>7</sup> Das C<sub>α</sub> - Signal des C-terminalen Alanin liegt andererseits mit 49.7 ppm im gleichen Bereich wie in Z - Aib - L - Ala - OMe mit 49.5 ppm.<sup>7</sup>

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Boc - Aib - L - Ala - Aib - OMe (Abb. 1) treten vier Aib - C<sub>β</sub> - Signale bei 26.1, 25.5, 25.3 und 25.1 ppm auf. Geht man auch in diesem Fall

vom Vorhandensein eines β-Turns aus, so wird für das C-terminale <sup>3</sup>Aib wieder eine kleinere MNE der <sup>3</sup>Aib - C<sub>β</sub> - Kohlenstoffe (25.3 bzw. 25.5 ppm) erwartet, während die Aufspaltung für <sup>1</sup>Aib nach den entsprechenden Argumenten wie bei Boc - Ala - Aib - Ala - OMe sehr gross sein sollte (25.1 bzw. 26.1 ppm).

Für das C-terminale Ende des Nonadeka-peptids wird das <sup>13</sup>C - NMR - Spektrum von Boc - L - Glu(OBzl) - Gln - OMe (Abb. 2) zur Unterscheidung von Glutamin- und Glutaminsäure - Signalen herangezogen. Bei Glu-

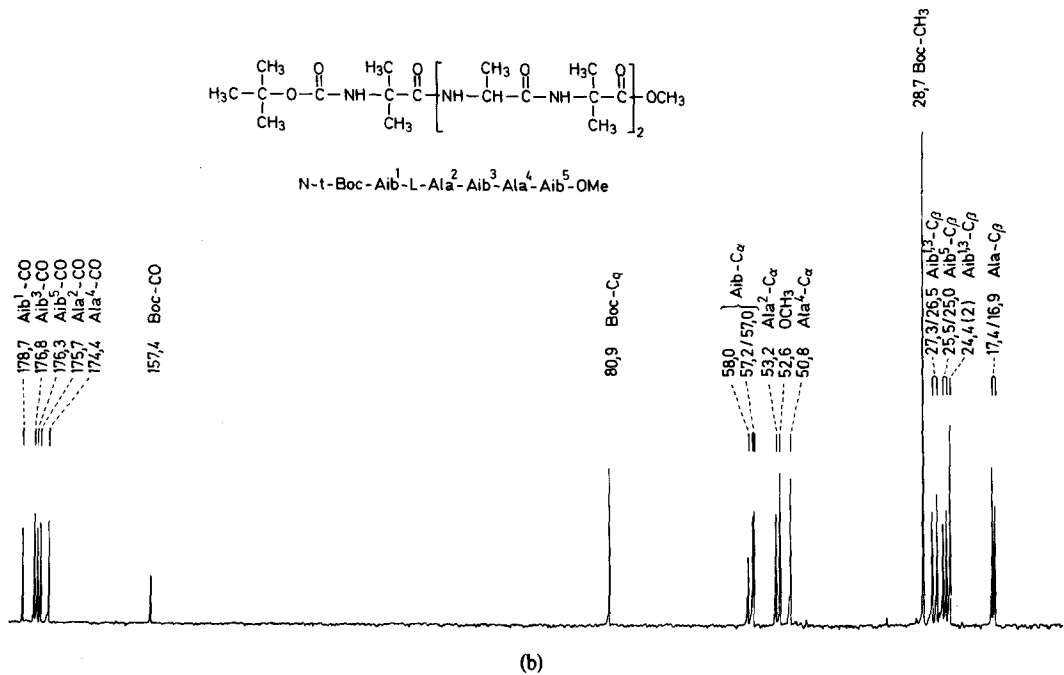
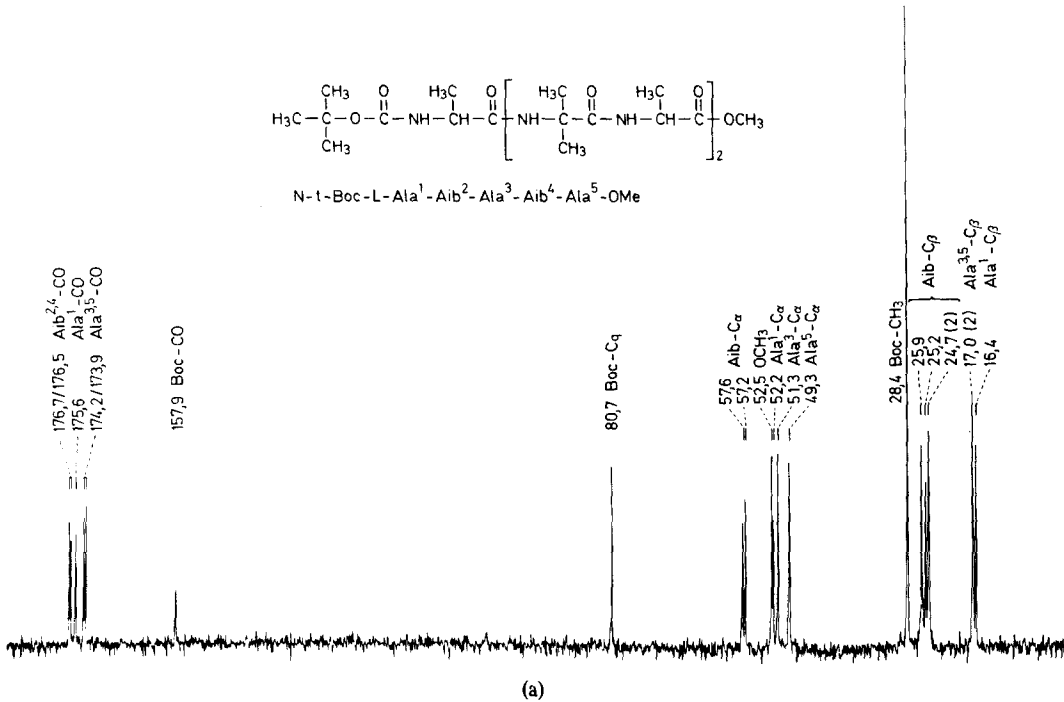


Abb. 3. C-13-NMR-Spektren der Pentapeptide Boc - L - Ala (Aib - Ala)<sub>2</sub> - OMe (a) und Boc - (Aib - L - Ala)<sub>2</sub> - Aib - OMe (b) in <sup>12</sup>C<sup>2</sup>H-Methanol.

taminsäure ist das  $C_\alpha$ -Signal (54.2 ppm) verglichen mit Glutamin (53.3 ppm) normalerweise um 0.9 ppm nach tieferem Feld verschoben, während die  $C_\beta$ - und  $C_\gamma$ -Signale von Glutaminsäure jeweils bei höherem Feld liegen als bei Glutamin; der Verschiebungsunterschied beträgt für  $C_\beta$  0.4 ppm und für  $C_\gamma$  1.1 ppm. Die Aromatensignale der  $\gamma$ -Benzylestergruppe findet man bei den üblichen ppm-Werten. Die Aufspaltung der beiden Methylgruppensignale des N-terminalen Aib bei 26.1 ppm und 25.3 ppm ist mit 0.8 ppm ähnlich gross wie bei  $^1\text{Aib}$  in Boc - Aib - L - Ala - Aib - OMe (Tabelle 1).

### $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Penta-, Hexa- und Dekapeptiden

In den Spektren der beiden Pentapeptide Boc - L - Ala - (Aib - Ala)<sub>2</sub> - OMe (Abb. 3a) und Boc - Aib - (L - Ala - Aib)<sub>2</sub> - OMe (Abb. 3b) erkennt man jeweils die 5 Carbonylsignale der Aminosäuren und etwas nach hohem Feld abgesetzt zwischen 157 und 158 ppm das Carbonyl-signal der Urethanschutzgruppe. Die Ala -  $C_\alpha$  - Signale für das Pentapeptid Boc - L - Ala - (Aib - Ala)<sub>2</sub> - OMe liegen bei 49.3 ppm (C-terminal), 52.2 ppm (N-terminal) und 51.3 ppm. Vergleicht man diese mit den Ala -  $C_\alpha$  - Signalen von Boc - L - Ala - Aib - Ala - OMe bei 49.7 ppm und 51.9 ppm, so findet man keine wesentliche Änderung der Signallagen. Es tritt also kein stärkerer Einfluss der Nachbargruppe auf, wie es bei einer hinzukommenden Windung beobachtet werden müsste. Auch die Aufspaltung der vier Aib -  $C_\beta$  - Signale über einen Bereich von 0.8 ppm wird in dieser Grössenordnung bereits in den Spektren der Tripeptide Boc - Aib - L - Ala - Aib - OMe und Boc - Aib - L - Glu(OBzl) - Gln - OMe gefunden. Im Pentapeptid mit höherem Aib - Anteil findet man zwar das  $C_\alpha$ -Signal von Alanin in Position 4 bei 50.8 ppm (vgl. Boc - Aib - L - Ala - Aib - OMe mit Ala- $C_\alpha$  50.6 ppm); das  $C_\alpha$  von Alanin in Position 2 tritt jedoch bei 53.2 ppm stark tieffeldverschoben auf. Aus diesem Befund muss ebenso wie aus der starken Aufspaltung der Aib -  $C_\beta$  - Signale auf insgesamt 3 ppm auf eine Konformationsänderung mit starker Abschirmung durch Nachbargruppen geschlossen werden.

Diese Entwicklung ist beim Dekapeptid Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OH (Abb. 4) bzw. Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OMe (Abb. 1) mit seinem signifikanten  $\alpha$ -Helixgehalt bereits abgeschlossen. Die Aufspaltung der Aib -  $C_\beta$  - Signale um insgesamt 4.2 ppm ist noch deutlicher geworden. Im Gegensatz zum Pentapeptid (Abb. 1) mit den gleichmässig verteilten Aib -  $C_\beta$  - Signalen bildet sich hier eine Aufspaltung in zwei  $C_\beta$  - Signalgruppen aus, deren Zentren um 3.2 ppm auseinander liegen. Auch die für eine  $\alpha$ -Helix charakteristischen Tieffeldverschiebungen der  $C_\alpha$ -Kohlenstoffe bzw. Hochfeldverschiebungen der  $C_\beta$ -Kohlenstoffe treten auf, wie sie im Falle von Alamethicin, Suzukacillin, Trichotoxin bereits mehrfach beobachtet wurden.<sup>1,4,6</sup> Die Polarisation der CH-Bindung an dem pro - (S) -  $\beta$  - Kohlenstoff führt dabei zu einer Hochfeldverschiebung. Der pro - (R) -  $\beta$  - Kohlenstoff bzw. ein tertiärer  $\alpha$ -Kohlenstoff wird dagegen aufgrund umgekehrter Polarisation nach tiefem Feld verschoben.

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des Dekapeptids als Methyl-ester oder mit freier Carboxy-Gruppe<sup>16</sup> sowie des Dekapeptid - POE - Esters<sup>8</sup> weisen gleiche chemische Verschiebungen auf, allerdings sind die Spektren der konventionell synthetisierten Dekapeptide besser aufgelöst. Für die Zuordnung der Signale und den Vergleich mit Alamethicin gelten die bereits oben gemachten Ausführungen. Zur Identifizierung der Dekapeptidsäure bzw. des Dekapeptidesters ist wesentlich, dass infolge der besseren Auflösung im Carbonylteil 9 Aminosäuresignale beobachtet werden, von denen eines das doppelte Integral aufweist; also können alle zehn Aminosäure-Carbonylgruppen sicher identifiziert werden. Ferner erkennt man 5 Aib -  $C_\alpha$  -, 9 getrennte Aib -  $C_\beta$  -, 5 Ala -  $C_\alpha$  - und 4 Ala -  $C_\beta$  - Signale sowie Kohlenstoffe der tert. - Butyloxycarbonylgruppe. Die Identität dieses Dekapeptids ist somit durch das  $^{13}\text{C}$  - NMR - Spektrum eindeutig belegt.

Das C-terminale Hexapeptidfragment Boc - L - Pro - Ala - Aib - Aib - Glu(OBzl) - Gln - OMe zeigt, wie schon das Tripeptid Boc - L - Pro - Ala - Aib - OMe, eine Aufspaltung der Signale von Prolin, Alanin und Boc-CO infolge *Z/E*-Isomerie der Urethanbindung am Pyrrolidin-

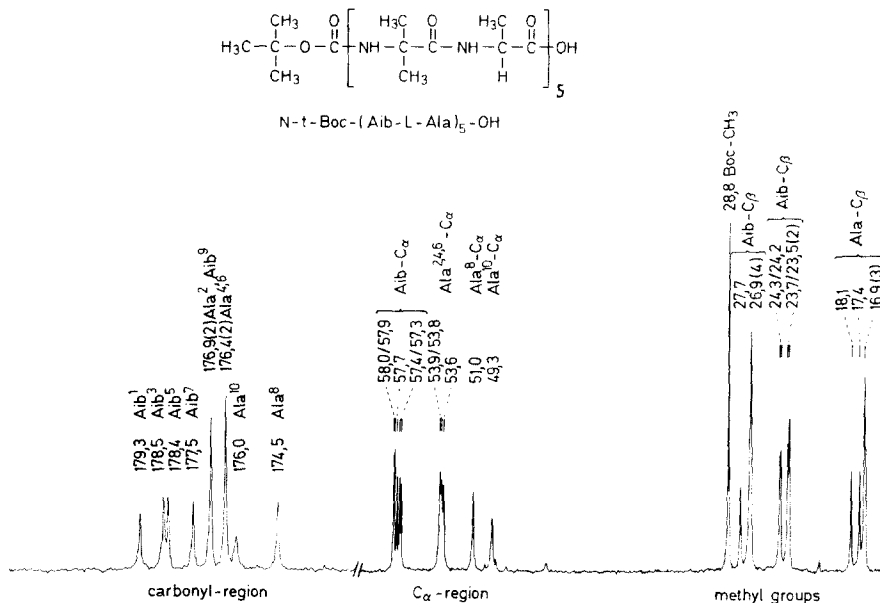


Abb. 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Dekapeptids Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - OH in  $^{12}\text{C}_2\text{H}_5$ -Methanol.

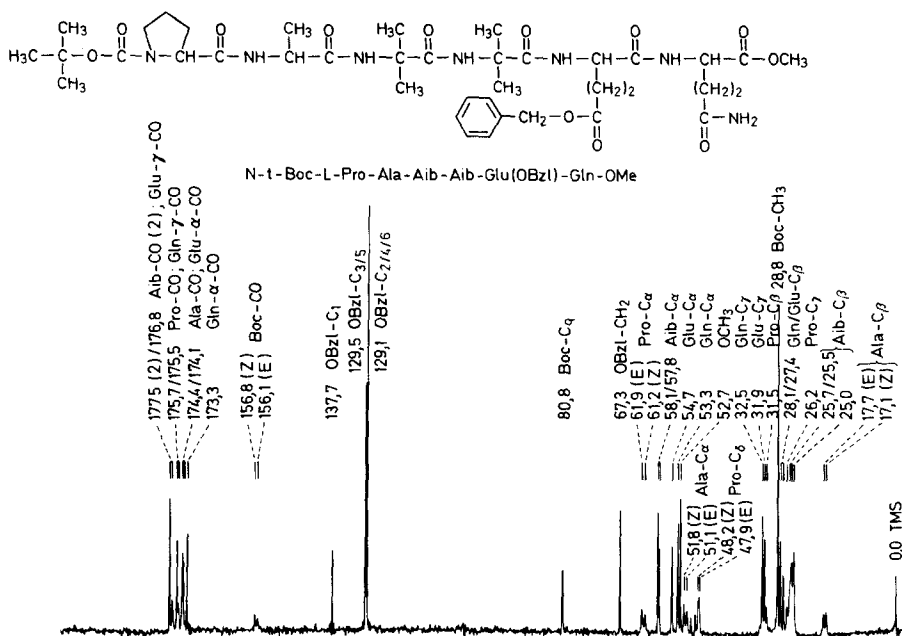


Abb. 5. C-13-NMR-Spektrum des Hexapeptids Boc - L - Pro - Ala - Aib - Aib - Glu(OBzl) - Gln - OMe in <sup>12</sup>C<sup>2</sup>H-Methanol als Synthesebeweis für das C-terminale Ende des Nonadekapeptids.

Ring von Prolin (Abb. 5). Die Intensitätsverhältnisse der aufgespaltenen Signale zeigen einen ähnlichen Unterschied der freien Enthalpie für das Z- und E-Isomere, wobei die E-Form nur noch um  $\Delta G^\circ = 0.3 \text{ KJ/mol}$  begünstigt ist. Die Lage der Glutaminsäure-, Glutamin- und Benzylester-Signale ist identisch mit denen des Tripeptids Boc - Aib - L - Glu(OBzl) - Gln - OMe (Abb. 2). Die schwachen Aufspaltungen der Aib - C<sub>β</sub> - Signale um 0.7 ppm und die geringe Tieffeldverschiebung des Ala - C<sub>α</sub> bei 51.1 (E) bzw. 51.8 ppm (Z) könnten durch eine grösstenteils ungeordnete ρ-Konformation erklärt werden.

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des Nonadekapeptids und Vergleich mit den Spektren der natürlichen Peptidantibiotika

Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (15.08 MHz) des Nonadekapeptids Boc - (Aib - L - Ala)<sub>5</sub> - Gly - Ala - Aib - Pro - Ala - Aib - Glu(OBzl) - Gln - OMe<sup>16,18</sup> (Tabelle 1) weist infolge der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge von 35 mg ein relativ ungünstiges Signal - Rausch - Verhältnis auf. Dennoch lassen sich neben der sicheren Zuordnung der C-Atome auch noch Konformationsaussagen aus den Verschiebungen einzelner charakteristischer Signale ableiten. Im expandierten Carbonylteil erkennt man neben dem hochfeldabgesetzten Boc - CO - Signal bei 158.7 ppm noch 19 Signale. Zwei dieser Signale, bei 170.4 ppm und 177.5 ppm, besitzen doppelte Intensität und entsprechen somit jeweils zwei Carbonyl - Resonanzen. Diese 21 Aminosäurecarbonylgruppen werden für das Nonadekapeptid unter Einbeziehung der zwei Glx - γ - Carbonylgruppen erwartet.

Im Aromatenbereich findet man für die Signale der Benzylestergruppierung dieselben Werte wie beim C-terminalen Hexapeptid (Abb. 3); auch die Absorption des Benzylmethylkohlenstoffs liegt unverändert bei 67.3 ppm. Die charakteristischen tert. - Butyloxycarbonyl-Signale treten neben dem bereits erwähnten CO-Signal bei 81.2 ppm (C-quartär) und bei 28.8 ppm (CH<sub>3</sub>) auf.

Im Aliphatenbereich sieht man bei höchstem Feld drei Ala - C<sub>β</sub> - Signale bei 16.8, 17.1 bzw. 17.7 ppm, deren Integrale sich wie 1:5:1 verhalten. Das intensive Signal bei 17.1 weist auf 5 Ala-C<sub>β</sub> in einer helikalen Konformation hin. Das C<sub>β</sub>-Signal bei 17.7 ppm kann durch Vergleich mit Abb. 5 dem Ala-15 im C-Terminus mit nicht helikaler Konformation zugeordnet werden. Die Aib - C<sub>β</sub> - Signale sind wieder deutlich in zwei Gruppen aufgespalten; die meisten Aib-Reste befinden sich somit in helikaler Umgebung. Die Aufspaltung um 3.9 ppm entspricht den schon erwähnten Werten von Alamethicin mit 3.5 ppm<sup>1</sup> bzw. Trichotoxin A-40 mit 4 ppm.<sup>6</sup> Die Ala - C<sub>α</sub> - Signale sind wiederum stark tieffeldverschoben wie im Dekapeptid (Abb. 4) bzw. Alamethicin.<sup>1</sup> Nur eines der Ala - C<sub>α</sub> - Signale liegt mit 51.2 ppm nicht im nichthelikalen Bereich und entspricht dem schon über die Ala - C<sub>β</sub> - Signale ermittelten <sup>15</sup>Ala.

Alle <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der untersuchten Peptide sind somit widerspruchsfrei erklärt und die Konformationsaussagen zeigen gute Übereinstimmung mit den aus CD- und IR-Daten abgeleiteten Ergebnissen.<sup>10,11</sup> Insbesondere werden durch diese Untersuchung die von uns an den natürlichen Peptidantibiotika<sup>1,4,6</sup> getroffenen <sup>13</sup>C - NMR - Zuordnungen erhärtet. Ferner können nun gezielt bezüglich der komplizierten Konformationsänderungen dieser Peptide weitere Daten z.B. aus temperatur- und lösungsmittelabhängigen Messungen ermittelt werden. Dies würde noch besser experimentell abgesicherte Vorstellungen zur molekularen Wirkungsweise dieser Porenbildner ermöglichen. Neuere Ansichten dazu werden an anderer Stelle diskutiert.<sup>15,37-38</sup>

Es ist hier ausdrücklich anzumerken, dass die diskutierten helikalen Segmente α-Helices und keine <sub>3</sub><sub>10</sub>-Helices sind. Die von verschiedener Seite<sup>26-34,39-43</sup> postulierten <sub>3</sub><sub>10</sub>-Helices konnten anhand der Röntgen - Strukturanalyse des α-helikalen Undekapeptids Boc - L - Ala - (Aib - Ala)<sub>2</sub> - Glu(OBzl) - Ala - (Aib - Ala)<sub>2</sub> - OMe widerlegt werden.<sup>37,38</sup>

2-Methylalanin-Reste passen offensichtlich trotz

„sterischer Hinderung“ problemlos in die  $\alpha$ -Helix.<sup>1-11,37,38</sup> Daher sind folgende Punkte bedeutsam.

Die in Tri- bis Pentapeptiden gefundenen Konformationen, wie z.B. der häufig auftretende  $\beta$ -Turn, sollten auch bei Aib-Peptiden nicht kritiklos auf längere Peptide mit periodisch geordneter Struktur extrapoliert werden. Grundsätzlich sollte der Begriff „Helix“ nur dann angewandt werden, wenn mindestens eine vollständige, besser mehrere helikale Windungen vorhanden sind. Somit können aufgrund der bisher durch Röntgen-Strukturanalyse aufgeklärten Aib-Peptide<sup>19,25,26,28-32,34-38</sup> keine längeren  $3_{10}$ -Helices für Alamethicin postuliert werden.

Lediglich N-terminal (Ac - Aib - Pro-) und C-terminal ab Prolin-15 kann das dominierende  $\alpha$ -helicale Segment durch  $\beta$ -Turns fortgesetzt sein.<sup>1-11</sup> Dort können durch-aus auch Winkelkombinationen auftreten, wie sie im Ramachandran-Plot einer  $3_{10}$ -Helix entsprechen. Aufgrund von NMR-Messungen in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Lösungsmittel, sowie durch H/D-Austausch kann zwar auf Wasserstoffbrückenbindungen, nicht aber auf  $3_{10}$ -Helices geschlossen werden, wie andere Autoren<sup>39-42</sup> es mehrfach versuchten.

Unsere bisherigen Vorstellungen zur Sekundärstruktur des Alamethicins<sup>1-11,14-19,37-38</sup> stehen in Übereinstimmung mit 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR - Untersuchungen von G. Davis und B. F. Gisin.<sup>44</sup>

*Danksagung*—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 76 Teilprojekt R-Ju) und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die gewährte finanzielle Unterstützung.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup>G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz, *Eur. J. Biochem.* **54**, 395 (1975).
- <sup>2</sup>G. Irmscher und G. Jung, *Ibid.* **80**, 165 (1977).
- <sup>3</sup>G. Jung, N. Dubischar, G. Irmscher, W. Mayr und R. Oekonomopulos, *Chemiker-Ztg.* **101**, 196 (1977).
- <sup>4</sup>G. Jung, W. A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko und G. Boheim, *Biochim. Biophys. Acta* **433**, 164 (1976).
- <sup>5</sup>G. Boheim, K. Janko, D. Leibfritz, T. Ooka, W. A. König und G. Jung, *Ibid.* **433**, 182 (1976).
- <sup>6</sup>G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung, *Ibid.* **507**, 470 (1978).
- <sup>7</sup>D. Leibfritz, E. Haupt, N. Dubischar, H. Lachmann, R. Oekonomopulos und G. Jung, *Tetrahedron* **38**, 2165 (1982).
- <sup>8</sup>D. Leibfritz, W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, *Ibid.* **34**, 2045 (1978).
- <sup>9</sup>W. Mayr, R. Oekonomopulos und G. Jung, *Biopolymers* **18**, 425 (1979).
- <sup>10</sup>R. Oekonomopulos und G. Jung, *Ibid.* **19**, 203 (1980).
- <sup>11</sup>W. Mayr und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1489** (1980).
- <sup>12</sup>J. W. Payne, R. Jakes und B. S. Hartley, *Biochem. J.* **117**, 757 (1970).
- <sup>13</sup>D. R. Martin und R. J. P. Williams, *Biochem. Soc. Trans.*, Proc. 533rd meeting, Vol. 3, 166 (1975).
- <sup>14</sup>H. Brückner, W. A. König, M. Greiner und G. Jung, *Angew. Chem.* **91**, 508 (1979); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **18**, 476 (1979).
- <sup>15</sup>G. Jung, H. Brückner, R. Oekonomopulos, G. Boheim, E. Breitmaier und W. A. König, in *Peptides: Structure and Biological Function*, Proc. 6th Am. Pept. Symp., Herausg. E. Gross und J. Meienhofer, S. 644, Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois (1979).
- <sup>16</sup>R. Oekonomopulos und G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1151** (1979).
- <sup>17</sup>G. Jung, R. Oekonomopulos, W. Mayr, G. Bovermann und D. Leibfritz, *Proc. of the Eur. Conf. on NMR of Macromolecules*, Sassari (Italien), 1978.
- <sup>18</sup>R. Oekonomopulos, Dissertation, Universität Tübingen 1978.
- <sup>19</sup>W. Winter, R. Bosch und G. Jung, Manuskript eingereicht.
- <sup>20</sup>M. Branik und H. Kessler, *Chem. Ber.* **108**, 2176 (1975).
- <sup>21</sup>C. Grathwohl und K. Wüthrich, *Biopolymers* **15**, 2025 (1976).
- <sup>22</sup>C. Grathwohl und K. Wüthrich, *Ibid.* **15**, 2043 (1976).
- <sup>23</sup>I. Z. Siemion, Th. Wieland und K. H. Pook, *Angew. Chem.* **87**, 712 (1975); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **14**, 712 (1975).
- <sup>24</sup>H. Kessler, P. Kondor, G. Krack und P. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2548 (1978).
- <sup>25</sup>J. Strähle, H. Schaal, H. Brückner, G. Jung und W. Winter, Manuskript in Vorbereitung.
- <sup>26</sup>N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balam, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 292 (1977).
- <sup>27</sup>B. R. Malcolm, *Biopolymers* **16**, 2591 (1977).
- <sup>28</sup>G. D. Smith, W. L. Duax, E. W. Czerwinski, N. E. Kendrick, G. R. Marshall und F. S. Mathews in *Peptides: Proc. 5th Am. Pept. Symp.*, Herausg. M. Goodman und J. Meienhofer, S. 277. Wiley, New York (1977).
- <sup>29</sup>N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balam, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **996** (1978).
- <sup>30</sup>B. V. Venkataram Prasad, N. Shamala, R. Nagaraj, R. Chandrasekaran und P. Balam, *Biopolymers* **18**, 1635 (1979).
- <sup>31</sup>R. Nagaraj, N. Shamala und P. Balam, *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 16 (1979).
- <sup>32</sup>E. Benedetti, C. Pedone und C. Toniolo, in *Peptides 1980*, Proc. 16th Eur. Pept. Symp., Herausg. K. Brunfeldt, S. 619. Scriptor, Copenhagen (1981).
- <sup>33</sup>G. D. Smith, V. Z. Pletnev, W. L. Duax, T. M. Balasubramanian, H. E. Bosshard, E. W. Czerwinski, N. E. Kendrick, F. S. Mathews und G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1493 (1981).
- <sup>34</sup>B. V. V. Prasad, N. Shamala, R. Nagaraj und P. Balam, *Acta Cryst. B* **36**, 107 (1980).
- <sup>35</sup>W. Mayr, G. Jung und J. Strähle, *Liebigs Ann. Chem.* **715** (1980).
- <sup>36</sup>J. L. Flippen und I. L. Karle, *Biopolymers* **5**, 1081 (1976).
- <sup>37</sup>G. Jung, H. Schmitt und W. Winter, in *Peptides: Proc. 7th Am. Pept. Symp.*, Herausg. E. Gross und D. H. Rich, S.311. Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois (1981).
- <sup>38</sup>T. Butters, H. Hütter, G. Jung, N. Pauls, H. Schmitt, G. M. Sheldrick und W. Winter, *Angew. Chem.* **93**, 904 (1981); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**, 889 (1981).
- <sup>39</sup>R. Nagaraj und P. Balam, *Biochemistry* **20**, 2828 (1981).
- <sup>40</sup>Y. V. Venkatachalapathi und P. Balam, *Biopolymers* **20**, 625 (1981).
- <sup>41</sup>M. Iqbal und P. Balam, *Biochemistry* **20**, 4866 (1981).
- <sup>42</sup>M. Iqbal und P. Balam, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5548 (1981).
- <sup>43</sup>Y. Paterson, E. R. Stimson, D. E. Evans, S. J. Leach und H. Scheraga, *Abstr. 7th Am. Pept. Symp.*, Madison, S. 124 (1981).
- <sup>44</sup>D. G. Davis und B. F. Gisin, *FEBS Letters* **133**, 247 (1981).