

# Konformation und biologische Wirkung von cyclischen Peptiden\*\*

Von Horst Kessler\*

Professor Klaus Weissermel zum 60. Geburtstag gewidmet

Cyclische Peptide, welche die biologisch aktive Sequenz von Peptidhormonen enthalten, eignen sich als Modelle zum Studium von Konformations-Wirkungs-Beziehungen. Die große Flexibilität von Peptiden wird durch Cyclisierung verringert. Erst wenn ein einziges Konformer im Gleichgewicht dominiert – die Kriterien dafür werden dargelegt – läßt sich eine experimentelle Konformationsanalyse durchführen. Die NMR-spektroskopischen Methoden – auch neueste Entwicklungen – werden im Hinblick darauf diskutiert, was sie für die Konformationsanalyse von Peptiden zu leisten vermögen.

*„Außer der Wasserstoff-Bindung haben wir uns in der organischen Chemie sehr wenig um nicht-kovalente Bindungen gekümmert. Meiner Meinung nach wird es Pflicht der zukünftigen Organiker sein, diese schwachen intramolekularen Kräfte zu untersuchen, genau wie wir in früheren Generationen die kovalente Bindung studiert haben. Dadurch wird die organische Chemie ein Wiederaufblühen erleben.“*

Lord Alexander R. Todd<sup>(1)</sup>

## 1. Einführung

Der Wunschtraum des Arzneimittelherstellers ist die gezielte Synthese eines selektiven Wirkstoffes, d. h. eines Wirkstoffes ohne pharmakologische Nebenwirkungen. An Anstrengungen zur Realisierung dieses „drug design“ hat es nicht gefehlt<sup>[2-6]</sup>, und die Suche nach Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist bis heute das erklärte Ziel vieler Laboratorien in Hochschule und Industrie. Die Verfeinerungen der Vorstellungen von der Struktur organischer Verbindungen spiegeln sich in den Bemühungen der Chemiker, Biochemiker und Pharmazeuten wider. Anfangs versuchte man durch Aufstellung von Konstitutions-Wirkungs-Beziehungen Licht in die „black box“ der Relation von Struktur und Wirkung zu werfen, doch erkannte man bald, daß die Konfiguration die gleiche Bedeutung wie die Konstitution hat; in den letzten Jahren wurde der Stereospezifität von Wirkstoffsynthesen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Obwohl seit *Barton*<sup>[7]</sup> die Rolle der Konformation in Chemie und Biochemie klar geworden ist, wurden nur zaghafte Versuche zur Aufstellung von Konformations-Wirkungs-Beziehungen unternommen<sup>[8]</sup>.

Die Gründe hierfür sind leicht einzusehen. Konformere sind in der Regel nicht als stabile Verbindungen isolierbar und können daher nicht getrennt biologisch getestet werden. Unseres Wissens ist das cyclische Tetrapeptid [Sar<sup>1</sup>]-Tentoxin, dessen beide Konformere unterschiedliche Wirkungen zeigen, bisher der einzige Fall, in dem dies gelungen ist<sup>[9]</sup>. Normalerweise bereitet schon die Aufklärung der stabilsten Konformation in Lösung beträchtliche Schwierigkeiten; viel schwieriger sind Konformationsänderungen in den biologischen Medien nachzuvollziehen<sup>[10, 11]</sup>.

Man ist darauf angewiesen, die *Konstitution* und/oder die *Konfiguration* eines Wirkstoffes so zu verändern, daß *konformative* Änderungen erzielt werden. Der unterschiedliche Einfluß der vielen Faktoren auf die biologische Wirkung ist dann aber schwer getrennt zu analysieren.

## 2. Zur Wechselwirkung Hormon-Rezeptor

Einen Ausweg aus diesem Dilemma könnte das Studium von physiologisch wirksamen Peptiden bieten, die als Hormone und Neuropeptide<sup>[12]</sup> in den Mittelpunkt des Interesses gerückt sind. Über die Synthese von Agonisten oder Hormonantagonisten (z. B. kompetitiven Inhibitoren) hofft man, Pharmaka zur Behandlung hormoneller Erkrankungen zu finden.

Mehrere dieser Peptide haben nur einen relativ kleinen „aktiven“ Bereich (Fig. 1). Strukturelle Variationen in diesem Bereich, der in der Regel nur vier bis fünf Aminosäuren umfaßt, führen zu besonders drastischen Veränderungen der biologischen Wirkung. Hat der Rest des Hormons vielleicht nur die Funktion, die richtige Konformation des aktiven Zentrums aufzubauen? Dann sollte eine Veränderung dieser „Stütze“ Konformationsänderungen hervorrufen, die sich direkt mit der biologischen Wirkung der Derivate korrelieren lassen.

Einen Zugang zur Verwirklichung dieser Vorstellungen eröffnen Modelle der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung. *Emil Fischers* Schlüssel-Schloß-Prinzip, nach dem die molekulare Erkennung auf einer Komplexbildung des Hormons mit dem Rezeptor („binding“)<sup>[21]</sup> beruht, ist heute allgemein akzeptiert. Die postulierte Konformationsänderung des Rezeptors bei der Komplexbildung bewirkt die Weitergabe eines Signals („transduction“)<sup>[21]</sup> (Fig. 2). Bindung und Signalweitergabe sind nicht identisch. Häufig sucht man gerade Substrate, die sich zwar an den Rezeptor

[\*] Prof. Dr. H. Kessler

Institut für Organische Chemie der Universität  
Niederurseler Hang, D-6000 Frankfurt am Main 50

[\*\*] Peptidkonformationen, 19. Mitteilung. – 18. Mitteilung: [106].

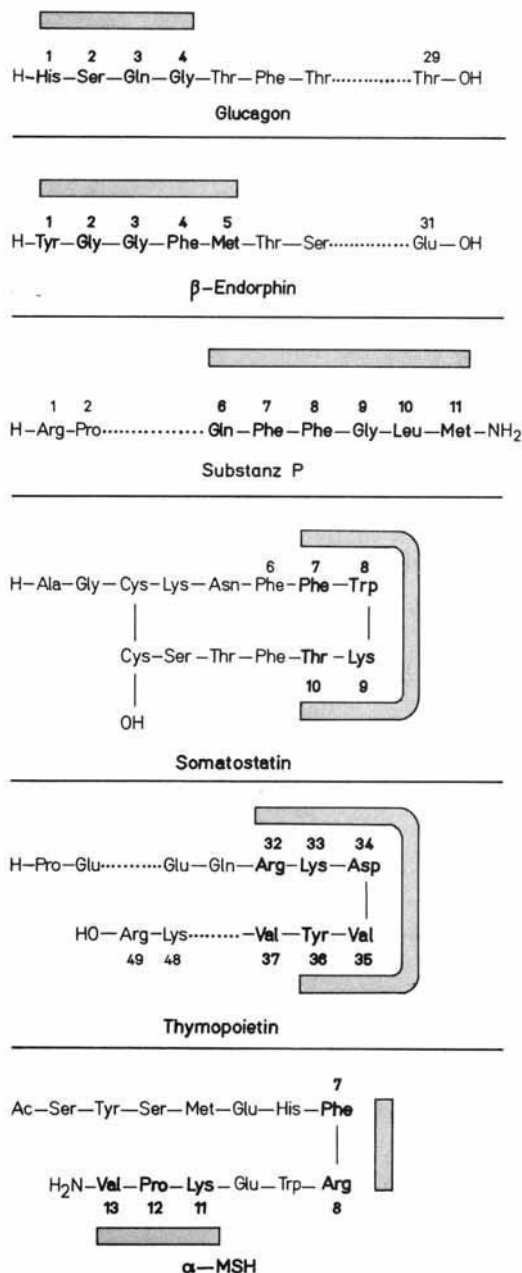


Fig. 1. Aktive Sequenzen in peptidischen Wirkstoffen: Glucagon [13, 14], β-Endorphin [15], Substanz P [16, 17], Somatostatin [18], Thymopoietin [19], α-MSH [20].

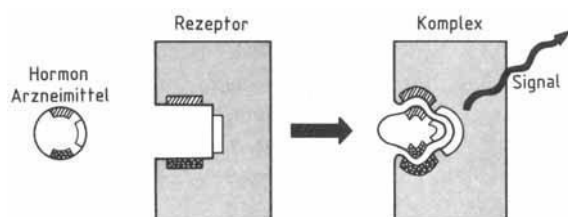


Fig. 2. Modell der Hormon- oder Arzneimittel-Rezeptor-Wechselwirkung.

binden, aber kein Signal induzieren (kompetitive Hemmung).

Das Hormon selbst kann durch die Komplexierung ebenfalls seine Konformation ändern. Man spricht von „induzierter Anpassung“, die nach neueren Erkenntnissen sowohl für den Rezeptor als auch für das Hormon gilt<sup>[22]</sup> (Fig. 3). Ob hierbei ein vorgelagertes Gleichgewicht oder

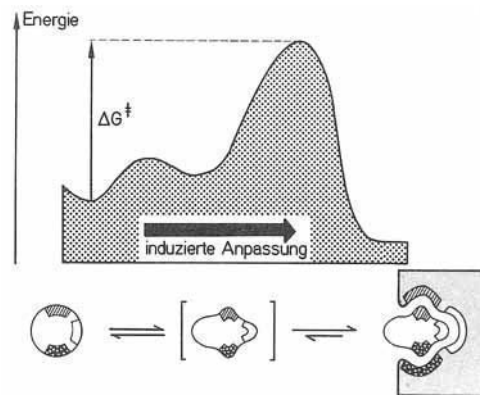


Fig. 3. Induzierte Anpassung der Konformationen bei der Bindung an den Rezeptor.

erst eine durch die Komplexbildung hervorgerufene Konformationsänderung den Ausschlag gibt, ist für die weitere Diskussion ohne Belang. Auf jeden Fall hat man davon auszugehen, daß die in Lösung stabilste Konformation des Hormons nicht mit derjenigen im Komplex identisch sein muß. Bisher ist kein Hormonrezeptor strukturell aufgeklärt worden<sup>[23]</sup>, und es gibt noch keine Methode, mit der man die interessierende Konformation des Hormons am Rezeptor direkt bestimmen kann. Daher ist man auf indirekte Methoden angewiesen.

Ein solches Verfahren ist die Konformationsbestimmung biologisch aktiver Moleküle. Man setzt voraus, daß ein Molekül biologisch um so aktiver ist, je ähnlicher die stabilste Konformation in Lösung der Konformation am Rezeptor ist (Fig. 4). Weitere Konformationsumwandlungen bei der Komplexierung würden ja zusätzliche Energie auf Kosten der Bindungsenergie verbrauchen. Berücksichtigt man jedoch, daß die Bindungsenergie sehr groß gegenüber der Energie ist, die für viele Konformationsumwandlungen benötigt wird<sup>[\*]</sup>, so erscheint diese Annahme kaum fundiert. Trotzdem rechtfertigt erst die Hypothese einer direkten Korrelation der stabilsten Konformation in Lösung mit derjenigen am Rezeptor das Studium aktiver Moleküle in Lösung. Es ist auch anzunehmen, daß ein Teil der untersuchten Systeme diese Bedingungen erfüllt und daß der Energieaufwand für die Konformationsänderung bei der Komplexierung nicht allzu groß ist.

Eine andere Möglichkeit, ein Bild der Konformation am Rezeptor zu erhalten, besteht in der Einführung von konformativen Fixierungen. In Figur 5 ist dies schematisch

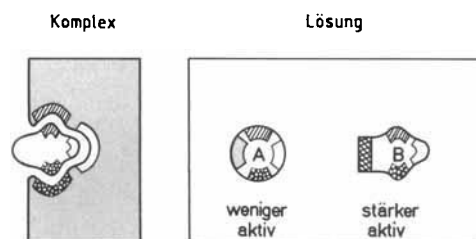


Fig. 4. Möglichkeit I zur Bestimmung der Konformation am Rezeptor. Hypothese: Das aktivste Molekül bevorzugt schon in Lösung eine Konformation, die der Konformation im Komplex ähnlich ist (→ Konformationsstudien an aktiven Peptiden, siehe Text).

[\*] Die typischen Bindungsenergien biologisch aktiver Peptide betragen ca. 12–17 kcal/mol [24], während schon Bruchteile von kcal/mol Konformationsgleichgewichte stark verändern können.

durch einen „Gürtel“ angedeutet. Führt die „Einschnürung“ zu einer Geometrie, die derjenigen am Rezeptor nicht entspricht, erwartet man keine Aktivität; bei richtiger Lage des „Gürtels“ sollte die Aktivität jedoch nicht beeinflußt oder sogar noch gesteigert werden. In der Praxis erreicht man eine derartige Konformationsfixierung am einfachsten durch Cyclisierung, welche die Konformationsfreiräume besonders bei kleinen Ringen stark verringert. Das Prinzip der „Versteifung“ legt das Studium cyclischer Peptide nahe<sup>[25-27]</sup>.

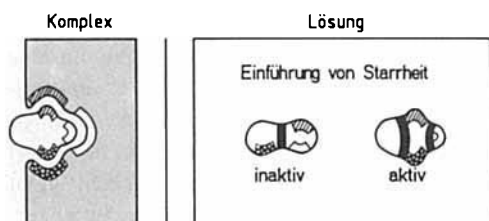


Fig. 5. Möglichkeit II zur Bestimmung der Konformation am Rezeptor (→ Konformationsstudien an cyclischen Peptiden, siehe Text).

Konformations-Wirkungs-Studien an Peptidhormonen wird man somit am besten in folgender Reihenfolge durchführen:

#### 1. Suche nach der aktiven Sequenz des Hormons

In klassischer Weise werden Konstitution und Konfiguration der Aminosäuren variiert, bis man den Teil oder die Teile des Moleküls lokalisiert hat, in denen minimale Strukturänderungen zu maximalen biologischen Effekten führen.

#### 2. Konformationsstudien an den biologisch aktiven Molekülen

Unter verschiedenen Bedingungen (im Kristall, in mehreren Lösungsmitteln) ist zunächst die konformative Reinheit zu prüfen. Vor allem in Lösung muß mit dem Vorliegen mehrerer Konformationen gerechnet werden. Gesicherte Aussagen sind in der Regel nur bei konformativer Homogenität zu erwarten. Je geringer die gefundenen Konformationsänderungen sind, desto geringer werden sie auch bei der Komplexbildung am Rezeptor sein.

#### 3. Konformationsstudien an Modellpeptiden

An einer größeren Zahl cyclischer Peptide mit unterschiedlicher Konstitution und Konfiguration werden Konformationsstudien durchgeführt, deren Ziel es ist, die Konformation neuer Peptide vorauszusagen.

#### 4. Einbau der aktiven Sequenz in cyclische Strukturen zur Simulation der Konformation am Rezeptor

Die nicht zur aktiven Sequenz gehörenden Teilstücke müssen dabei nach den Erkenntnissen aus Modellstudien so gewählt werden, daß das Molekül die aus dem Studium der biologisch aktiven Hormone gewonnene wahrscheinliche „aktive“ Konformation einnimmt. Synthese, Konformationsanalyse und Aktivitätsstudien

greifen ineinander und ermöglichen dadurch den Fortgang der Arbeiten.

Das Studium *cyclischer* Peptide hat einen wichtigen Nebeneffekt. Da Peptide im Organismus besonders leicht am C- oder N-terminalen Ende abgebaut werden, ist die Spaltung cyclischer Peptide deutlich verlangsamt, und es ist eine größere Wirkungsdauer zu erwarten<sup>[18,28-31]</sup>. Ein zweiter Gesichtspunkt ist die Schleifenstruktur der Cyclen. In linearen Peptiden und Proteinen werden diese Schleifen vor allem durch die Tendenz zur Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken aufgebaut. Am bekanntesten ist die  $\beta$ -Schleife<sup>[32]</sup>, die beim Aufbau der  $\beta$ -Faltblattstruktur die antiparallele Rückführung der Peptidkette in Haarnadelform ermöglicht. In ihr wird eine Wasserstoffbrücke von der NH-Gruppe der vierten Aminosäure zur CO-Gruppe der ersten Aminosäure in einer Peptidsequenz gebildet (siehe Fig. 17). In kleineren acyclischen oder cyclischen Peptiden spielt auch die  $\gamma$ -Schleife mit einer Wasserstoffbrücke von der NH-Gruppe der dritten zur CO-Gruppe der ersten Aminosäure eine größere Rolle (siehe Fig. 17). Die Bedeutung der Schleifen bei der Informationsübertragung wird durch die folgenden Überlegungen nahegelegt:

Man kann annehmen, daß die Natur beim Schlüssel-Schloß-Prinzip den transportablen „Schlüssel“, das Hormon, so klein wie möglich halten wird. Zur maximalen Informationsübertragung sollte ferner das Hormon möglichst dreidimensional umhüllt werden können. Der Rezeptor kann wegen seiner lokalen Fixierung (z. B. in der Zellmembran) sehr groß sein. Eine solche Umhüllung der Erkennungsregion ist am besten an Kettenenden oder Schleifen gewährleistet, die tief in die Rezeptortasche eindringen können (vgl. Fig. 1). Es wäre also denkbar, daß die aktiven Sequenzen, soweit sie im Inneren einer Peptidkette lokal konzentriert sind, stets Schleifen enthalten. Der Rest des Moleküls hätte dann für die richtige Konformation des aktiven Teilstückes und für die Verstärkung der Bindung am Rezeptor zu sorgen.

In diesem Aufsatz sollen die Möglichkeiten des experimentellen Zugangs zur Konformation kurz dargestellt werden. Dabei wird der NMR-Spektroskopie eine besondere Rolle zukommen, da die Informationsausbeute über die Konformation in Lösung bei dieser Methode derjenigen anderer Methoden überlegen ist<sup>[25-27,33-42]</sup>. Natürlich wird man nicht umhin können, das ganze Arsenal der Konformationsanalyse<sup>[43-48]</sup>, einschließlich molekülmechanischer Berechnungen<sup>[49]</sup>, ergänzend heranzuziehen.

### 3. Konformation im Kristall und in Lösung

Die Röntgen-Strukturanalyse ist so weit ausgereift, daß man die räumliche Struktur insbesondere kleiner Moleküle routinemäßig erhält, wenn gute Kristalle zur Verfügung stehen. Genauigkeit und bildhafte Wiedergabe der Molekülgestalt werden von keiner anderen Methode übertroffen. Allerdings sind Röntgen-Strukturanalysen auf den kristallinen Zustand beschränkt. Da entsprechende Informationen für die Lösung meist fehlen, wird häufig leichtfertig die Kristallstruktur einfach auf die Lösung übertragen. Dies ist im allgemeinen nicht erlaubt.

Wenn die stabilste Konformation in Lösung von der im Kristall durch eine Energiebarriere von  $> 10\text{--}15\text{ kcal/mol}$  getrennt ist, läßt sich die Konformationsänderung durch Lösen des Kristalls bei tiefen Temperaturen und Aufnahme der NMR-Spektren in verschiedenen Zeitabständen, eventuell nach Aufwärmen, direkt verfolgen<sup>[50–54]</sup>. Es gelingt auf diese Weise häufig, NMR-Signale den Konformationen mit Sicherheit zuzuordnen.

Oft sind jedoch die Barrieren so niedrig, daß sich beim Lösen sofort Konformationsgleichgewichte einstellen. In solchen Fällen läßt sich durch die seit kurzem zum Routineverfahren entwickelte CP-MAS-Technik<sup>[19][55]</sup>, mit der man hochaufgelöste  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren vom Festkörper erhält, eine Brücke zur NMR-Spektroskopie gelöster Moleküle schlagen<sup>[55–60]</sup>. Diese Methode wird voraussichtlich auch in den Fällen, in denen keine ausreichend großen Einkristalle für die Röntgen-Strukturanalyse gezüchtet werden können, einen Konformationsvergleich fest-flüssig ermöglichen.

Ein Beispiel für derartige Untersuchungen ist die Konformationsanalyse der geschützten Aminosäure Boc-Phe-OH (*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-phenylalanin), die in zwei Konformationen im Kristall vorliegt<sup>[54, 59, 61]</sup>. Diese äquilibrieren in Lösung auch bei tiefen Temperaturen sofort und sind NMR-spektroskopisch nicht getrennt erfaßbar<sup>[54, 62]</sup>. Eine nachfolgende Umwandlung mit einer relativ hohen Barriere ( $\Delta G_{298}^{\ddagger} = 16.0\text{ kcal/mol}$ ) führt zu einer neuen, in Lösung stabileren Konformation<sup>[54, 62]</sup> (Fig. 6).

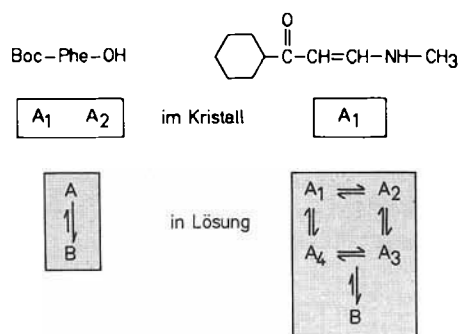


Fig. 6. Konformationsänderungen beim Lösen von Kristallen (siehe Text).

In einem anderen Fall, dem vinylogenen Amid in Figur 6, liegt im Kristall nur eine einzige Konformation vor, die in Lösung schnell zu vier instabileren Konformationen äquilibriert. Nach einiger Zeit lagern sich diese jedoch fast vollständig zu einer neuen – der stabilsten – Lösungskonformation um<sup>[59]</sup>.

Interessant sind auch die Befunde am cyclischen Tripeptid *cyclo*[Pro<sub>2</sub>-NBGly] (NBGly = *N*-(*o*-Nitrobenzyl)glycyl)<sup>[63]</sup>. Die Röntgen-Strukturanalysen zweier Kristallmodifikationen<sup>[64]</sup>, die aus  $\text{CCl}_4$  bzw. Methanol gezüchtet wurden, ergaben, daß in beiden die Boot-Konformation<sup>[53, 65, 66]</sup> in verschiedener räumlicher Umgebung vorliegt, obwohl in methanolischer Lösung die Kronen-Konformation<sup>[53, 65, 66]</sup> dominiert<sup>[63]</sup>. Eine aus Methanol durch schnelles Auskristallisieren erhaltene erste Kristallfraktion zeigte bei Aufnahme des Tieftemperatur- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der bei  $-50^\circ\text{C}$  gelösten Probe überwiegend die „Krone“, während die langsam auskristallisierenden, zur

Röntgen-Strukturanalyse verwendeten Kristalle die Boot-Konformation enthielten<sup>[63]</sup>.

Im amorphen Zustand und in Lösung liegen im allgemeinen verschiedene Konformationen vor. Wahrscheinlich werden diese Konformationen im amorphen Zustand – statistisch verteilt – eingefroren, so daß man im hochaufgelösten Festkörper- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum breite Linien als Folge intramolekularer Effekte (viele Konformationen) und von Packungseffekten (Unordnung der Moleküle) erhält. Hingegen wird man in Lösung zunächst eine schnelle Äquilibrierung zahlreicher Konformationen voraussetzen können. Nur in den Fällen, in denen die Energiebarrieren, die die Konformationen trennen, 5 bis 25 kcal/mol betragen, läßt sich aus den dynamischen NMR-Spektren eine detaillierte Aussage über die den Konformationsumwandlungen zugrunde liegenden molekularen Prozesse ableiten<sup>[67–69]</sup>. Die konformative Starrheit ist daher in der Regel auf Teilbereiche beschränkt; bei vielen Molekülen bleibt noch eine konformative Vielfalt, z. B. der Seitenketten, erhalten. Selbst für relativ starre Molekülbereiche wird am Anfang jeder Diskussion die Frage nach der konformativen Homogenität stehen. Häufig wird eine „gemittelte“ Konformation für flexible Moleküle angegeben. Da jedoch die NMR-Parameter (siehe Abschnitt 4) nicht linear von den geometrischen Parametern abhängen, ist eine solche Angabe physikalisch meistens sinnlos. Diesen Tatbestand hat Jardetzky besonders klar herausgestellt<sup>[70]</sup>. Bevor wir die Möglichkeiten zur Überprüfung der konformativen Homogenität darlegen, sollen die Informationen besprochen werden, die man auf diesem Gebiet aus NMR-Spektren erhalten kann.

#### 4. NMR-spektroskopische Methoden zur Konformationsanalyse von Peptiden

Die Konformation eines Peptidgerüsts („backbone“) kann durch die Winkel  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  beschrieben werden, während die der Seitenketten durch die Winkel  $\chi$  charakterisiert ist (Fig. 7)<sup>[71]</sup>.

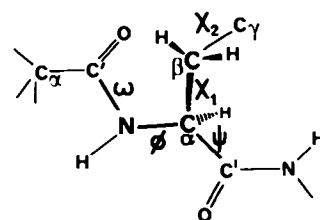


Fig. 7. Definition der Winkel in Peptiden. Die ekliptische Stellung der Bindungen entlang des Peptidgerüsts  $-\text{C}_\alpha-\text{C}'-\text{N}-\text{C}_\alpha-$  entspricht in dieser Reihenfolge einem Diederwinkel von  $0^\circ$ . Die rechtsgängige helicale Anordnung rechnet man positiv.

Einem NMR-Spektrum kann man die folgenden Parameter entnehmen:

- chemische Verschiebung  $\delta$
- skalare Kopplung  $J$  (indirekte, durch die Bindungen vermittelte Kopplung)
- Intensitäten
- Austauschverbreiterungen

[\*] CP-MAS steht für „Cross Polarization, Magic Angle Spinning“.

- dipolare Kopplung, die durch den Raum wirkt. Sie drückt sich in Relaxationsphänomenen, z. B. Spin-Gitter-Relaxationszeiten ( $T_1$ ) und Nuclear-Overhauser-Effekten (NOE), aus.

Hat man diese Parameter aus den Spektren *extrahiert*, so müssen sie den molekularen Strukturen *zugeordnet* werden. Die *Interpretation* der Daten ergibt schließlich die strukturelle Information (Fig. 8). Es sei darauf hingewiesen, daß gerade bei den relativ komplizierten NMR-Spektren von Peptiden durch fehlerhafte Datenextraktion sowie leichtfertig vorgenommene Zuordnung selbst bei kritischer Interpretation eine Reihe fragwürdiger Schlußfolgerungen zustande gekommen und publiziert worden ist. Es empfiehlt sich daher besonders auf diesem Gebiet, Literaturdaten kritisch zu überprüfen.

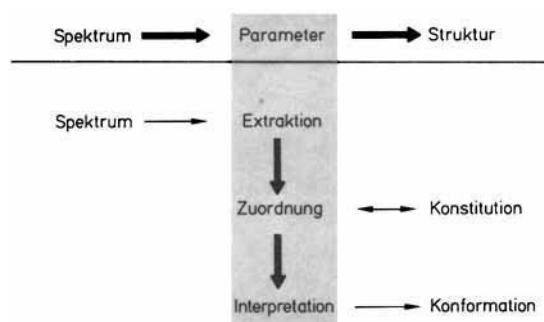


Fig. 8. Zur Auswertung der NMR-Spektren.

Bei der Zuordnung der Signale zu den Aminosäuren wird das Auffinden der Kopplungsmuster<sup>[72, 73]</sup> durch moderne zweidimensionale NMR-Techniken<sup>[74–76]</sup> (homonucleare<sup>[73, 77–79]</sup> und heteronucleare<sup>[76, 80, 81]</sup> 2D-J-aufgelöste Spektroskopie<sup>[82]</sup>,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -2D-Verschiebungskorrelation<sup>[76, 80, 81, 83–85]</sup> und homonucleare 2D-korrelierte Spektroskopie<sup>[11, 78, 80, 81, 85–87]</sup>) enorm erleichtert. Mit NOE-Differenzspektren<sup>[85, 88, 89]</sup> oder durch zweidimensionale NOE-Spektroskopie<sup>[90–94]</sup> wird die Sequenzanalyse von Peptiden möglich<sup>[11, 78, 86, 87, 95, 96]</sup>, für die früher selektiv deuterierte Derivate mühsam synthetisiert werden mußten<sup>[97, 98]</sup>. Liegen zwei Konformere in mäßig schnellem Austausch nebeneinander vor, so läßt sich durch Sättigungstransfer<sup>[53, 65, 99, 100]</sup> oder 2D-Austauschspektroskopie<sup>[94, 101–106]</sup> der Austausch individueller Kerne zwischen beiden Konformeren direkt sichtbar machen.

Die vielfältigen Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie bei der Aufklärung von Peptidkonformationen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Erste wichtige Hinweise auf die molekulare Struktur erhält man aus der Orientierung der Amidbindungen, die in der Regel durch Wasserstoffbrücken (intra- oder intermolekular sowie durch solche zum Lösungsmittel) festgelegt wird. Intermolekulare Brücken und solche zum Solvens werden im Gegensatz zu den intramolekularen Brücken bei Temperaturerhöhung leicht gespalten, weil die Entropieabnahme, die mit der Oligomerisierung und mit der Bindung des Solvens einhergeht, bei höherer Temperatur immer stärker zu Buche schlägt (Fig. 9). Dies gilt für alle Wasserstoffbrücken-bildenden Lösungsmittel; über DMSO-Lösungen liegen die meisten und die aussagekräftigsten Ergebnisse vor<sup>[25, 26, 97, 107–112]</sup>. Im allgemeinen be-

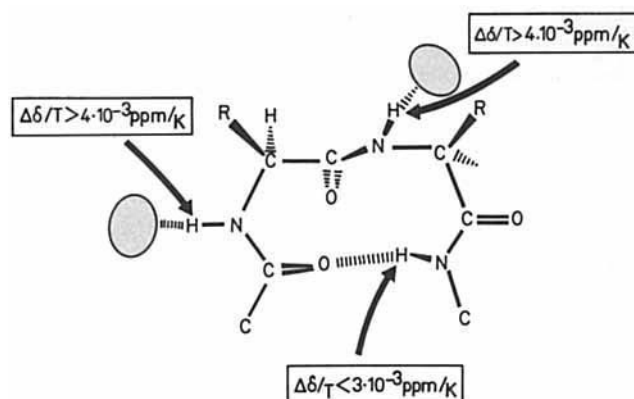


Fig. 9. Temperaturgradienten  $\Delta\delta/T$  der NH-Signale in Dimethylsulfoxid (DMSO) am Beispiel einer  $\beta$ -Schleife.

trachtet man Temperaturgradienten ( $\Delta\delta/T$ ) der NH-Signale in DMSO von über  $4 \times 10^{-3}$  ppm/K als Anzeichen externer NH-Orientierung, während Werte unter  $2 \times 10^{-3}$  ppm/K für eine Abschirmung vom Solvens sprechen<sup>[\*][97]</sup>.

Solvenseffekte können bei Konformationsuntersuchungen nur dann interpretiert werden, wenn sichergestellt ist, daß durch die Änderung des Mediums keine Konforma-

[\*] Die Definition des Temperaturgradienten der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta/T$  führt bei der heute üblichen Festlegung der  $\delta$ -Skala zu negativen Werten. In der Literatur werden die Gradienten aber aus historischen Gründen ( $\tau$ -Skala) positiv angegeben. Wir halten uns ebenfalls daran, d. h. ein positiver Wert bedeutet eine Verschiebung des NH-Signals zu höherem Feld mit steigender Temperatur.

Tabelle 1. Möglichkeiten zur Ermittlung der Konformation von Peptiden durch NMR-Spektroskopie.

Ursache	Beobachtung der spektralen Parameter	typische Information
Wechselwirkung mit der Umgebung	NH-Verschiebung als Funktion von: Solvens Temperatur	Orientierung der Amid-Bindung H-Brücken
Wechselwirkungen durch Bindungen	paramagnetisch induzierte spektrale Änderungen skalare Kopplungen: vicinale Kopplung geminale Kopplung von Glycin- $\text{H}_\alpha$ direkte Kopplung $^{13}\text{C}$ -H direkte Kopplung $^{15}\text{N}$ -H $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung	Unterscheidung zwischen peripheren und inneren Kernen Winkel $\phi$ , $\psi$ , $\chi$ Winkel $\psi$ $\text{C}_\alpha/\text{CO}$ -Winkel <i>cis/trans</i> -Isomerie der Amid-Bindung H-Brücken zum benachbarten CO
Wechselwirkung durch den Raum	chemische Verschiebung: $^1\text{H}$ (Anisotropie) $^{13}\text{C}$ (sterische und elektronische Effekte)	Orientierung aromatischer Seitenketten <i>cis/trans</i> -Isomerie an Prolin
Beweglichkeit	dipolare Kopplung: NOE-Effekte ( $^1\text{H}$ ) Linienkoaleszenzen Relaxationszeiten $^{13}\text{C}$ ( $T_1$ und NOE)	intramolekulare Protonenabstände Prozesse mit relativ hohen Barrieren Beweglichkeit von Seitenketten
chemischer Austausch	H/D-Austauschgeschwindigkeiten	Ausgesettheit von NH-Gruppen

tionsänderung induziert wird. Der Ersatz des als H-Brücken-Acceptor fungierenden Lösungsmittels DMSO durch  $\text{CDCl}_3$  bewirkt eine starke Hochfeldverschiebung der NMR-Signale exponierter NH-Gruppen (Fig. 10)<sup>[113, 114]</sup>.

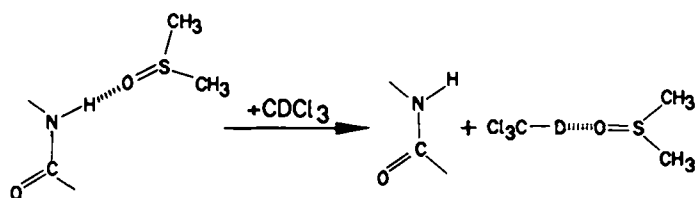


Fig. 10. Effekt der Titration einer DMSO-Lösung eines Peptides mit  $\text{CDCl}_3$ . Die Aufhebung der H-Brücke zum Solvens führt bei einem  $\text{CDCl}_3$ -Gehalt > 50% zu einer starken Hochfeldverschiebung des NH-Signals.

Da das zugesetzte  $\text{CDCl}_3$  mit DMSO assoziiert, tritt dieser Effekt deutlich bei  $\text{CDCl}_3$ -Gehalten über 50% in Erscheinung, weil dann für die Assoziation am Peptid nur noch wenig DMSO zur Verfügung steht<sup>[97]</sup>.

Umgekehrt können Solventien, die als H-Brücken-Donoren wirken, durch „Protonierung“ am Carbonylsauerstoff das NMR-Signal des benachbarten NH-Protons zu tiefem Feld verschieben (Fig. 11)<sup>[113, 114]</sup>. Dieser Effekt, der z. B. durch Trifluorethanol (TFE) erzeugt wird, ist häufig schlechter zu beobachten, weil der Zusatz protischer Solventien infolge von Konformationsänderungen unspezifische Verschiebungen induziert.

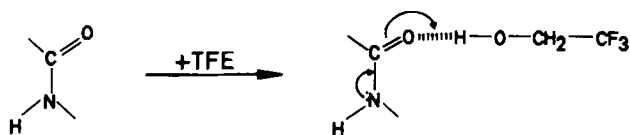


Fig. 11. Effekt des Zusatzes eines protischen Lösungsmittels (hier: TFE) zu einem Peptid. Man beobachtet eine Tieffeldverschiebung des NH-Signals durch die „Carbonylprotonierung“.

Von großer Bedeutung für die Konformationsanalyse sind die vicinalen Kopplungskonstanten  $^3J$ , deren Abhängigkeit vom Diederwinkel durch Karplus-Gleichungen beschrieben werden kann. Da diese Funktionen jedoch stark vom Substitutionstyp abhängen, wurden für die einzelnen Bindungen spezielle Gleichungen abgeleitet, in denen anhand eines umfangreichen experimentellen Materials die Koeffizienten empirisch ermittelt worden sind<sup>[115–117]</sup>. Besonders wichtig ist die leicht zugängliche homonucleare  $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$ -Kopplung, deren Wert vom Winkel  $\phi$  abhängt. Allerdings führen die Mehrdeutigkeit der Karplus-Kurve (einer gemessenen Kopplungskonstante entsprechen meist vier Winkelbereiche!) und die Fehlerbreite der Funktion selten zu eindeutigen Resultaten; vielmehr wird mit Kopplungskonstanten der Konformationsfreiraum nur eingegrenzt. Das Problem der Mehrdeutigkeit kann prinzipiell durch Auswertung weiterer Kopplungen für eine Bindung gelöst werden (Fig. 12). Das erfordert einerseits spezielle Spektrometerbedingungen oder aber die große Mühe der Synthese spezifisch mit  $^{13}\text{C}$  und/oder  $^{15}\text{N}$  angereicherter Peptide, denn die Heteroatom-Protonen-Kopplungen sind aus den Spektren schwer direkt ablesbar. Daher findet man nur wenige Beispiele für die komplette Auswertung vieler Kopplungen<sup>[116, 117]</sup>. Durch eine neue Methode der zweidimensionalen Spektroskopie<sup>[118]</sup>, mit

der man heteronucleare Kopplungen über mehr als eine Bindung besser bestimmen kann, könnte sich in Zukunft die Zugänglichkeit der gewünschten Parameter jedoch entscheidend verbessern.

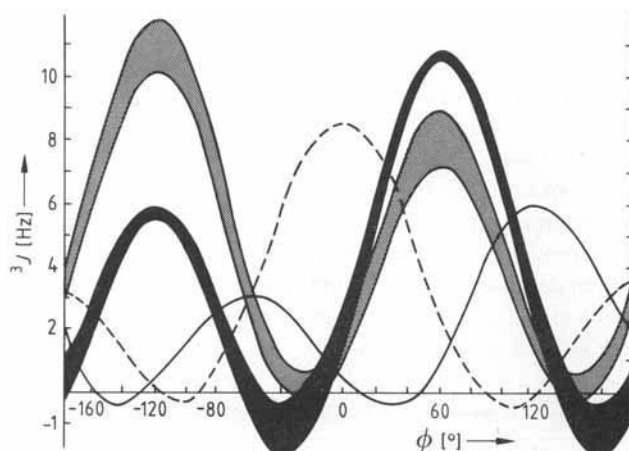


Fig. 12. Auswertung der vicinalen Kopplungskonstanten zur Ermittlung des Winkels  $\phi$  (nach Byström et al. [116]). ■:  $^3J(\text{H}-\text{NC}_\alpha-\text{H})$ ; ▨:  $^3J(^{13}\text{C}-\text{NC}_\alpha-\text{H})$ ; —:  $^3J(^1\text{H}-\text{NC}_\alpha-^{13}\text{C}_\beta)$ ; ---:  $^3J(^1\text{H}-\text{NC}_\alpha-^{13}\text{C}')$ . Zur Definition des Winkels  $\phi$  siehe Figur 7 ( $\phi$  bezieht sich auf die L-Form).

Anders verhält es sich bei der Seitenkettenkonformation (Winkel  $\chi$ ). Hier hat man fast immer von einem sich schnell einstellenden Gleichgewicht mehrerer Konformationen auszugehen, das sich durch Auswertung der vicinalen Kopplungskonstanten (z. B. des  $\alpha$ -Protons einer Aminosäure zu den beiden diastereotopen  $\beta$ -Protonen) analysieren läßt<sup>[115, 119, 120]</sup>. Besondere Beachtung verdient Prolin<sup>[27, 78, 121, 122]</sup> wegen seiner Bedeutung für den spezifischen Aufbau von Peptidstrukturen wie auch für die Faltung von Peptidketten in Proteinen<sup>[123, 124]</sup>. Einerseits wird durch die Fixierung im fünfgliedrigen Ring die Flexibilität der „Seitenkette“ beschränkt, andererseits ermöglicht die Pseudorotation innerhalb des Pyrrolidinringes ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht vieler Konformationen. Ursprünglich ging man bei der Diskussion der Prolin-Konformationen von zwei schnell äquilibrierenden Ramachandran-Konformationen<sup>[125]</sup> aus, jedoch zeigt die genauere Analyse, daß ein größerer Pseudorotationsbereich berücksichtigt werden muß<sup>[126–128]</sup>. Da man z. B. für die Bindung  $\text{C}_\beta-\text{C}_\gamma$  insgesamt vier vicinale Kopplungskonstanten (zwei *cis*- und zwei *trans*-Kopplungen) zur Ermittlung des Diederwinkels zur Verfügung hat, läßt sich aus den vicinalen Kopplungskonstanten das Gleichgewicht mehrerer Konformationen mit iterativen Rechnungen analysieren<sup>[128, 129]</sup>.

Aussagen über den Winkel  $\psi$  ( $\text{N}-\text{C}_\alpha-\text{C}'-\text{N}$ ) sind aus einfach zugänglichen vicinalen Kopplungen nicht zu erhalten, jedoch hängt bei Glycin die geminale Kopplung der beiden  $\alpha$ -Protonen von  $\psi$  ab<sup>[115, 130–132]</sup>. Neuerdings wird auch die Konstante  $J$  der direkten  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ -Kopplung für die Ermittlung von  $\psi$  und  $\phi$  vorgeschlagen<sup>[133, 134]</sup>. Aus  $^1J_{\text{NH}}$ , die durch die INEPT-Technik<sup>[\*]</sup><sup>[135, 136]</sup> leichter zugänglich geworden ist, läßt sich die *trans*-Konformation der Amidbindung (Winkel  $\omega = 180^\circ$ ) ablesen<sup>[85, 115]</sup>. In linearen und großen cyclischen Peptiden hat man bisher

[\*] INEPT steht für „Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer“.

stets *trans*-Peptidbindungen (*Z*-Konformationen) beobachtet.

In wenigen Fällen konnte die Fernkopplung der  $\alpha$ -Protonen zweier benachbarter Aminosäuren<sup>[137]</sup> oder eines  $\alpha$ -Protons und der  $\delta$ -Protonen in einem voranstehenden Prolin zur Zuordnung der Sequenz benutzt werden<sup>[78]</sup>.

Chemische Verschiebungen lassen sich in der Regel etwas schwieriger interpretieren. Ein Effekt, der sich in der Zukunft als sehr nützlich herausstellen könnte, ist die Tieffeldverschiebung eines  $^{15}\text{N}$ -NMR-Signals, wenn die der Aminogruppe benachbarte Carbonylgruppe an einer H-Brücke beteiligt ist<sup>[85, 138–140]</sup>. Bisher war eine derartige Information nicht zugänglich.

Bei chemischen Verschiebungen in der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie sind es vor allem Anisotropieeffekte von benachbarten Carbonylgruppen oder von aromatischen Seitenketten, die Aussagen über die molekulare Geometrie ermöglichen. So führt die Orientierung eines  $\alpha$ -Protons in die Ebene der Carbonylgruppe der in der Sequenz voranstehenden Aminosäure zu einer starken Tieffeldverschiebung (Fig. 13, vgl. z. B. [78, 85, 141, 142]). Ein charakteristisches Beispiel für Effekte aromatischer Seitenketten ist die Hochfeldverschiebung der  $\gamma$ -Protonen von Lysin 9 durch den benachbarten Indolring von Tryptophan 8 im aktiven Teil des Peptidhormons Somatostatin<sup>[143–146]</sup>. Dieser Effekt setzt die richtige Faltung der Peptidkette voraus, so daß er zur Diagnostik bei der Synthese aktiver Somatostatin-Analoga herangezogen werden kann<sup>[147]</sup>.

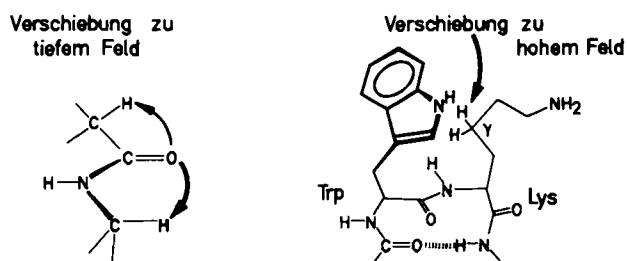


Fig. 13. Anisotropieeffekte auf die chemischen Verschiebungen der  $\gamma$ -Protonen von Lysin 9 durch benachbarte Carbonylgruppen und durch die aromatische Seitenkette von Tryptophan 8 des Somatostatins.

Amidbindungen in Peptiden liegen in der Regel in *trans*-Konformation (*Z*) vor. In Peptiden, die *N*-Alkylamino-säuren enthalten, ist jedoch immer mit beiden Konformationen zu rechnen. Die chemische Verschiebung von  $C_\beta$  und  $C_\alpha$  in Prolinringen gibt jedoch eine klare Auskunft über die Stereochemie an dieser Bindung<sup>[27, 37, 148]</sup> (Fig. 14).

Eine quantitative Beziehung zwischen der Differenz der chemischen Verschiebung von  $C_\beta$  und  $C_\gamma$  in Prolin und dem Winkel  $\psi$  wurde von Siemion et al. vorgeschlagen<sup>[149]</sup> und auch mehrfach zur Konformationsanalyse benutzt. Nach unseren Erfahrungen hält sie jedoch einer kritischen Überprüfung nicht stand<sup>[98]</sup>.

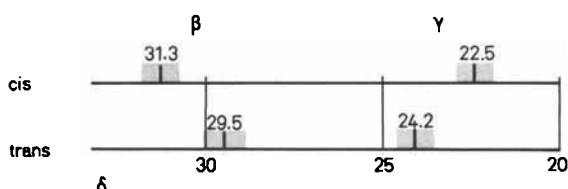


Fig. 14. Typische chemische Verschiebungen der  $C_\beta$ - und  $C_\gamma$ -Atome in prolinhaltigen Peptiden für *cis*- und *trans*-Xxx-Pro-Amidbindungen.

In neuerer Zeit sind Nuclear-Overhauser-Effekte (NOE)<sup>[150]</sup> experimentell besser zugänglich geworden<sup>[88–94]</sup>. Sie drücken sich im eindimensionalen NMR-Spektrum durch Intensitätsänderungen von Signalen beim Einstrahlen der Resonanzfrequenz eines räumlich benachbarten Kernes aus. Da die homonuclearen, intramolekularen NOEs zwischen Protonen vom dipolaren Relaxationsmechanismus bestimmt werden, gibt es eine Korrelation mit dem Abstand der Protonen. NOEs können meist nur beobachtet werden, wenn die Protonen weniger als 3–4 Å voneinander entfernt sind. In kleinen Molekülen (bis etwa cyclischen Hexapeptiden) sind bei mittleren Feldstärken (z. B. in einem 270 MHz-Spektrometer) unter normalen Bedingungen (Raumtemperatur, DMSO-Lösung) die NOEs positiv. Sie werden in Proteinen und bei größeren Feldstärken negativ. Im letzteren Fall sind auch Spin-Diffusionen<sup>[151, 152]</sup> zu beachten, weshalb man die Zeitabhängigkeit des NOE-Aufbaus mitberücksichtigen muß<sup>[91, 153–155]</sup>. Für Einzelheiten sei auf die zitierte Literatur verwiesen.

Die NMR-Spektroskopie bietet auch die Möglichkeit, Informationen über die molekulare Dynamik zu erhalten. Bei Austauschphänomenen, z. B. dem Übergang zwischen mehreren Konformationen oder dem Austausch von NH-Protonen mit dem Lösungsmittel, findet man Linienverbreiterungen und Signalkoaleszenzen, wenn die Barrieren 5–25 kcal/mol betragen<sup>[67–69]</sup>. Derartige Konformationsgleichgewichte treten vor allem bei Rotationen um die Amidbindung in prolinhaltigen Peptiden<sup>[156]</sup> (Rotationsbarriere: ca. 20 kcal/mol) und bei kleineren cyclischen Peptiden<sup>[50–53, 65, 66, 141, 142, 157, 158]</sup> auf, in denen der Ringschluß die sonst vielfältige und relativ freie konformative Beweglichkeit vermindert. Schnellere Prozesse, z. B. die Bewegungen von Seitenketten in größeren Peptiden, können durch Messung von  $^{13}\text{C}$ -Spin-Gitter-Relaxationszeiten ( $T_1$ ) erfaßt werden, wenn durch gleichzeitige Messung der heteronuclearen NOE-Effekte der dipolare Relaxationsmechanismus gesichert ist<sup>[37, 41, 159, 160]</sup>.

Obwohl prinzipiell aus chemischen Reaktionen nur bedingt auf thermodynamische Stabilitäten geschlossen werden darf, hat sich die Messung der Austauschgeschwindigkeiten von Amidprotonen mit Deuteronen (aus zugefügtem  $\text{D}_2\text{O}$ ) in einigen Fällen als Hinweis auf die Ausgetztheit von NH-Gruppen erwiesen<sup>[161, 162]</sup>. Die Austauschgeschwindigkeiten lassen sich auch messen, indem man das  $\text{H}_2\text{O}$ -Signal sättigt und die Sättigungsübertragung<sup>[99, 163]</sup> auf die NH-Signale verfolgt<sup>[164–166]</sup>. Sicher wird man in Kürze auch die 2D-Austauschspektroskopie für derartige Untersuchungen häufiger heranziehen<sup>[167]</sup>. Wenn das cyclische Peptid eine Konformation sehr stark bevorzugt, wird die Austauschgeschwindigkeit der nach außen gerichteten NH-Protonen viel größer sein als die der nach innen orientierten, womöglich noch an intramolekularen Wasserstoffbrücken beteiligten NH-Protonen. Letztere können allerdings auch dann schnell austauschen, wenn ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht mit einer (geringer populierte) anderen Konformation vorliegt, in der ein noch schnellerer Austausch der fraglichen NH-Protonen stattfinden kann. Deshalb muß man bei der Interpretation von Austauschgeschwindigkeiten vorsichtig vorgehen.

Die NMR-Spektroskopie ist also eine vielseitige Methode, mit der sich Informationen zur Bestimmung von Peptidstrukturen in Lösung gewinnen lassen. Diese Übersicht

kann natürlich nicht die einzelnen Techniken erläutern, sondern nur Hinweise auf die Anwendungsmöglichkeiten geben.

## 5. Konformative Homogenität in Lösung

In Abschnitt 3 wurde betont, daß die Frage nach der Sicherung der konformativen Homogenität immer zuerst gestellt werden muß. Der Grund dafür, warum von diesem Prinzip in diesem Bericht abgegangen wurde, ist, daß man zunächst die NMR-Techniken zur Konformationsanalyse kennen sollte, ehe man der Frage nach konformativer Homogenität detailliert nachgehen kann.

Bei Peptiden in Lösung hat man von einem sich schnell einstellenden Gleichgewicht zwischen vielen Konformationen auszugehen. Allerdings ist die Beweglichkeit in den Bereichen eines Peptidmoleküls sehr unterschiedlich. Während z. B. in kleinen cyclischen Peptiden die Beweglichkeit des Peptidgerüsts („backbone“) stark beschränkt ist, werden Seitenketten häufig einen relativ großen Bewegungsfreiraum haben.

Die Aussagen über die Anwendung NMR-spektroskopischer Techniken in Abschnitt 4 (ähnliches gilt auch für andere Methoden der Konformationsanalyse) gelten nur dann streng, wenn das Peptid nur eine einzige Konformation einnimmt oder eine Konformation in Gleichgewicht so stark dominiert, daß die anderen Konformationen die spektralen Parameter nicht beeinflussen. Angaben über eine „gemittelte“ Konformation sind mit großer Vorsicht zu beurteilen<sup>[70]</sup>. Da es nur indirekte Hinweise auf konformative Homogenität gibt, können die Aussagen immer nur Wahrscheinlichkeitscharakter haben. Es ist erst die Summe aller Aussagen, die eine Deutung „sichert“.

Generell benutzt man Unterschiede der chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten und Temperaturabhängigkeit zwischen den verschiedenen Aminosäureeinheiten als Hinweis auf konformative Homogenität: Je geringer diese Unterschiede sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein sich schnell einstellendes Konformationsgleichgewicht eine Mittelung dieser Parameter erzeugt. Dies sei am Beispiel der cyclischen Pentapeptide demonstriert. Sie interessieren besonders, weil sie die kleinsten cyclischen Peptide mit spannungsfreier *trans*-Konformation aller Peptidbindungen sind und eine relativ stark eingeschränkte Beweglichkeit erwarten lassen. *cyclo*[Gly<sub>5</sub>] und *cyclo*[Phe<sub>5</sub>] weisen im <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum jeweils nur einen einzigen Signalsatz für Glycin bzw. Phenylalanin auf<sup>[97, 168]</sup>. Als Deutungsmöglichkeit kommt eine C<sub>5</sub>-Symmetrie des Moleküls<sup>[169]</sup> oder ein fünffach entartetes, sich schnell einstellendes Gleichgewicht einer oder mehrerer Konformationstypen<sup>[\*]</sup><sup>[170, 171]</sup> (gemittelte C<sub>5</sub>-Symmetrie) in Frage. Für die letztere Deutung sprechen die mittleren Temperaturgradienten der NH-Signale:  $\Delta\delta/T = 2.96 \times 10^{-3}$  ppm/K (Gly) bzw.  $3.71 \times 10^{-3}$  ppm/K (Phe). Führt man nun eine „Störung“ der Symmetrie ein, indem man das *pro-S*-Proton eines Glycinrestes durch eine Methylgruppe ersetzt (*cyclo*[Ala-Gly<sub>4</sub>])<sup>[98]</sup>, so werden die Temperaturgradienten unterschiedlich (Fig. 15). Offenbar bevorzugt die Methylgruppe eine Position in der Konfor-

mation (oder den Konformationen), deren schnelles entartetes Gleichgewicht die C<sub>5</sub>-Symmetrie bei der Verbindung ohne Methylgruppe vortäuscht. In *cyclo*[Phe-Gly<sub>4</sub>]<sup>[97, 98, 168]</sup> mit noch größerer Seitenkette (Benzylgruppe) wird die Differenzierung der Temperaturgradienten noch deutlicher; zugleich werden auch die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der diastereotopen Glycin- $\alpha$ -Protonen immer unterschiedlicher<sup>[168]</sup>. Daraus kann man schließen, daß in *cyclo*[Phe-Gly<sub>4</sub>] eine Konformation im Gleichgewicht dominiert. Nachdem die Zuordnung der Signale durch Synthese von spezifisch deuterierten Derivaten gelungen war, konnten die NMR-Parameter interpretiert werden<sup>[98]</sup>: Am wahrscheinlichsten ist demnach eine  $\gamma,\gamma$ -Konformation<sup>[109, 111]</sup> (vgl. Fig. 17).

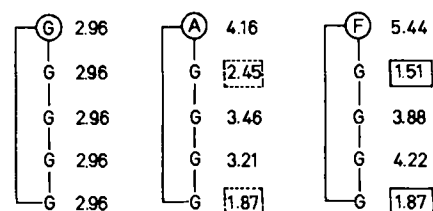


Fig. 15. Temperaturgradienten der NH-Signale dreier cyclischer Pentapeptide vom Typ *cyclo*[Xxx-Gly<sub>4</sub>] in DMSO [10<sup>-3</sup> ppm/K] (siehe Text); G = Gly, A = Ala, F = Phe (internationale Einbuchstabensymbole).

Bei drei der acht möglichen cyclischen Pentapeptide, die nur L-Phenylalanin und Glycin enthalten, ergaben sich derartige Hinweise auf konformative Homogenität, die sich z. B. in deutlicher Differenzierung der Temperaturgradienten ausdrückt (Fig. 16). Die restlichen Cyclopentapeptide sind daher als Mischungen anzusehen und somit für Konformationsstudien nicht geeignet.

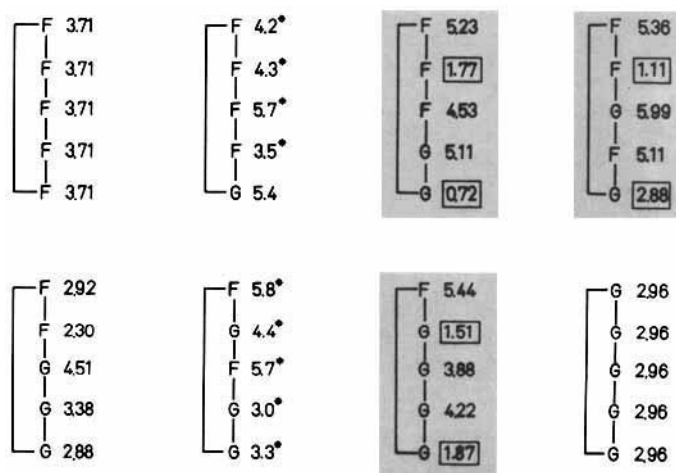


Fig. 16. Temperaturgradienten der NH-Signale sämtlicher cyclischer Pentapeptide aus L-Phe (F) und Gly (G) in DMSO [10<sup>-3</sup> ppm/K]. Die drei Peptide auf schattiertem Grund sind wahrscheinlich konformativ homogen. Die mit Sternchen versehenen Werte wurden sequenziell nicht zugeordnet.

Bisher wurden ca. 20 cyclische Peptapeptide untersucht, die vermutlich konformativ homogen sind<sup>[85, 97, 98, 109–111, 172–180]</sup>. Sie zeigen überwiegend zwei konformative Grundtypen, die zwei intramolekulare Wasserstoffbrücken enthalten: die  $\beta,\gamma$ - und die  $\gamma,\gamma$ -Konformation (Fig. 17).

Ziel derartiger Untersuchungen ist es, herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen Art und Position von Aminosäuren besteht. Die bisherigen Ergebnisse an cycli-

[\*] In [168] wird gezeigt, daß z. B. folgende Umwandlungen ohne große Barriere leicht möglich sind:  $\beta_1\gamma_2 \rightleftharpoons \gamma_1\gamma_2 \rightleftharpoons \gamma_1\beta_2$  usw.



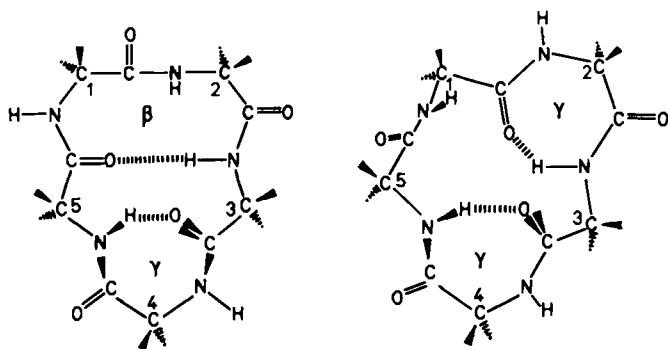


Fig. 17. Die beiden wichtigsten Konformationen cyclischer Pentapeptide.

schen Pentapeptiden decken folgende Regelmäßigkeiten auf<sup>[109, 111]</sup>:

- In Position 3 (Fig. 17) ist stets Glycin oder eine D-Aminosäure zu finden
- Position 4 in der  $\gamma$ -Schleife wird häufig von sterisch sehr anspruchsvollen Aminosäuren (Pro, Val, Phe, Aib) eingenommen
- Prolin bevorzugt die Positionen 1 oder 4.

Mit Kenntnis dieser und anderer Befunde sollte es möglich werden, die stabilste Konformation eines Peptids bei gegebener Sequenz der Aminosäuren vorherzusagen oder eine geeignete Sequenz für den Aufbau einer gewünschten Konformation zu wählen.

Diese Untersuchungen zeigten auch, daß für die Dominanz einer Peptidkonformation die Art der Seitenkette einer Aminosäure weniger entscheidend ist als die Konfiguration. So liegen z. B. die vier cyclischen Pentapeptide in Figur 18, deren gemeinsames Merkmal die Sequenz von drei L-Aminosäure- und zwei Glycinresten ist, in DMSO in der gleichen Konformation vor; der Ersatz von L-Phe in Position 2 im cyclischen Peptid *cyclo*[Phe<sub>3</sub>Gly<sub>2</sub>] durch D-Phe führt dagegen zu deutlich anderen NMR-Parametern<sup>[97, 98, 111]</sup>. In Figur 18 werden als spektrales Charakteristikum die Temperaturgradienten der NH-Signale verglichen. Die anderen NMR-Parameter verhalten sich analog<sup>[98, 111]</sup>.

F	4.97*	F	5.23	S <sup>tBu</sup>	5.59	F	5.13	F	5.35
D-F	4.30	F	1.77	F	3.28	L	1.50	M	1.28
F	3.97*	F	4.53	F	5.38	Y	4.49	Y	5.04
G	4.84*	G	5.11	G	5.68	G	5.08	G	5.17
G	3.65*	G	0.72	G	-0.86	G	1.14	G	1.49

Fig. 18. Temperaturgradienten der NH-Signale einiger cyclischer Pentapeptide in DMSO [ $10^{-1}$  ppm/K]. Die beiden ersten Peptide von rechts sind die cyclischen Enkephaline. F = L-Phe, D-F = D-Phe, G = Gly, L = Leu, M = Met, S-tBu = Ser(O-tBu), Y = Tyr.

Dieser geringe Einfluß der Seitenketten auf die bevorzugte Konformation des Peptidgerüsts gilt natürlich nicht allgemein. Beispielsweise bewirkt der Ersatz von Phenylalanin durch Serin in der  $i+2$ -Position einer  $\beta$ -Schleife zunehmende Instabilität der Schleife<sup>[110, 181]</sup>, wie auch Serin dafür bekannt ist, daß es  $\beta$ -Strukturen unterbricht<sup>[182, 183]</sup>.

Abschließend seien die wichtigsten Kriterien noch einmal zusammengefaßt. Indizien für konformative Homogenität sind:

- starke Differenzierung der Temperaturgradienten der NH-Signale
- starke Differenzierung in den chemischen Verschiebungen gleichartiger Aminosäuren in der Sequenz
- große Aufspaltungen der chemischen Verschiebungen von diastereotopen Glycinprotonen
- starke Differenzierung von vicinalen Kopplungen zu diastereotopen Protonen (NH zu den beiden  $\alpha$ -Protonen in Glycin,  $C_{\alpha}H$  zu zwei diastereotopen  $\beta$ -Protonen)
- große Unterschiede in den NH- $C_{\alpha}H$ -Kopplungskonstanten (ein Wert um 7.5 Hz wird auch als Mittelwert bei freier Beweglichkeit interpretiert werden können).

Indizien für konformative Heterogenität sind neben dem Fehlen dieser Kriterien:

- Nichtlinearität der Temperaturgradienten der NH-Signale
- Änderung von Kopplungskonstanten bei Wechsel des Lösungsmittels.

## 6. Konformation cyclischer Peptide mit Wirksequenzen

Die Notwendigkeit, die Beweglichkeit von Peptiden einzuschränken, um Aussagen über die Konformation zu erhalten, wurde bereits mehrfach erkannt<sup>[27-31, 97]</sup>. Bisher sind Struktur-Aktivitäts-Beziehungen jedoch vor allem durch Veränderung der Konstitution geprüft worden. Bemerkenswerte Ansätze zur Einbeziehung der Konformation stammen z. B. von Hruby et al. (Oxytocin)<sup>[21]</sup> und vor allem von Veber et al. (Somatostatin). Die einzelnen Phasen der Entwicklung des biologisch sehr aktiven Minisomatostatins können als Musterbeispiel dieser Forschungsrichtung angesehen werden und sollen daher kurz nachvollzogen werden.

Somatostatin<sup>[184]</sup>, ein Tetradecapeptid, das durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys-3 und Cys-14 cyclisiert ist (siehe Fig. 1), wird im Hypothalamus und anderen Zellen des endokrinen Systems (z. B. Pankreas-D-Zellen) gebildet<sup>[185, 186]</sup>. Es inhibiert die Ausschüttung von Peptidhormonen wie Glucagon, Insulin, Gastrin, Secretin und Wachstumshormon<sup>[185, 186]</sup>. Aktivitätsstudien an Derivaten zeigten sehr bald, daß die Aminosäuren Ala-1 und Gly-2, die nicht dem Ring angehören, ohne Wirkungsverlust entfernt werden können und daß der Ersatz von Tryptophan-8 durch sein Enantiomer (D-Trp) die Wirkung auf etwa das Achtfache steigert<sup>[187-189]</sup>. Dieser Befund wurde zusammen mit den Resultaten vieler NMR-Arbeiten am Somatostatin<sup>[143-146]</sup> dahingehend interpretiert, daß die Aminosäuren Phe<sup>7</sup>-Trp<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Thr<sup>10</sup> an einer  $\beta$ -Schleife beteiligt sind. Nachdem die Arbeitsgruppe von Veber unter anderem zunächst carbacyclische Derivate<sup>[28, 29, 31]</sup> sowie bicyclische Derivate<sup>[29, 30]</sup> mit immer kleineren Ringen hergestellt hatte, gelang es, ein sehr wirksames cyclisches Hexapeptid („Minisomatostatin“) zu synthetisieren<sup>[147, 190, 191]</sup>. In diesem wurde die aktive Sequenz 7-10 lediglich durch Phe-

[\*] Die NMR-Untersuchungen zeigten allerdings auch, daß Somatostatin in Lösung noch recht flexibel ist [143, 146].

nylalanin und Prolin überbrückt. Richtungsweisend waren die NMR-Ergebnisse der bicyclischen Strukturen und Computer-Berechnungen möglicher Brücken bei Erhaltung der biologisch aktiven Konformation<sup>[147]</sup>. Obwohl auch hier eine ganze Reihe von Derivaten synthetisiert wurde, führte doch die Kombination spektroskopischer Methoden mit Konformationsberechnungen und Aktivitätsstudien zu einer drastischen Verringerung der Anzahl von Derivaten, die zu synthetisieren und auf biologische Aktivität zu testen waren.

Es ist zu erwarten, daß cyclische Derivate der Enkephaline<sup>[111, 192-200]</sup> oder der aktiven Sequenzen anderer Hormone ebenfalls dazu beitragen, Beziehungen zwischen Konformation und Wirkung aufzuklären.

## 7. Schlußbemerkung und Ausblick

Die NMR-Spektroskopie ist als Sonde zur Erkennung der molekularen Konformation so hervorragend geeignet, weil sie auf individuelle Atome in ihrer spezifischen Umgebung anspricht. Da sie bevorzugt auf Moleküle in Lösung anwendbar ist, erfüllt sie die Voraussetzungen für die Untersuchung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen. Überdies liefert sie auch vielfältige Informationen über die molekulare Dynamik.

Einen großen Fortschritt für Auflösung und Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie brachte die Verwendung supraleitender Magneten. Bahnbrechend wirkt sich allerdings auch die stürmische, immer noch andauernde Entwicklung der NMR-Techniken auf Anwendbarkeit der Methode zur Lösung mehr und mehr komplizierter Probleme aus. Selbst die Spektren komplizierter Naturstoffe lassen sich jetzt sicher analysieren und zuordnen.

Eine wichtige Funktion von Naturstoffen ist neben Energie- und Stofftransport die Übertragung von Information. Diese beruht auf schwachen Wechselwirkungen mit der Umgebung (z. B. Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung, Enzym-Substrat-Wechselwirkung, Intercalation in Nucleinsäuren, Einbau in Membranen).

Einzelne schwache Wechselwirkungen sind wegen ihrer geringen Größe energetisch schwer erfaßbar; sie finden jedoch ihre geometrische Entsprechung in Konformationsänderungen der involvierten Moleküle. Der Ordnung in Kristallen, die durch Röntgen-Strukturanalyse anschaulich abgebildet werden kann, steht in Lösung eine größere konformative Vielfalt gegenüber. Der Einfluß des Lösungsmittels, eine Komplexbildung mit Metallionen oder einem biologischen Rezeptor vermag die Konformation zu verändern. Schon kann man solche Änderungen beim Einbau von Molekülen in Membranen NMR-spektroskopisch verfolgen. Derartigen Untersuchungen, die mir eine Voraussetzung zum „konformativen drug design“ zu sein scheinen, gehört die Zukunft.

Die hier zitierten eigenen Arbeiten verdanke ich der Mitwirkung der als Koautoren zitierten Mitarbeiter. Besonders möchte ich Professor R. Geiger, Hoechst AG, für die vielfältigen Anregungen und die Stimulierung unserer Arbeiten danken. Finanzielle Unterstützung und Chemikalien-Spenden erhielten wir durch die Hoechst AG, die Degussa, die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie.

Eingegangen am 5. Mai 1982 [A 417]

- [1] Lord Alexander R. Todd, Festvortrag „Chemie in Vergangenheit und Gegenwart“ anlässlich der Verleihung des „Goldenen Doktordiploms“ der Universität Frankfurt am Main, 16. Oktober 1981.
- [2] E. J. Ariens: *Drug Design* (Medicinal Chemistry Series), Academic Press, New York, Vol. 1, 2 1971, Vol. 3 1972, Vol. 4 1973, Vol. 5, 6 1975, Vol. 7 1976, Vol. 8 1978, Vol. 9 1979, Vol. 10 1980, Vol. 11, im Druck.
- [3] Y. C. Martin: *Quantitative Drug Design*, Marcel Dekker, New York 1978.
- [4] J. K. Seydel, K. J. Schaper: *Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen. Methoden der QSWA*, Verlag Chemie, Weinheim 1979.
- [5] H. König, *Angew. Chem.* 92 (1980) 802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 749.
- [6] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 305.
- [7] D. H. R. Barton, *Angew. Chem.* 82 (1970) 827; *Nobel Lectures Chemistry 1963-1970*, Elsevier, Amsterdam 1972, S. 298.
- [8] A. J. Hopfinger, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7196, zit. Lit.
- [9] a) I. Z. Siemion, G. Kupryszewski: *Peptides* 1978, Wrocław University Press, Wrocław 1979; b) D. H. Rich, P. K. Bhatnagar, M. S. Bernatowicz in [9a], S. 349.
- [10] C. Bösch, L. R. Brown, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* 603 (1980) 298.
- [11] G. Wider, K. H. Lee, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 367.
- [12] F. E. Bloom, *Spektrum Wissenschaft* 1981, Nr. 12, S. 73; *Sci. Am.* 245, Nr. 10.
- [13] D. E. Wright, V. J. Hruby, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6338.
- [14] D. E. Wright, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 268.
- [15] a) A. Eberle, R. Geiger, T. Wieland: *Perspectives in Peptide Chemistry*, Karger, Basel 1981; b) J. S. Morley in [15a], S. 329.
- [16] S. Blumberg, V. I. Teichberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90 (1979) 347.
- [17] N. Yanaihara, M. Yanaihara, H. Sato, Y. Iizuka, T. Hashimoto, S. Sakagami in von Euler, Pernow: *Substance P, Nobel Symposium 37*, Raven Press, New York 1977, S. 27.
- [18] a) E. Gross, J. Meienhofer: *Peptides, Proceedings of the Sixth American Peptide Symposium*, Pierce Chem. Comp., Rockford, Ill. 1979; b) D. F. Veber in [18a], S. 409.
- [19] G. Goldstein, M. P. Scheid, E. A. Boyse, D. H. Schlesinger, J. van Wauwe, *Science* 204 (1979) 1309.
- [20] A. Eberle, R. Schwyzler, *Helv. Chim. Acta* 58 (1975) 1528.
- [21] V. J. Hruby in [15a], S. 207.
- [22] R. J. P. Williams, *Angew. Chem.* 89 (1977) 805; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 766.
- [23] Vgl. A. N. Eberle, V. M. Kriwaczek, D. Schulster in [15a], S. 407.
- [24] P. S. Farmer in [2], Vol. 10, S. 119.
- [25] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* 30 (1974) 1871.
- [26] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* 31 (1975) 2177.
- [27] C. M. Deber, V. Madison, E. R. Blout, *Acc. Chem. Res.* 9 (1976) 106.
- [28] D. F. Veber, R. G. Strachan, S. J. Bergstrand, F. W. Holly, C. F. Homnick, R. Hirschmann, M. L. Torchiana, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2367.
- [29] D. F. Veber, F. W. Holly, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, S. F. Brady, R. Hirschmann, M. S. Glitzer, S. Saperstein, *Nature* 280 (1979) 512.
- [30] R. F. Nutt, D. F. Veber, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6539.
- [31] a) D. H. Rich, E. Gross: *Peptides, Synthesis-Structure-Function*, Pierce Chem. Comp., Rockford, Ill. 1981; S. F. Brady, R. F. Nutt, F. W. Holly, W. J. Paleveda, R. G. Strachan, S. J. Bergstrand, D. F. Veber, R. Saperstein in [31a], S. 653.
- [32] J. A. Smith, L. G. Pease, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8 (1980) 315.
- [33] H. R. Wyssbrod, W. A. Gibbons, *Surv. Prog. Chem.* 6 (1973) 209.
- [34] V. J. Hruby in B. Weinstein: *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Marcel Dekker, New York 1974, Vol. 3, S. 1.
- [35] L. C. Craig, D. Cowburn, H. Bleich, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 477.
- [36] K. Wüthrich: *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, North-Holland, Amsterdam 1976.
- [37] a) G. C. Levy: *Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Wiley-Interscience, New York; b) R. Deslauriers, I. C. P. Smith in [37a], Vol. 2, 1976, S. 1.
- [38] W. A. Thomas, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* B6 (1976) 1.
- [39] H. W. E. Rattle, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* A11 (1981) 2.
- [40] V. F. Bystron, A. S. Arseniev, Y. D. Gavrilov, *J. Magn. Reson.* 30 (1978) 151.
- [41] R. Deslauriers, I. C. P. Smith in L. J. Berliner, J. Reuben: *Biological Magnetic Resonance*, Plenum Press, New York 1980, Vol. 2, S. 243.
- [42] O. Jardetzki, G. C. K. Roberts: *NMR in Molecular Biology*, Academic Press, New York 1981.
- [43] a) E. Gross, J. Meienhofer: *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York 1981, Vol. 4; b) J. Cunniff, T. Blundell in [43a], S. 55.

- [44] a) M. Goodman, J. Meienhofer: *Peptides. Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium*, Wiley, New York 1977; b) E. Benedetti in [44a], S. 257.
- [45] I. L. Karle in [43a], S. 1.
- [46] R. T. Ingwall, M. Goodman in H. N. Rydon: *International Review of Science. Organic Chemistry*, Series Two, Vol. 6, Butterworths, London 1976, S. 153.
- [47] G. C. Barrett in D. H. Hey: *MPT International Review of Science. Organic Chemistry*, Series One, Vol. 6, Butterworths, London 1973, S. 77.
- [48] K. Blaha in [9a], S. 63.
- [49] H. Scheraga in [43a], S. 246.
- [50] K. Titlestad, *Acta Chem. Scand. B* 29 (1975) 153.
- [51] K. Titlestad, *Acta Chem. Scand. B* 31 (1977) 641.
- [52] K. Titlestad, *Acta Chem. Scand. B* 30 (1976) 753.
- [53] H. Kessler, P. Krämer, G. Krack, *Isr. J. Chem.* 20 (1980) 188.
- [54] J. W. Bats, H. Fuess, H. Kessler, R. Schuck, *Chem. Ber.* 113 (1980) 520.
- [55] J. Schaefer, E. O. Stejskal in [37a], Vol. 3, 1979, S. 284.
- [56] J. G. Hexem, M. H. Frey, S. J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 224.
- [57] G. R. Hays, R. Huis, B. Coleman, D. Clague, J. W. Verhoeven, F. Rob, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5140.
- [58] L. G. Pease, M. H. Frey, S. J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 467.
- [59] H. Kessler, G. Zimmermann, H. Förster, J. Engel, G. Oepen, W. S. Sheldrick, *Angew. Chem.* 93 (1981) 1085; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 1053.
- [60] H. Kessler, W. Bermel, H. Förster, *Angew. Chem.*, im Druck.
- [61] E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, G. M. Bonora, *Int. J. Biol. Macromol.* 2 (1980) 217.
- [62] M. Branik, H. Kessler, *Chem. Ber.* 108 (1975) 2176.
- [63] H. Kessler, R. Siegmeyer, unveröffentlicht.
- [64] J. Bats, H. Fuess, persönliche Mitteilung.
- [65] H. Kessler, P. Kondor, G. Krack, P. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2548.
- [66] H. Kessler in R. H. Sarma: *Stereodynamics of Molecular Systems*, Pergamon Press, New York 1979, S. 187.
- [67] H. Kessler, *Angew. Chem.* 82 (1970) 237; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 219.
- [68] L. M. Jackman, F. A. Cotton: *Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Academic Press, New York 1975.
- [69] G. Binsch, H. Kessler, *Angew. Chem.* 92 (1980) 445; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 411.
- [70] O. Jardetzky, *Biochim. Biophys. Acta* 621 (1980) 227.
- [71] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Mol. Biol.* 52 (1970) 1; *Biochemistry* 9 (1970) 3471.
- [72] Siehe [36], S. 27.
- [73] K. Nagayama, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* 114 (1981) 365.
- [74] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 229.
- [75] R. Freeman, *Proc. R. Soc. London A* 373 (1980) 149.
- [76] H. Kessler, D. Ziessow, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, im Druck.
- [77] K. Nagayama, K. Wüthrich, P. Bachmann, R. R. Ernst, *Naturwissenschaften* 64 (1977) 581; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78 (1977) 99.
- [78] H. Kessler, W. Bermel, A. Friedrich, G. Krack, W. E. Hull, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [79] G. Wider, R. Baumann, K. Nagayama, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 42 (1981) 73.
- [80] R. Schuck, H. Kessler, Vortrag auf der 3. GDCh-Fachgruppentagung Magnetische Resonanzspektroskopie, Bad Nauheim, Sept. 1981; Symposium Application of NMR in France and Germany, Pont-à-Mousson, Frankreich, März 1982.
- [81] R. Schuck, Dissertation, Universität Frankfurt 1982.
- [82] L. Müller, A. Kumar, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 65 (1976) 839.
- [83] G. A. Morris, L. D. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4703.
- [84] A. Bax, G. A. Morris, *J. Magn. Reson.* 42 (1981) 501.
- [85] H. Kessler, W. Hehllein, R. Schuck, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [86] G. Wagner, A. Kumar, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* 114 (1981) 375.
- [87] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 347.
- [88] W. A. Gibbons, D. Crepau, J. Delayre, J. J. Dunand, G. Hajdukovic, H. R. Wyssbrod in R. Walter, J. Meienhofer: *Peptides*, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Mich. 1975, S. 127.
- [89] M. Kuo, W. A. Gibbons, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 6278.
- [90] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4546.
- [91] A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 1.
- [92] W. Braun, C. Bösch, L. R. Brown, N. Go, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 377.
- [93] R. Baumann, A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 44 (1981) 76.
- [94] S. Macura, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 46 (1982) 269.
- [95] K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 311.
- [96] M. Billeter, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 321.
- [97] Y. A. Bara, A. Friedrich, H. Kessler, M. Molter, *Chem. Ber.* 111 (1978) 1045.
- [98] A. Friedrich, Dissertation, Universität Frankfurt 1980.
- [99] S. Forsén, R. A. Hoffmann, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 1189; R. A. Hoffmann, S. Forsén, *ibid.* 45 (1966) 2049.
- [100] H. Kessler, G. Krack, P. Krämer in [9a], S. 301.
- [101] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4546.
- [102] B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6441.
- [103] G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 45 (1981) 367.
- [104] Y. Huang, S. Macura, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5327.
- [105] G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1304.
- [106] H. Kessler, R. Schuck, R. Siegmeyer, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [107] K. D. Kopple, M. Ohnishi, A. Go, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 4264.
- [108] A. Ballardin, A. J. Fischman, W. A. Gibbons, J. Roy, I. L. Schwartz, C. W. Smith, R. Walter, H. R. Wyssbrod, *Biochemistry* 17 (1978) 4443, zit. Lit.
- [109] H. Kessler, P. Kondor, *Chem. Ber.* 112 (1979) 3541.
- [110] L. G. Pease, C. H. Niu, G. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 184.
- [111] H. Kessler, G. Hölzemann, *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 2028.
- [112] Messungen in CDCl<sub>3</sub> und CCl<sub>4</sub> siehe E. S. Stevens, N. Sugawara, G. M. Bonora, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7048.
- [113] M. Llinas, M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 4731.
- [114] D. W. Urry, M. M. Long, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4 (1976) 1, zit. Lit.
- [115] V. F. Bystrov in J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe: *Progress in NMR Spectroscopy*, Pergamon Press, Oxford 1976, Vol. 10, S. 41.
- [116] V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, Y. D. Gavrilov, *J. Magn. Reson.* 30 (1978) 151.
- [117] V. F. Bystrov in R. Srinivasan: *Biomolecular Structure, Conformation, Function and Evolution*, Pergamon Press, Oxford 1980, Vol. 2, S. 3.
- [118] A. Bax, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1099.
- [119] J. Feeney, *J. Magn. Reson.* 21 (1976) 473.
- [120] M. Kup, W. A. Gibbons, *Biochemistry* 18 (1979) 5855.
- [121] C. M. Deber, D. A. Torchia, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 4893.
- [122] H. Kessler, A. Friedrich, W. E. Hull, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 3892.
- [123] G. E. Schulz, R. H. Schirmer: *Principles of Protein Structure*, Springer, New York 1979.
- [124] K. D. Kopple, A. Go, D. R. Pilipauskas, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6830.
- [125] R. Balasubramanian, A. V. Lakshminarayanan, M. N. Sabesan, G. Tegeni, K. Venkatesan, G. N. Ramachandran, *Int. J. Pept. Protein Res.* 3 (1971) 25.
- [126] D. F. De Tar, N. P. Luthra, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 1232.
- [127] M. J. O. Anteunis, R. Callens, V. Asher, J. Slecckx, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87 (1978) 41.
- [128] C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. De Leeuw, H. P. M. De Leeuw, C. Altona, *Biopolymers* 20 (1981) 1211.
- [129] C. A. G. Haasnoot, C. Altona, H. Kessler, W. Bermel, W. Hull, noch unveröffentlicht.
- [130] J. Dale, K. Titlestad, *Chem. Commun.* 1970, 1403.
- [131] I. Z. Siemion, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 748 (1971) 88.
- [132] K. Titlestad, P. Groth, J. Dale, M. I. Ali, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 346.
- [133] H. Egli, U. Vögeli, W. von Philipsborn in B. Pullman: *Nuclear Magnetic Resonance in Molecular Biology*, Reidel, Dordrecht 1978, S. 247.
- [134] H. Egli, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* 64 (1981) 976.
- [135] G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 760.
- [136] G. A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 428.
- [137] D. B. Davies, M. Abu Khaled, D. W. Urry, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1977, 1294.
- [138] H. R. Kricheldorf, W. E. Hull, *Biopolymers* 19 (1980) 1103.
- [139] G. E. Hawkes, E. W. Randall, W. E. Hull, O. Convert, *Biopolymers* 19 (1980) 1815.
- [140] H. R. Kricheldorf, *Org. Magn. Reson.* 15 (1981) 162.
- [141] J. Dale, K. Titlestad, *Chem. Commun.* 1969, 656; 1970, 1403.
- [142] D. H. Rich, P. K. Bhatnagar, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2212.
- [143] K. Hallenga, G. van Binst, A. Scarso, A. Michel, M. Knappenberg, C. Dremler, J. Brison, J. Dirks, *FEBS-Lett.* 119 (1980) 47.
- [144] L. Buffington, V. Garsky, G. Massiot, J. Rivier, W. A. Gibbons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93 (1980) 376.
- [145] B. H. Arison, R. Hirschmann, W. J. Palaveda, S. F. Brady, D. F. Veber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100 (1981) 1148.
- [146] C. Deleuze, W. E. Hull, *Org. Magn. Reson.* 18 (1982) 112.
- [147] D. F. Veber in [31a], S. 685.
- [148] D. E. Dormann, F. A. Bovey, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 1719, 2379.
- [149] I. Z. Siemion, T. Wieland, K. H. Pook, *Angew. Chem.* 87 (1975) 712; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14 (1975) 702.
- [150] J. H. Noggle, R. E. Schirmer: *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York 1971.
- [151] W. E. Hull, B. D. Sykes, *J. Chem. Phys.* 63 (1975) 867; A. Kalk, H. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* 24 (1976) 343.

- [152] S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* 41 (1980) 95.  
 [153] S. L. Gordon, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7094.  
 [154] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 33 (1979) 675.  
 [155] N. R. Krishna, D. G. Agresti, J. D. Glickson, R. Walter, *Biophys. J.* 24 (1978) 791.  
 [156] C. Grathwohl, K. Wüthrich in [15a], S. 249.  
 [157] C. M. Deber, E. T. Fossell, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 4015.  
 [158] D. H. Rich, R. D. Jasensky, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 1112.  
 [159] J. R. Lyerla, G. C. Levy in [37a], Vol. 1, 1974, S. 79.  
 [160] H. Kessler, A. Friedrich, G. Krack, W. E. Hull in [31a], S. 335.  
 [161] C. K. Woodward, B. D. Hilton, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8 (1979) 99.  
 [162] E. M. Krauss, D. Cowburn, *Biochemistry* 20 (1981) 671.  
 [163] J. B. Lambert, R. J. Nienhuis, J. W. Keepers, *Angew. Chem.* 93 (1981) 553; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 487.  
 [164] J. D. Glickson, R. Rowan, T. P. Pitzner, J. Dadok, A. A. Bothner-By, R. Walter, *Biochemistry* 15 (1976) 1111.  
 [165] N. R. Krishna, D. H. Huang, J. D. Glickson, R. Rowan, R. Walter, *Biophys. J.* 26 (1979) 345.  
 [166] N. R. Krishna, G. Goldstein, J. D. Glickson, *Biopolymers* 19 (1980) 2003.  
 [167] J. D. Cutnell, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 362.  
 [168] M. Molter, Dissertation, Universität Frankfurt 1976.  
 [169] C. Ramakrishnan, K. P. Saraty, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1 (1969) 63.  
 [170] G. Manjula, C. Ramakrishnan, *Int. J. Pept. Protein Res.* 13 (1979) 353.  
 [171] C. Ramakrishnan, B. N. N. Rao, *Int. J. Pept. Protein Res.* 14 (1980).  
 [172] J. P. Meraldi, R. Schwyzler, A. Tun-Kyi, K. Wüthrich, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 1962.  
 [173] D. Demel, H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* 1976. 2801.  
 [174] H. Kessler, Y. A. Bara, A. Friedrich, W. Hehlein, P. Kondor, M. Molter in [44a], S. 343.  
 [175] L. G. Pease, C. Watson in [44a], S. 346.  
 [176] L. G. Pease, C. Watson, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 1279.  
 [177] P. Kondor, H. Kessler in [18a], S. 181.  
 [178] L. G. Pease in [18a], S. 197.  
 [179] D. W. Urry, T. L. Trapane, H. Sugano, K. U. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2080.  
 [180] A. B. Mauger, O. A. Stuart, R. J. Highet, J. V. Silverton, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 174.  
 [181] H. Kessler, H. Kogler, unveröffentlicht.  
 [182] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry* 13 (1974) 222.  
 [183] P. Y. Chou, A. J. Adler, G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* 96 (1975) 29.  
 [184] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin, *Science* 179 (1973) 77.  
 [185] J. E. Gerick, M. Lorenzi in W. F. Ganong, L. Martini: *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York 1978, Vol. 5, S. 265.  
 [186] S. Eftendic, P. E. Lins, K. Uvnäs-Wallensten, *Ann. Clin. Res.* 10 (1978) 151.  
 [187] M. Brown, J. Rivier, W. Vale, *Science* 196 (1977) 1467.  
 [188] V. M. Garsky, J. Bicksler, R. L. Fenichel, E. L. Lien in [44a], S. 547.  
 [189] B. H. Hirst, B. Shaw, C. A. Meyers, D. H. Coy, *Regulatory Peptides* 1 (1980) 97.  
 [190] D. F. Veber, R. M. Freidinger, D. Schwenk Perlow, W. J. Paleveda, Jr., F. W. Holly, R. G. Strachan, R. F. Nutt, B. H. Arison, C. Homnick, W. C. Randall, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Nature* 292 (1981) 55.  
 [191] R. M. Freidinger, D. F. Veber, US-Pat. 4235886.  
 [192] H. Kessler, G. Hölzemann, *Angew. Chem.* 93 (1981) 90; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 124.  
 [193] a) I. MacIntyre, M. Szelke: *Molecular Endocrinology*. Elsevier-North-Holland; b) D. Hudson, I. MacIntyre, R. Sharpe, M. Szelke, G. Fink, G. W. Kenner in [193a], Vol. 1, 1977, S. 269.  
 [194] D. Hudson, G. W. Kenner, R. Sharpe, M. Szelke, *Int. J. Pept. Protein Res.* 14 (1979) 177.  
 [195] D. Hudson, R. Sharpe, M. Szelke, *Int. J. Pept. Protein Res.* 15 (1980) 122.  
 [196] D. Hudson, R. Sharpe, P. Tien, A. Hallett, M. Szelke in [193a], Vol. 2, 1979, S. 67.  
 [197] E. Munekata, H. Ishiyama, F. Higa, T. Ohtaki, K. Izumi in H. Yonehara: *Peptide Chemistry*. Protein Research Foundation, Osaka 1980, S. 209.  
 [198] J. Di Maio, P. W. Schiller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 7162.  
 [199] P. Schiller, B. Eggimann, J. Di Maio, C. Lemieux, T. Nguyen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (1981) 337.  
 [200] P. Schiller, B. Eggimann, C. Lemieux, T. Nguyen, *Proceedings of the International Narcotic Research Conference*, Kyoto, 26.-30. Juli 1981, im Druck.

## Ketten- und ringförmige Phosphorverbindungen – Analogien zwischen Phosphor- und Kohlenstoffchemie\*\*

Von Marianne Baudler\*

Professor Klaus Weissmehl zum 60. Geburtstag gewidmet

Verbindungen mit einem Gerüst aus Phosphor-Ketten oder -Ringen waren bis vor etwa 15 Jahren „Exoten“ auf dem Gebiet der Nichtmetallchemie. Neben Molekülen mit zwei aneinander gebundenen P-Atomen und sporadisch entdeckten monocyclischen Phosphorskeletten kannte man lediglich Feststoffe undefinierter Zusammensetzung und Struktur. Seither hat sich der Kenntnisstand erstaunlich gewandelt: Zwischen  $\text{PH}_3$  und seinen Derivaten einerseits und den hochmolekularen Modifikationen des elementaren Phosphors andererseits wurde eine unerwartete Vielfalt wohldefinierter und -strukturierter Verbindungen gefunden, die vielfache Bezüge zur Kohlenstoffchemie aufweisen. Daß aber auch bei „kleinen“ phosphorhaltigen Molekülen noch Überraschungen möglich sind, bestätigt das ebenfalls neu erschlossene Teilgebiet der Phosphor-Dreiringverbindungen.

### 1. Einleitung

Verbindungen mit einem Gerüst aus dreibindigen Phosphoratomen sind im allgemeinen ziemlich reaktiv: Sie kön-

nen am freien Elektronenpaar der P-Atome leicht oxidativ angegriffen werden und disproportionieren wie andere Nichtmetallverbindungen mit homonuclearen Element-Element-Bindungen. Deshalb blieben die Beispiele lange auf wenige beschränkt<sup>[1]</sup>, sieht man von den schon frühzeitig untersuchten Tetraorgano-diphosphanen  $\text{R}_2\text{P}-\text{PR}_2$  ab. Fortschritte der präparativen Arbeitstechnik<sup>[2]</sup> und der spektroskopischen Charakterisierung reaktiver Spezies haben in den letzten 10 Jahren zu einer beträchtlichen Erwei-

[\*] Prof. Dr. M. Baudler  
 Institut für Anorganische Chemie der Universität  
 Greinstraße 6, D-5000 Köln 41

[\*\*] Beiträge zur Chemie des Phosphors, 118. Mitteilung. – 117. Mitteilung:  
 M. Baudler, Y. Akhtalay, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, im Druck.