

Nx-Cx03...Cx10 deuten auf eine ansteigende Wechselwirkung im Sinne eines nucleophilen Angriffs der C=C- auf die C=N⁺-Bindung (der zu 2' führen würde) hin^[12].

Eingegangen am 25. August,
ergänzte Fassung am 8. November 1989 [Z 3521]

CAS-Registry-Nummern:
1, 124686-11-9; 2 · CF₃SO₃⁻, 124686-13-1.

- [1] C. A. Grob, *Angew. Chem.* 88 (1976) 621–627; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15 (1976) 569–575; *ibid.* 81 (1969) 543–555 bzw. 8 (1969) 535–546.
- [2] Das Adamantan derivat 1 wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem 3,5-Dimethyladamantan-1-ol wie folgt synthetisiert: Bromierung mit HBr/Eisessig (W. Fischer, C. A. Grob, H. Katayama, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 1953–1962), Koch-Haaf-Reaktion und Bromierung mit Br₂/AlBr₃ (F. N. Stepanov, Yu. I. Srebrodolskii, *Zh. Org. Khim.* 2 (1966) 1612–1615; *J. Org. Chem. USSR Engl. Transl.* 2 (1966) 1590–1592) zur 3-Brom-5,7-dimethyladamantan-1-carbonsäure, anschließende Überführung ins Amid, Hofmann-Abbau zu einem Urethan (aus dem des Keton 3 durch Kochen in wässriger Natronlauge erhältlich ist) analog zu H. Stetter, P. Tacke, *Chem. Ber.* 96 (1963) 694–698 und schließlich Hydrolyse und N-Methylierung (Formalin und katalytische Hydrierung) analog zu C. A. Grob, W. Schwarz, *Helv. Chim. Acta* 47 (1964) 1870–1878.
- [3] Enraf-Nonius-CAD4-Diffraktometer, MoK_α-Strahlung, Graphit-Monochromator, Meßtemperatur –80 °C, Raumgruppe Pna2₁, a = 14.98(1), b = 14.76(1), c = 23.678(9) Å, V = 5237(6) Å³, ρ_{calc} = 1.352 g cm⁻³, Z = 12, 4721 gemessene Reflexe (θ < 25°), davon 3640 mit I > 3σ_i. Die Struktur wurde mit direkten Methoden (SHELXS86; G. Sheldrick, Universität Göttingen) gelöst, dann wurden die Nichtwasserstoffatome isotrop mit SHELX76 und anisotrop (zuerst ungewichtet, dann mit w = 1/σ_i²) mit der UCLA-Version (Nov. 1985) von SHELX76 verfeinert. Die meisten H-Atome wurden auf berechneten Lagen mit dem Reitermodell verfeinert, bei 15 H-Atomen wurde U_{iso} = 0.08 Å² gesetzt und nicht variiert (insgesamt 708 optimierte Parameter); R = 0.052, R_w = 0.047. (In der mit den systematischen Auslöschungen ebenfalls vereinbaren Raumgruppe Pnma konnte die Struktur nicht gelöst werden.) Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, University Chemical Laboratory, Lensfield Road, GB-Cambridge CB2 1EW (UK), unter Angabe des vollständigen Zeitschriftenzitates angefordert werden.
- [4] Durch Reaktion von 1 mit AgSbF₆ wurde auch 2-SbF₆ dargestellt; der untersuchte Kristall wies jedoch Orientierungsfehlordnung der Kationen und Anionen auf. Das analog gewonnene Tosylat von 2 kristallisierte erst nach wochenlangem Stehen, während das Perchlorat von 2 überhaupt keine Kristalle bildete.
- [5] Im Prinzip hätte auch ein Trifluormethansulfonsäureester gebildet werden können. Struktur eines Brombenzolsulfonsäureesters eines tertiären Alkohols: B. L. Barnett, J. D. Yordy, *J. Cryst. Mol. Struct.* 5 (1975) 113–119.
- [6] ¹H- und ¹³C-NMR-Messungen in Lösung belegen, daß 1 eine kovalente Verbindung ist, während die Daten von 2 (im wesentlichen unabhängig vom Gegenion (Triflat, Tosylat, SbF₆⁻) und vom Lösungsmittel (CD₂Cl₂, CD₃NO₂)) denen des Ketons 3 ähneln und daher nur mit einem Iminium-Ion vereinbar sind (siehe auch G. A. Olah, P. Kreienbühl, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 4756–4759).
- [7] Die mittleren Bindungslängen des C=N-Fragmentes in 2 weichen nicht signifikant von denen bekannter, mit vier sp³-C-Atomen substituierter Iminium-Ionen ab (Cambridge Structural Database: F. H. Allen, O. Kennard, R. Taylor, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 146–153).
- [8] Die Formeln 2 und 2' können als Grenzformeln im Sinne einer Hyperkonjugation angesehen werden (siehe auch T. Laube, *Angew. Chem.* 98 (1986) 368–369; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 349–350).
- [9] Daß die Cx03-Cx02- und Cx03-Cx04-Bindungen (Mittelwert: 1.494(4) Å) etwas kürzer als die C_{sp}-C_{sp}-Bindungen in Ketonen sind (1.511 Å; F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, L. Brammer, A. G. Orpen, R. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1987) S1–S19), kann auf eine erhöhte hyperkonjugative Wechselwirkung des kationischen Zentrums mit den α-CH₂-Gruppen zurückgeführt werden.
- [10] MM2(85) im Programm MacroModel, Vers. 1.5 (W. C. Still, Columbia University, New York, USA).
- [11] Ähnliche Pyramidalisierungen findet man auch bei den Carbonylgruppen von Ketonen, über deren C=O-Bindung eine C=C-Bindung steht, siehe z. B.: W. B. Schweizer, J. D. Dunitz, R. A. Pfund, G. M. Ramos Tombo, C. Ganter, *Helv. Chim. Acta* 64 (1981) 2738–2740; M. A. Gómez-Rodríguez, M. Martínez-Ripoll, S. García-Blanco, *Acta Crystallogr. Sect. C42* (1986) 894–896.
- [12] Alle hier beobachteten Effekte ähneln denen in Strukturen, die im Sinne eines Angriffs von O- oder N-Nucleophilen auf Carbonylgruppen interpretiert worden sind, z. B.: H. B. Bürgi, J. D. Dunitz, E. Shefter, *Acta Crystallogr. Sect. B* 30 (1974) 1517–1527; M. Kaftory, J. D. Dunitz, *ibid.* B 32 (1976) 1–4.

Peptide als „Schaltelemente“: Medium-induzierte Konformationsübergänge von gezielt entworfenen Peptiden**

Von Manfred Mutter* und René Hersperger

Der gezielte Entwurf von Peptiden, die vorgegebene Sekundär- und Tertiärstrukturen bilden, ist sowohl für Struktur-Funktions-Studien als auch für das de-novo-Design von Proteinen von außergewöhnlichem Interesse^[1, 2]. Empirische Vorhersageschemata^[3] wie auch experimentelle Studien an Modellpeptiden^[4] haben es ermöglicht, Prinzipien für das Design von Peptiden mit maßgeschneiderten Konformationseigenschaften abzuleiten^[5]. In den letzten Jahren hat als ein solches Prinzip insbesondere die Amphiphilie von Sekundärstrukturen breite Anwendung gefunden, und zwar zu Stabilisierung von Helices oder β-Faltblattstrukturen in Lösung sowie zum Entwurf von selbstassoziierenden Peptiden beim de-novo-Design von Tertiärstrukturen^[2, 6, 7].

Wir haben diese Prinzipien nun zur Konstruktion von Peptiden herangezogen, die lösungsmittelinduzierte Konformationsübergänge zeigen; derartige Peptide könnten als „Schaltelemente“ dienen, denn der vorherbestimmte Wechsel der Konformation sollte auch zu einem Wechsel der konformationsabhängigen physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften des Peptids führen. Zu diesem Zweck wurden drei Primärsequenzen entworfen (Abb. 1), die alle

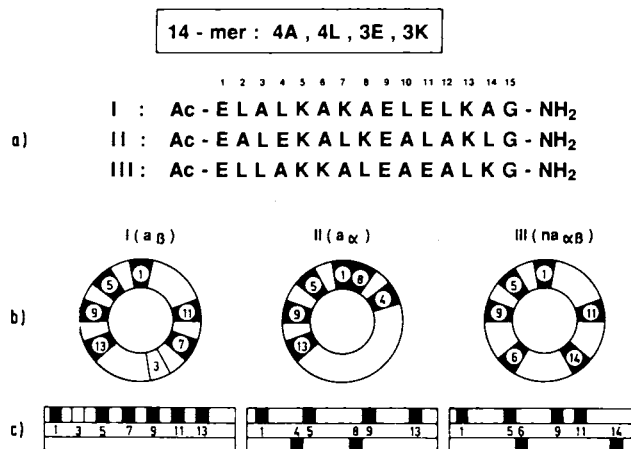


Abb. 1. Entwurf von drei Tetradecapeptiden (mit zusätzlichem C-terminalem Glycin). a) Primärsequenzen der Peptide I–III (A = Alanin, L = Leucin, E = Glutaminsäure, K = Lysin). b) In den Helixrad-[9] und c) in den β-Struktur-Darstellungen sind die hydrophilen Reste (K, E) durch ihre Sequenznummern und durch schwarze Flächen gekennzeichnet.

die gleiche Aminosäurezusammensetzung aufweisen (4A, 4L, 3E, 3K). Alle gewählten Aminosäurereste neigen zur Bildung von Sekundärstrukturen^[3, 4c]; um beim Entwurf amphiphiler Strukturen die größtmögliche Flexibilität zu erreichen, wurden L als hydrophober, E und K als hydrophile und A als „neutraler“ Aminosäurebaustein ausgewählt. Die Kettenlänge von 14 Aminosäureresten (das C-terminale Glycin wurde aus präparativen Gründen eingebaut) entspricht dabei der kritischen Kettenlänge zur Helixbildung in Lösung.

[*] Prof. Dr. M. Mutter, Dr. R. Hersperger
Section de chimie de l'Université Lausanne
Rue de la Barre 2, CH-1005 Lausanne (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

Die Periodizität von hydrophilen Resten wurde so gewählt, daß folgende Strukturen resultieren:

- 1) eine amphiphile β -Struktur^[8] (a_β = Peptid I)
- 2) eine amphiphile α -Helix^[9] (a_α = Peptid II)
- 3) eine Peptidsequenz, die weder in bezug auf die Bildung einer Helix noch einer β -Struktur amphiphil ist ($na_{\alpha,\beta}$ = Peptid III).

Wie die CD-Spektren (Abb. 2a) zeigen, liegen alle drei Peptide im helixfördernden Lösungsmittel 2,2,2-Trifluor-

β -Strukturen erheblich verstärkt wird. In ähnlicher Weise zeigt der amphiphile Helixzylinder von Peptid II laut Gelpermeationschromatographie^[11b] eine starke Tendenz zur Selbstassoziation in eine multimere Bündelstruktur, wodurch die helicale Konformation stabilisiert wird.

Die Konformationseigenschaften der drei Peptide I–III in wäßriger Lösung werden auch im Festzustand beibehalten, wie die IR-Spektren (Abb. 4) zeigen: Die Amid-I-Bande für die Peptide II und III liegt bei 1655 cm^{-1} (α -helicale oder ungeordnete Konformation) und für das Peptid I bei

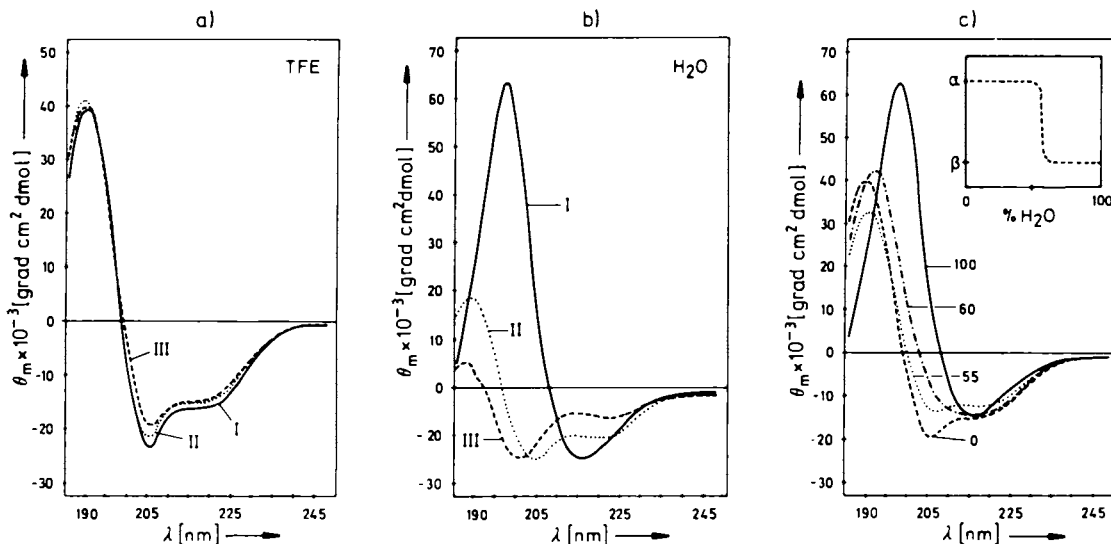


Abb. 2. Circular dichroism-Spektren (CD-Spektren) der Peptide I–III (1 mg mL^{-1}) in a) 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) und in b) H_2O , pH 7; c) CD-Spektren von Peptid I (1 mg mL^{-1}) in H_2O /TFE-Mischungen. Die Zahlenangaben bedeuten Vol.-% H_2O in TFE. Das kleine Bild zeigt den kooperativen Übergang von einer α -Helix-(TFE) zu einer β -Faltblattstruktur (H_2O) bei 55% H_2O /45% TFE.

ethanol (TFE) in einer helicalen Konformation vor, was aufgrund des hohen Helixpotentials der individuellen Aminosäurereste erwartet werden konnte. So betragen die $\langle P_\alpha \rangle$ - und $\langle P_\beta \rangle$ -Werte der drei Peptide^[3] 1.31 bzw. 0.87, d. h. basierend auf dem von Chou und Fasman^[3] entwickelten Vorhersagealgorithmus liegen sie mit sehr viel größerer Wahrscheinlichkeit in einer helicalen Konformation als in einer β -Struktur vor. Es ist dabei sehr interessant, daß die drei Peptide in TFE trotz der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und Coulomb-Wechselwirkungen entlang des Helixzylinders^[10] ein ähnliches Ausmaß an Helixbildung aufweisen (Abb. 2a). Beim Übergang von TFE zu H_2O zeigen die CD-Spektren dann jedoch drastische Unterschiede in der jeweils bevorzugten Konformation an (Abb. 2b). So ist das CD-Spektrum von I in H_2O im Einklang mit einer vollständig ausgebildeten β -Struktur^[11a]. Der lösungsmittelinduzierte Konformationsübergang vom Typ $\alpha \rightleftharpoons \beta$ wird bei I in einer Mischung aus 55% H_2O und 45% TFE beobachtet (Abb. 2c). Dagegen liegen die Peptide II und III in wäßriger Lösung in einer partiell helicalen Konformation vor, wobei interessanterweise das amphiphile Peptid II einen signifikant höheren Helixgehalt aufweist als das nicht amphiphile III.

Wie schematisch in Abbildung 3 gezeigt, liefert die Selbstassoziation amphiphiler Peptidblöcke den hauptsächlichen Beitrag zur Freien Energie (durch hydrophobe Wechselwirkung) bei der Bildung einer spezifischen Sekundärstruktur. So führt z. B. bei Peptid I die energetisch günstige Zusammenlagerung zweier β -Faltblattstrukturen als Doppelschicht (mit hydrophober Tasche und hydrophiler Oberfläche) dazu, daß die schwache intrinsische Tendenz von I zur Bildung von

1630 cm^{-1} (β -Struktur)^[12]. – Die unterschiedlichen Vorzugskonformationen der Peptide I–III manifestieren sich auch in deren Membranaktivität^[13].

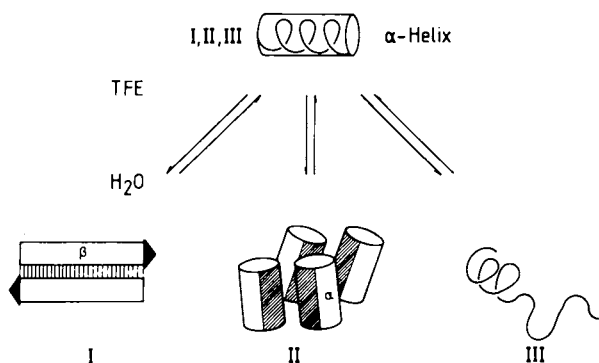


Abb. 3. Schematische Darstellung der Konformationen der Peptide I–III in TFE (α -Helix) und in H_2O . I: Doppelschicht; II: Helixbündel; III: ungeordnete Konformation (siehe Text).

Die Frage nach der bevorzugten Konformation verschiedener Peptide gleicher Aminosäurezusammensetzung in Abhängigkeit von der charakteristischen Primärsequenz ist bereits früher in anderen Laboratorien untersucht worden^[4d, 6d]. So haben z. B. Brack und Spach^[4d] gezeigt, daß alternierende Copolymere von K und L in salzhaltiger wäßriger Lösung eine β -Faltblattstruktur bilden, während statio-

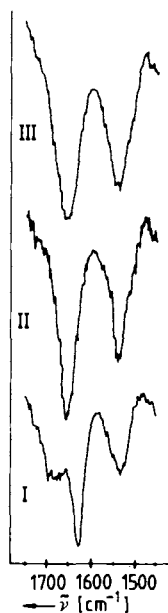


Abb. 4. IR-Teilspektren (Amid-I-Bande) der Peptide I–III im Festzustand (KBr-Preßlinge).

stische Copolymere derselben Aminosäurezusammensetzung unter den gleichen experimentellen Bedingungen eine helicale Konformation bevorzugen. Es sei jedoch betont, daß diese Copolymere im Unterschied zu den hier vorliegenden Peptiden lediglich zwei Aminosäuren enthalten und Molekulargewichte über 5000 aufweisen; außerdem können die nicht alternierend aufgebauten Spezies aufgrund der statistischen Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Resten keine helicale Konformation mit wohldefiniertem amphiphilem Charakter annehmen. DeGrado und Lear^(6d) untersuchten die Konformationseigenschaften der Peptide (LKKLLKL)₂ und LKLKLLKL. In Analogie zu den Resultaten von Brack und Spach fanden sie, daß das Peptid mit alternierender Anordnung von K und L in wäßriger Lösung eine β -Struktur bildet; die Verbindung (LKKLLKL)₂ bildet dagegen bei niedriger Konzentration keinerlei Sekundärstruktur, liegt aber bei hohen Peptid- oder Salzkonzentrationen in einer amphiphilen helicalen Konformation vor. Es ist hervorzuheben, daß diese beiden α -Helix- und β -strukturbildenden Peptide zwar gleiche Zusammensetzung (4L, 3K), aber unterschiedliche Kettenlänge aufweisen; deshalb unterscheidet sich ihr Konformationsverhalten wesentlich von dem bei Peptid I beobachteten reversiblen Konformationsübergang $\alpha \rightleftharpoons \beta$.

Zusammengefaßt zeigen die hier vorgelegten Daten klar, daß die Selbstassoziation von Peptidblöcken (unter Freisetzung der Solvatationsentropie) die Haupttriebkraft zur Sekundärstrukturbildung liefert: Wann immer die Sequenz eines Peptids die Bildung einer geordneten Konformation erlaubt, die bezüglich der räumlichen Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Reste amphiphil ist, so ist diese Konformation in wäßriger Lösung bevorzugt.

Diese Erkenntnis bildet eine der wesentlichen Grundlagen für den Entwurf von Peptiden, die reversible Konformationsübergänge zeigen und somit als „Schaltelemente“ agieren können. So war z. B. eine ausgeprägte Beziehung zwischen der Konformation von I–III und ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften feststellbar⁽¹⁴⁾; während sich alle drei Peptide in TFE ausgezeichnet lösen (helicale Konformation), führt in Wasser der Übergang von Peptid I in eine β -Struktur zu einer signifikanten Abnahme der Löslichkeit. Dagegen garantieren die postulierte Vier-Helixbündel-Struktur von II und die vorwiegend ungeordnete (monomere) Struktur von III gute Löslichkeit auch in Wasser. Die

Design-Prinzipien, die sich aus diesen Beobachtungen ableiten, werden gegenwärtig zur Konstruktion von Templat-assoziierten synthetischen Proteinen (TASP) verwendet⁽¹⁷⁾.

Experimentelles

Die Peptide wurden nach der Festphasenmethode [15] an einem Trialkoxybenzhydramin-Harz [16] (1% quervernetztes Polystyrol) unter Verwendung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe zum temporären Schutz der α -Aminofunktion synthetisiert. Die Seitenketten von E und K wurden als *tert*-Butylester bzw. als *tert*-Butoxycarbonyl-Derivat geschützt. Zweifache Kuppelung mit dem symmetrischen Anhydrid der entsprechenden Fmoc-Aminosäure in jeweils 3,5fachem Überschuß in DMF (2 \times 1 h) führte in allen Fällen zu vollständiger Reaktion, wie durch quantitativen Ninhydrin-Test gezeigt wurde. Die Fmoc-Gruppe wurde durch zweifache Behandlung des Peptid-Harzes (3 und 15 min) mit 20% Piperidin/DMF abgespalten. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde die terminale Aminogruppe mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1/1) im Überschuß in DMF acetyliert (30 min). Das Peptid wurde dann mit 2% Trifluoressigsäure (TFA)/CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten (1 h, Raumtemperatur); anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen mit TFA/*m*-Cresol (9/1) (1 h, 0°C) entfernt. Das Rohprodukt ließ sich durch Gelfiltration an Sephadex LH 20 (MeOH/80% Essigsäure 1/1) und HPLC (C₁₈-Umkehrphasen-Säule, 0,05% aq. TFA und 0,05% TFA in Acetonitril) reinigen. Die Peptide waren rein (DC, HPLC, Aminosäureanalyse).

Eingegangen am 17. August,
ergänzte Fassung am 27. Oktober 1989 [Z 3507]

CAS-Registry-Nummern:

I, 124686-61-9; II, 124686-62-0; III, 124686-63-1.

- [1] T. E. Creighton: *Proteins*, Freeman, New York 1983.
- [2] a) R. Moser, S. Frey, K. Mürger, T. Hehlhans, S. Klausner, H. Langen, E. L. Winnacker, R. Merz, B. Gutte, *Protein Eng.* 1 (1987) 339; b) C. G. Unson, B. W. Erickson, D. C. Richardson, J. S. Richardson, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 43 (1984) 1837; c) J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 14 (1989) 904; d) D. Eisenberg, W. Wilcox, S. M. Eshita, P. M. Pryciak, S. P. Ho, W. F. DeGrado, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1 (1986) 16; e) L. Regan, W. F. DeGrado, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 976; f) J. S. Richardson, D. C. Richardson in D. L. Oxender, C. F. Fox (Hrsg.): *Protein Engineering*, A. R. Liss, New York 1987, S. 149; g) M. Mutter in G. R. Marshall (Hrsg.): *Peptides, Chemistry and Biology*, ESCOM, Leiden 1987, S. 349; h) M. Mutter, E. Altmann, K.-H. Altmann, R. Hersperger, P. Koziej, K. Nebel, G. Tuchscherer, S. Vuilleumier, H.-U. Gremlich, K. Müller, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 835; i) W. F. DeGrado, Z. R. Wasserman, J. D. Lear, *Science (Washington, D.C.)* 243 (1989) 622.
- [3] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Adv. Enzymol.* 47 (1978) 45.
- [4] a) M. Goodman, C. Toniolo, F. Naider in E. R. Blout, F. A. Bovey, M. Goodman, N. Lotan (Hrsg.): *Peptides and Proteins*, Wiley, New York 1974, S. 308; b) F. Maser, K. Bode, V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Adv. Polym. Sci.* 65 (1984) 177; c) M. Sucki, S. Lee, S. P. Powers, J. B. Denton, Y. Konishi, H. A. Scheraga, *Macromolecules* 17 (1984) 148; d) A. Brack, G. Spach, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6319.
- [5] M. Mutter, *Angew. Chem.* 97 (1985) 639; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 639.
- [6] a) S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6751; b) E. T. Kaiser, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13167; c) E. T. Kaiser, F. J. Keady, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16 (1987) 561; d) W. F. DeGrado, J. D. Lear, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7684.
- [7] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* 101 (1989) 551; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 535.
- [8] D. G. Osterman, E. T. Kaiser, *J. Cell. Biochem.* 19 (1985) 57.
- [9] M. Schiffer, A. B. Edmundson, *Biophys. J.* 7 (1967) 121.
- [10] K. R. Shoemaker, P. S. Kim, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Nature (London)* 326 (1987) 563.
- [11] a) S. Brahm, J. Brahm, *J. Mol. Biol.* 11 (1980) 149; b) R. Hersperger, M. Mutter, unveröffentlicht.
- [12] a) T. Miyazawa in G. D. Fasman (Hrsg.): *Poly- α -Amino Acids*, Dekker, New York 1967, S. 69; b) S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* 38 (1986) 181.
- [13] A. Seelig, L. Kürz, M. Mutter, unveröffentlicht.
- [14] a) M. Mutter, V. N. R. Pillai, H. Anzinger, E. Bayer, C. Toniolo in K. Brunfeldt (Hrsg.): *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 16th 1980*, Scriptor, Copenhagen 1981, S. 660; b) V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Acc. Chem. Res.* 14 (1981) 122.
- [15] G. Barany, R. B. Merrifield in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, Academic Press, New York 1980, S. 3.
- [16] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 3787.