

Peptid-Design II

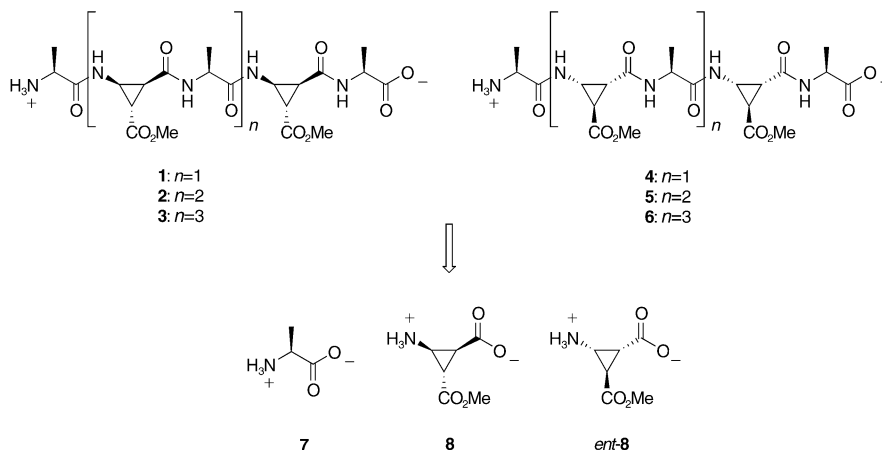
Überraschend stabile helicale Strukturen in α - β -Peptiden durch Einbau von *cis*- β -Aminocyclopropancarbonsäuren**

Silvia De Pol, Chiara Zorn, Christian D. Klein,
Oliver Zerbe* und Oliver Reiser*

Die Entwicklung von strukturell definierten Peptidsträngen ist eine wichtige Voraussetzung für das Design von Proteinen. Die Suche nach Oligopeptiden mit stabilen Konformationen, so genannten Foldameren,^[1] ist daher eine aktuelle Forschungsrichtung in der bioorganischen Chemie. Die meisten bekannten Foldamere sind Homooligopeptide, doch sind auch einige Foldamere mit zwei oder mehr unterschiedlichen Bausteinen bekannt.^[2] Peptide, die aus natürlichen α -Aminosäuren aufgebaut sind, benötigen in der Regel wenigstens zwölf Reste, um eine stabile Konformation in Lösung einzunehmen. Im Unterschied dazu werden im Falle von β -Peptiden überraschend stabile Sekundärstrukturen bereits bei kurzen Oligopeptiden von fünf bis acht Einheiten beobachtet.^[3] Ebenfalls beschrieben wurde die Stabilisierung von Schleifen in hauptsächlich aus α -Aminosäuren aufgebauten cyclischen Peptiden durch β -Aminosäuren.^[4]

Kürzlich konnten wir zeigen, dass die alternierende Kombination von α -Aminosäuren mit *cis*- β -Aminocyclopropancarbonsäuren (*cis*- β -ACCs)^[5] zu ungewöhnlich kurzen α - β -Peptiden führt, die selektiv und mit hoher Affinität an den Y₁-Rezeptor von Neuropeptid Y binden.^[6] Um herauszufinden, ob α - β -Peptide besonders stabile Sekundärstrukturen

bilden, untersuchten wir die Oligopeptide **1–6**, die aus alternierenden Sequenzen von (*S*)-Alanin (**7**) und wahlweise den enantiomeren *cis*- β -Aminocyclopropancarbonsäuren **8** oder *ent*-**8** aufgebaut waren (Schema 1).^[7] Hier berichten wir nun, dass bereits Pentapeptide mit diesem Strukturmotiv selbst in polaren Lösungsmitteln wie Methanol in definierten Konformationen vorliegen. Bei Erweiterung auf sieben oder neun Einheiten bilden sich daraus helicale Strukturen.



Schema 1. Aufbau der Oligopeptide **1–6** durch alternierende Sequenzen aus (*S*)-Alanin (**7**) und **8** oder *ent*-**8**.

Die Strukturbestimmung von kleineren globulären Proteinen ist gut etabliert, erfordert bei kurzen Peptiden aber besondere Sorgfalt. Bei solchen Molekülen stehen gefaltete Konformere häufig in einem (schnellen) Gleichgewicht mit ungefalteten Strukturen. Auch können sich unterschiedlich gefaltete Konformere rasch ineinander umwandeln. Das Ausmaß der Faltung der Peptide **1–6** in Methanol wurde bestimmt, und es wurde geprüft, ob eine einzelne Konformation überwiegt. Dazu wurden die Strukturen durch konventionelle Methoden basierend auf NOE-abgeleiteten Abständen als alleinigem Kriterium für (obere) Distanzeinschränkungen berechnet. Wir nehmen ein Peptid als eindeutig gefaltet an, wenn die drei folgenden Kriterien erfüllt sind: 1) Die auf Grundlage der NOE-Daten ermittelten Distanzeinschränkungen werden nicht verletzt. 2) Eine einheitliche Kalibrierung (NOE-Volumenintegral-Distanz-Umwandlung) kann angewendet werden, in der bekannte Abstände vernünftige Werte ergeben. 3) Alle Abstände unterhalb 3.5 Å, die in mehr als der Hälfte der DYANA-Strukturen (DYANA = NMR-restrained MD-Rechnung im diedrischen Winkelraum) niedriger Energie auftreten, verursachen Kreuzsignale im NOESY-Spektrum. Dieses dritte Kriterium ist besonders aussagekräftig, um zu bestimmen, ob ein einzelnes Konformer in Lösung überwiegt. Falls die Distanzeinschränkungen aus den NOE-Messungen auf einen gemittelten Abstand resultierend aus zwei Konformeren zurückzuführen wären, würde die auf ein einziges Konformer hin berechnete Struktur kurze Abstände enthalten, für die aber keine NOE-Signale experimentell gefunden werden können.

[*] Dipl.-Chem. S. De Pol, Dr. C. Zorn, Prof. Dr. O. Reiser
Institut für Organische Chemie
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4121
E-mail: oliver.reiser@chemie.uni-regensburg.de

Dr. O. Zerbe
Institut für Organische Chemie
Universität Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-635-6833
E-mail: oliver.zerbe@oci.unizh.ch

Dr. C. D. Klein
Pharmazeutische und Medizinische Chemie
Universität des Saarlandes, Saarbrücken (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (RE-948-4/2 und GRK 760), das Internationale Qualitätsnetzwerk Medizinische Chemie (DAAD/BMBF) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Um weiterhin abzusichern, dass die vorgeschlagenen Konformere realen Strukturen entsprechen, wurden Moleküldynamik(MD)-Simulationen durchgeführt. Die NMR-Strukturen wurden unterschiedlichen Temperaturzyklen ausgesetzt, um den Konformationsraum auszuloten und um statistische Analysen der auf diesen Trajektorien liegenden Strukturen niedriger Energie durchzuführen. In den Fällen, in denen die Strukturen die oben beschriebenen Kriterien erfüllen, wurden mehrheitlich Konformere erhalten, die mit den NMR-Daten in Einklang sind.

Alle untersuchten Peptide haben helicale Konformationen, wie aus den NOEs zwischen Amidprotonen aufeinanderfolgender Reste deutlich wird. Jedoch existieren starke Unterschiede, inwieweit diese Peptide *eindeutig* gefaltet sind. Zusammenfassend ergibt sich, dass die Peptide **1–3**, die einen β -ACC-Baustein vom Typ **8** enthalten, eine geringe Tendenz zur Bildung von Konformerengleichgewichten zeigen. Unter den untersuchten Verbindungen sind das Heptapeptid **2** und das Nonapeptid **3** strukturell am besten definiert. Abbildung 1 zeigt ein Konformer aus dem Ensemble der NMR-Strukturen niedriger Energie von **2**, berechnet aus den NOESY-Daten mit dem Programm DYANA.

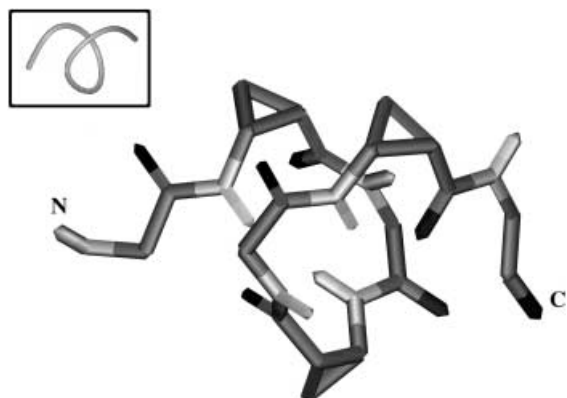


Abbildung 1. Ein Konformer niedriger Energie von **2**. Alle Wasserstoffatome, außer den Amidwasserstoffen, und alle Seitenkettenatome wurden zur Klarheit weggelassen. Der Einschub verdeutlicht die Konformation des Peptidrückgrats.

Das Rückgrat von **2** bildet eine linksgängige 3_{13} -Helix, wobei Wasserstoffbrücken zwischen dem Amidproton des β -ACC in Position 2 und dem Carbonylsauerstoff des β -ACC in Position 4 sowie zwischen dem Amidproton und dem Carbonylsauerstoff des β -ACC^[8] in Position 6 in den meisten Konformeren niedriger Energie gebildet werden. Für ein acyclisches Heptapeptid, das weder Disulfidbrücken noch andere konformative Einschränkungen aufgrund kovalenter Verknüpfungen enthält, ist die Struktur überraschend gut definiert. Das Vorliegen einer helicalen Faltung^[9] wird durch eine Anzahl von NOEs mittlerer Reichweite gestützt, vor allem durch eine Reihe von $i, i + 3$ -Kontakten (siehe Tabelle A in den Hintergrundinformationen). Die skalaren $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten in **2** sind kleiner als 4.2 Hz; zum Vergleich liegen Konstanten analoger Xxx-ACC-Dipeptide zwischen 7.6 und 8.1 Hz (Messungen in CDCl_3). Alle NOESY-Kreuzsignale, die in den 20 DYANA-Strukturen

niedriger Energie Abständen zwischen zwei Aminosäureeinheiten unterhalb 3.5 Å zuzuordnen sind, wurden im NOESY-Experiment tatsächlich gefunden. In den Spektren wurden keine $i, i + 1\text{-H}^{\alpha}, \text{H}^{\alpha}$ -Signale gefunden, woraus geschlossen wird, dass im Unterschied zu anderen Peptiden, die in dieser Studie untersucht wurden, keine *cis*-Xxx-ACC-Peptidbindungen vorliegen. Um eine eventuelle Aggregatbildung zu erkennen und um intermolekulare NOEs auszuschließen, wurden die Proben auf Konzentrationen bis etwa 0.8 mM verdünnt. Die chemischen Verschiebungen blieben hierbei konstant, und es wurden die gleichen NOE-Kreuzsignale im NOESY-Spektrum beobachtet. Es sei betont, dass die Protonenresonanzen der Peptide **1–6** hinreichend separiert waren, um alle NOESY-Kreuzsignale eindeutig zuzuordnen.

Die Konformation des Heptapeptids **5**, das sich von **2** durch den Einbau von *ent*-**8** anstelle von **8** in die Sequenz unterscheidet, ist weniger gut definiert. Obwohl eine Reihe von sequenziellen NOE-Korrelationen in den Spektren gefunden (siehe Tabelle 1 und Hintergrundinformationen) und Strukturen mit vernünftigen Energien aus den NMR-Daten berechnet werden können, fehlen diesen Strukturen die charakteristischen Kreuzsignale, die für Korrelationen zwischen Protonen nichtbenachbarter Reste, die Abstände kleiner als 3.5 Å zeigen, gefunden werden müssten. Offenbar gehören die NOE-Signale nicht zu einer einzigen vorherrschenden Konformation, sondern zu einem Satz von Konformeren, die sich auf der NMR-Zeitskala schnell ineinander umwandeln. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass sämtliche Reste, mit Ausnahme von β -ACC in Position 2, vicinale $\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}$ -Kopplungskonstanten um 6–7 Hz aufweisen, die auf rotationsgemittelte Winkel ϕ im Rückgrat schließen lassen. Bedenkt man, dass die meisten Kontakte mittlerer Reichweite in der ersten Hälfte der Sequenz gefunden werden, und berücksichtigt man das Auftreten relativ starker NOEs zwischen sequenziellen Amidprotonen, so kann davon ausgegangen werden, dass helicale Bereiche zum Teil im Gleichgewicht mit gestreckten Konformationen stehen,

Tabelle 1: Vicinale skalare Kopplungskonstanten für $\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}$ in CD_3OH .

Rest	Peptid	3J [Hz]	Peptid	3J [Hz]
2	1	3.4	4	4.4
3		6.4		6.3
4		5.5		7.0
5		6.9		7.5
2	2	3.4	5	4.6
3		6.4		6.2
4		3.4		6.3
5		6.0		6.5
6		4.2		7.2
7		7.2		8.0
2	3	3.9	6	4.5
3		6.0		5.3
4		3.4		6.8
5		5.9		5.8
6		3.5		6.9
7		6.7		6.3
8		5.6		7.3
9		6.8		7.4

sodass sich keine volle Helix bilden kann. Diese Auffassung wird durch die Erfahrung gestützt, dass das Auftreten von NOEs mittlerer Reichweite, z. B. $\alpha(i), \beta(i+3)$ -Korrelationen, die Voraussetzung ist, um stabil gefaltete α -Helices von naszierenden Helices zu unterscheiden.^[9]

Der Trend, der sich in den unterschiedlichen Vorzugskonformationen der Heptapeptide **2** und **5** widerspiegelt, setzt sich bei den Pentapeptiden **1** und **4** und bei den Nonapeptiden **3** und **6** fort. Auch hier konvergiert die Strukturrechnung von **1** zu einem helical gefalteten Peptid, und es werden weitaus mehr NOEs mittlerer Reichweite bei **1** als bei **4** gefunden. Einige charakteristische Korrelationen, die für **2** beobachtet wurden, sind auch bei **1** zu finden, z. B. das NOESY-Signal zwischen den α -Protonen der Alaninreste **1** und **5**. Weiterhin sind im Unterschied zu **4** die $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten aller ACC-Einheiten in **1** klein. Wie aus dem Auftreten von $\text{H}^{\alpha}, \text{H}^{\alpha}$ -NOEs benachbarter Reste hervorgeht, enthält **4** außerdem merkliche Anteile an *cis*-Ala-ACC-Peptidbindungen. Hieraus resultiert eine größere Zahl von konsistenten Verletzungen in den Strukturrechnungen, was auf ein Gleichgewicht von gefalteten und ungefalteten Konformeren von **4** hinweist.

Als weiteres Kriterium haben wir die Spektren von **1** und **4** in wässriger Lösung und in Methanol verglichen. In Wasser sind die Peptide weitgehend unstrukturiert, wie am Fehlen von Korrelationen zwischen benachbarten Amidprotonen abzulesen ist. Während sich die chemischen Verschiebungen der Amid- und der α -Protonen von **4** in Wasser und in Methanol nur geringfügig unterscheiden, werden für **1** Differenzen von ± 0.5 ppm beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass der mit dem Wechsel in das wässrige Milieu verbundene Strukturverlust bei **1** größer ist. Das Nonapeptid **3** weist eine ähnlich helicale Struktur wie **2** auf, ohne dass Hinweise für ein signifikantes Konformerengleichgewicht vorliegen. Schwache skalare Kopplungen und eine große Zahl an NOEs mittlerer Reichweite belegen, dass das Peptid gut strukturiert ist. Die Struktur des zu **3** isomeren Nonapeptids **6** ist wiederum schlechter definiert, wie an den stärkeren skalaren Kopplungen sowie der geringeren Zahl an NOEs mittlerer Reichweite abzulesen ist.

Die NMR-Methode erzeugt statische Bilder, in denen NMR-relevante Parameter wie Abstände oder Diederwinkel während der Mischzeit (NOEs) oder der Aufnahmeperioden (Kopplungen) zeitlich gemittelt sind. Um einen Einblick in mögliche konformative Übergänge zu erhalten, wurde eine MD-Simulation über 2 ns mit dem Programm AMBER^[10] durchgeführt. Angewendet wurde ein Simulationsprotokoll mit wiederholten Aufheiz- und Abkühlzyklen. Die damit erhaltenen Konformationen niedriger Energie wurden überlagert und zu Konformationsfamilien mit Abweichungen zu den entsprechenden mittleren Atompositionen von weniger als 1 Å sortiert. Die berechneten MD-Trajektorien für **1** und **4** unterscheiden sich deutlich: Für **1** werden zwei stark bevorzugte Familien gefunden, von denen die eine den aus den NMR-Daten abgeleiteten Strukturen weitgehend ähnelt (Abbildung 2A, oben), während die zweite zwar ebenfalls helical ist, aber eine rechtsgängige Helix aufweist (Abbildung 2A, unten). Die MD-Trajektorie von **4** zeigt insgesamt vier Konformationsfamilien (Abbildung 2B), die sich stark

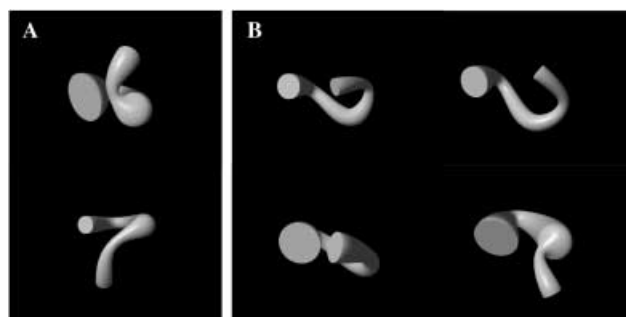


Abbildung 2. Konformationsraum, der vom Ensemble der Rückgrat- atome von **1** und **4** eingenommen wird, resultierend aus einer 2-ns-MD-Simulation mit distanzabhängiger Dielektrizitätskonstante, dargestellt als Spline-Funktion durch die Positionen der C^{α} -Atome. Abgebildet sind die am häufigsten besetzten Cluster (siehe Text).

voneinander unterscheiden und von denen einige in ungefalteten, nichthelicalen Konformationen vorliegen. Gleichgewichte zwischen helicalen und ungefalteten Konformationen führen zum simultanen Auftreten von starken, benachbarten $\alpha\text{H}^{\text{N}}$ - und $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ -NOEs, wie es für **4** tatsächlich beobachtet wurde. Die MD-Simulationen stützen daher den Befund, dass gemischte α - β -Peptide mit natürlichen α -Aminosäuren, die den β -ACC-Baustein **8** enthalten, strukturell besser definiert sind als ihre Analoga, die den *ent*-**8**-Baustein enthalten.

Die in dieser Studie erhaltenen Strukturdaten belegen, dass Peptide mit alternierenden α - und β -Aminosäuren Vorzugskonformationen einnehmen, die bislang in kurzen, acyclischen Peptiden, die ausschließlich α -Aminosäuren enthalten, unbekannt waren.^[11] Ähnlich wie bei Peptiden, die ausschließlich aus β -Aminosäuren bestehen, sind helicale Konformationen bevorzugt. Die *cis*-Stereochemie an den Cyclopropaneinheiten führt offenbar zu sterischen Wechselwirkungen in den Peptidsträngen, deren Ausmaß durch die Seitenketten der benachbarten α -Aminosäuren vorgegeben sein könnte. Anhand der untersuchten Peptide entsteht das Bild, dass alternierende Peptide aus L-Ala- und β -ACC-**8** helicale Strukturen im Peptidrückgrat bilden, während die entsprechenden Peptide mit β -ACC-*ent*-**8** zu wenig geordneten Konformerengleichgewichten führen.

Eingegangen am 1. Juli 2003 [Z52267]

Stichwörter: α - β -Peptide · β -Aminosäuren · Foldamere · Helicale Strukturen · NMR-Spektroskopie

- [1] a) D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893; b) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173; c) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015.
- [2] Ausgewählte Beispiele: a) B. Gong, H. Q. Zeng, J. Zhu, L. H. Yua, Y. H. Han, S. Z. Cheng, M. Furukawa, R. D. Parra, A. Y. Kovalevsky, J. L. Mills, E. Skrzypczak-Jankun, S. Martinovic, R. D. Smith, C. Zheng, T. Szyperki, X. C. Zeng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11583; b) B. R. Huck, J. D. Fisk, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2607; c) Y. Hamuro, S. J. Geib, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7529; d) R. S. Lokey, B. L. Iverson, *Nature* **1995**, *375*, 303; e) M. Hagihara, N. J.

- Anthony, T. J. Stout, J. Clardy, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *104*, 6568.
- [3] Neuere Beispiele: a) E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7324; b) U. Arnold, M. P. Hinderaker, B. L. Nilsson, B. R. Huck, S. H. Gellman, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8522; c) T. L. Raguse, E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12774; d) D. Liu, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553; e) K. Gademann, T. Kimmerlin, D. Hoyer, D. Seebach, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2461; f) E. A. Porter, X. Wang, H.-S. Lee, B. Weisblum, S. H. Gellman, *Nature* **2000**, *404*, 565; g) M. Werder, H. Hausre, S. Abele, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774; h) Y. Hamuro, J. P. Schneider, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200.
- [4] a) V. Pavone, A. Lombardi, X. Yang, C. Pedone, B. D. Blasio, *Biopolymers* **1990**, *30*, 189; b) V. Pavone, A. Lombardi, G. D'Auria, M. Saviano, F. Natri, L. Paolillo, B. D. Blasio, C. Pedone, *Biopolymers* **1992**, *32*, 173; c) B. D. Blasio, A. Lombardi, X. Yang, C. Pedone, V. Pavone, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1181; d) V. Pavone, A. Lombardi, C. A. Maggi, L. Quartara, C. Pedone, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 236; e) A. Lombardi, M. Saviano, F. Natri, O. Maglio, M. Mazzeo, C. Isernia, L. Paolillo, V. Pavone, *Biopolymers* **1996**, *38*, 693.
- [5] Übersicht: F. Gnad, O. Reiser, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1603.
- [6] N. Koglin, C. Zorn, R. Beumer, C. Cabrele, C. Bubert, N. Sewald, O. Reiser, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 212; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 202.
- [7] Synthese und spezielle Peptidkupplungstechniken für **8** und *ent-8*: a) C. Zorn, F. Gnad, S. Salmen, T. Herpin, O. Reiser, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7049; b) R. Beumer, C. Bubert, C. Cabrele, O. Vielhauer, M. Pietzsch, O. Reiser, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8960.
- [8] In IR-spektroskopischen Studien einfacher Amide, die sich von **8** ableiten lassen (CONEt₂ anstelle von CO₂Me, *N*-Ac anstelle von *N*-Boc), wurden intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen CO und NH in *cis*-Position nachgewiesen. Demgegenüber zeigen die analogen β -Alanin-Derivate keine solchen Wasserstoffbrücken: G. P. Dado, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054.
- [9] Es wurden Kriterien festgelegt, nach denen partiell gefaltete, kürzere Peptide identifiziert werden können: H. J. Dyson, M. Rance, R. A. Houghton, R. A. Lerner, P. E. Wright, *J. Mol. Biol.* **1988**, *201*, 161; H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519. NOEs zwischen sequenziellen Amidprotonen weisen auf eine signifikante ϕ, ψ -Besetzung im helicalen Teil des Ramachandran-Plots hin, während Medium-Range-Kontakte (hauptsächlich *i, i* + 2 und *i, i* + 3) die Voraussetzung dafür sind, um zweifelsfrei das Vorliegen einer Helix anstelle sich ineinander umwandelnder Schleifenstrukturen zu beweisen. Eine geringe Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen war ebenfalls als Hinweis für deren Beteiligung an Wasserstoffbrücken gewertet worden, doch wurde kürzlich argumentiert, dass solche Temperaturkoeffizienten eher auf eine Faltung bei Temperaturabsenkung zurückzuführen sind: H. A. Andersen, J. W. Neidigh, S. M. Harris, G. M. Lee, Z. Liu, H. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547.
- [10] D. A. Case, D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham III, J. Wang, W. S. Ross, C. Simmerling, T. Darden, K. M. Merz, R. V. Stanton, A. Cheng, J. J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, H. Gohlke, R. Radmer, Y. Duan, J. Pitera, I. Massova, G. L. Seibel, U. C. Singh, P. Weiner, P. A. Kollman, AMBER 7, University of California, San Francisco, **2002**.
- [11] Siehe auch: A. Hayen, M. A. Schmitt, F. N. Ngassa, K. A. Thomasson, S. H. Gellman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 505.