

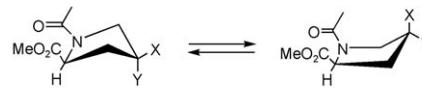
Konformationseigenschaften des 4-Mercaptoprolins und verwandter Derivate**

Sergio A. Cadamuro, Rudolf Reichold, Ulrike Kusebauch, Hans-Jürgen Musiol, Christian Renner, Paul Tavan und Luis Moroder*

Seit langem ist bekannt, dass Prolinreste eine wichtige, ja einzigartige Rolle für die Struktureigenschaften von Peptiden und Proteinen spielen. Die *cis-trans*-Isomerisierung der Aminoacyl-Prolin-Bindung ist von elementarer Bedeutung für Faltung und Stabilität der Proteinstrukturen.^[1] Diese allgemeine Beobachtung hat eine intensive Suche nach Prolin-Analoga ausgelöst, bei denen sich die konformativen Populationsverteilung der *cis-trans*-Prolylbindung und der Geometrie des Pyrrolidinrings (*endo/exo* des C4) möglichst nach Belieben einstellen lässt, um den Konformationsraum von Polypeptidketten einzuschränken und somit die thermodynamische Stabilität von Peptiden und Proteinen zu modulieren.^[2] In der Natur sind von mehreren Modifikationen des Prolin das (2S,4R)-Hydroxyprolin (Hyp) und das (2S,3S)-Hyp am häufigsten. Sie werden in einem post-translationalen Prozess ausschließlich in X- bzw. Y-Position der Collagen(Xaa-Yaa-Gly)-Triplets erzeugt, wobei die enzymatische 4R-Hydroxylierung die weitaus häufigere Modifikation ist.^[3] Die stereoelektronischen Einflüsse dieser elektronegativen Substituierung am C4 oder C3 des Pyrrolidinrings wurden vergleichend analysiert, insbesondere für Fluor-Substituenten in synthetischen Modellverbindungen hinsichtlich der (De-)Stabilisierung der Collagendreifachhelix.^[2a,h,i,k,4] Diese Studien an Collagen-Modellpeptiden wurden unter Ausnutzung des starken Effekts bei 4-Fluorprolinen (Flp) auf andere Proteine ausgedehnt.^[2g,5]

Überraschenderweise wurden die nichtnatürlichen, synthetischen 3- und 4-Mercaptopyrrolidin-2-carbonsäuren (Mpc)^[6] als Chalkogen-Analoga des Hydroxyprolins nur selten genutzt, um durch Seitenkettenverknüpfung von Peptiden durch Thioether- oder Disulfidbrücken den Konformationsraum von peptidischen Makrocyclen einzuschrän-

ken.^[7] Wir berichten hier über einen Strukturvergleich der 2S,4R- und 2S,4S-Epimere von Mpc, in denen der Austausch der Hydroxygruppe mit der weniger elektronegativen Thiolgruppe drastisch veränderte Konformationpräferenzen bewirkt: Das 4R-Epimer des Mpc bewirkt einen C^Y-endo-Ringknick („endo pucker“) während (4R)-Hyp und ähnliche 4R-Substitutionen den exo-Knick („exo pucker“) erzeugen (Schema 1). Dies ist von Bedeutung für das Design von



(4R)-Hyp (Y = OH; X = H): *trans*, C^Y-exo (4S)-Hyp (Y = H; X = OH): *cis*, C^Y-endo
(4S)-Mpc (Y = H; X = SH): *trans*, C^Y-exo (4R)-Mpc (Y = SH; X = H): *trans*, C^Y-endo

Schema 1. Konformationsgleichgewichte der Verbindungen Ac-(4R/S)-Mpc-OMe (1) und Ac-(4R/S)-Hyp-OMe (5).

Peptiden und Proteinen, besonders wenn man die Thiolgruppe zur Thioether- oder Disulfidverknüpfung innerhalb oder zwischen Peptidketten nutzt.

Die Epimere Ac-(2S,4R/S)-Mpc-OMe (1) wurden synthetisiert (Abbildung 1), um den Einfluss der 4-Mercapto-Substituierung auf die Konformation des Pyrrolidinrings zu ermitteln. Um den Einfluss der Seitenkettenverknüpfung solcher Mpc-Reste über Thioether- oder Disulfidbrücken in Peptiden nachzuahmen, wurden außerdem die verwandten Alkyl- und Alkylthio-Epimerpaare Ac-(2S,4R/S)-Mpc(Me)-OMe (2) und Ac-(2S,4R/S)-Mpc(SMe)-OMe (3) hergestellt und mit den bekannten Ac-Pro-OMe (4), Ac-(2S,4R/S)-Hyp-OMe (5) und Ac-(2S,4R/S)-Flp-OMe (6) hinsichtlich Konformationspräferenzen verglichen. Bei der NMR-Konformationsanalyse in wässriger Lösung wurde der bekannte pH-Effekt auf die Isomerisierung der Xaa-Pro-Bindung durch N- und C-Derivatisierung unterbunden.^[8] Mögliche Wasserstoffbrücken bei Amidderivaten wurden durch Bildung C-terminaler Ester eliminiert.^[9]

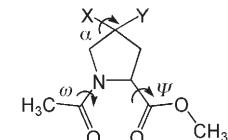


Abbildung 1. Chemische Struktur des N-Acetylprolinmethylesters (4, X=Y=H) und einiger seiner Derivate, in denen entweder X oder Y durch SH (1), SMe (2), SSMe (3), OH (5) oder F (6) ersetzt ist.

trans-cis-Gleichgewichtskonstanten (K_{tc}) und dominante Ringknicke wurden aus NMR-Spektren extrahiert, um den stereoelektronischen Einfluss der Thiolgruppe zu ermitteln. Die Werte sind in Tabelle 1 zusammengefasst und den Werten der 4-Hydroxy- und 4-Fluorprolin-Epimerpaare gegenüber-

[*] Dr. S. A. Cadamuro, Dr. U. Kusebauch, H.-J. Musiol, Priv.-Doz. Dr. C. Renner,^[+] Prof. Dr. L. Moroder Max-Planck-Institut für Biochemie Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland) Fax: (+49) 89-857-82847 E-Mail: moroder@biochem.mpg.de Homepage: <http://www.biochem.mpg.de/en/rg/moroder/>

R. Reichold, Prof. Dr. P. Tavan Lehrstuhl für Biomolekulare Optik, Ludwig-Maximilians-Universität Oettingenstraße 67, 80538 München (Deutschland)

[+] Aktuelle Adresse: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53170 Bonn/Bad-Godesberg

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (SFB 533, A8 und C3).

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

Tabelle 1: Thermodynamische Parameter und Konformationspräferenzen der Verbindungen **1–6**.

Verb.	$K_{t,c}^{[a]}$	Hauptkonformation	$-\Delta H^0[b]$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S^0[b]$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]
1(4R)	5.4	<i>trans</i> , C ^γ -endo	4.84 ± 0.8 %	-2.19 ± 5.9 %
1(4S)	4.7	<i>trans</i> , C ^γ -exo	3.30 ± 1.0 %	1.89 ± 5.4 %
2(4R)	4.1	<i>trans</i> , C ^γ -endo	1.93 ± 4.8 %	2.86 ± 2.8 %
2(4S)	3.1	<i>trans</i> , C ^γ -exo	4.99 ± 2.5 %	-5.08 ± 5.0 %
3(4R)	4.3	<i>trans</i> , C ^γ -endo	4.88 ± 2.6 %	-4.32 ± 4.3 %
3(4S)	3.6	<i>trans</i> , C ^γ -exo	1.62 ± 4.6 %	5.25 ± 5.2 %
4^[c]	4.8	<i>trans</i> , C ^γ -endo	5.04 ± 1.0 %	-3.82 ± 4.3 %
5(4R)^[d]	6.1	<i>trans</i> , C ^γ -exo	7.84 ± 1.0 %	-10.7 ± 1.0 %
5(4S)^[d]	2.4	<i>trans</i> , C ^γ -endo	k.a. ^[e]	k.a. ^[e]
6(4R)^[c]	7.3	<i>trans</i> , C ^γ -exo	7.73 ± 3.3 %	-9.81 ± 8.3 %
6(4S)^[c]	2.6	<i>trans</i> , C ^γ -endo	3.04 ± 1.1 %	-2.47 ± 4.3 %

[a] Bestimmt durch die Integration gut separierter Signale in ¹H-NMR-Spektren in D₂O bei 298 K. [b] Der enthalpische (ΔH^0) und entropische Beitrag (ΔS^0) zur Differenz der freien Enthalpie ΔG^0 zwischen *trans*- und *cis*-Konformeren wurden aus Van't Hoff-Auftragungen ermittelt (siehe Hintergrundinformationen). Die Fehlergrenzen wurden aus den mit der Methode der linearen Fehlerquadrate erstellten Angleichungen abgeschätzt. [c] Werte aus Lit. [2g]; [d] Werte aus Lit. [2k]. [e] k.a. = keine Angaben.

gestellt: Die 4*R/S*-Thiolgruppe hat einen viel schwächeren Einfluss auf das *trans-cis*-Gleichgewicht als die elektronegativeren Hydroxy- oder Fluorosubstituenten. Die $K_{t,c}$ -Werte von **1(4R)** und **1(4S)** unterscheiden sich tatsächlich kaum von denen des unsubstituierten Prolins. Die Ringkonformationen der substituierten Ac-Pro-OMe-Modelle zeigen hingegen ein unerwartetes Verhalten: Im Unterschied zum Hyp und Flp bewirkt beim Mpc die *anti*(1(4R))-Orientierung des Thiolsubstituenten relativ zur festen L-Konfiguration des C^α-Atoms eine Bevorzugung des C^γ-endo-Ringknicks. Die *anti*-Orientierung des 4-Substituenten führt also zum *endo*-Ringnick bei Mpc **1(4R)** und zum *exo*-Ringnick bei Hyp **5(4R)** und Flp **6(4R)**. Umgekehrt bewirkt die *syn*-Orientierung einen *exo*-Ringnick bei Mpc **1(4S)** und einen *endo*-Ringnick bei Hyp **5(4S)** und Flp **6(4S)**.

Die Umwandlung der Thiolgruppe in einen Methylthioether oder ein Methyldisulfid verschiebt das *trans-cis*-Gleichgewicht der Prolylbinding hin zur *cis*-Konfiguration, wobei der Einfluss des Thioethers geringer ist als der des Methyldisulfids. Der Ringnick wird dabei nicht beeinflusst.

Um die Unterschiede der experimentellen Daten von **1**, **4**, **5** und **6** erklären zu können, wurden Dichtefunktionalrechnungen ausgeführt. Für Mpc (**1**) und Hyp (**5**) wurden Potentialkurven für die Diederwinkel ω , ψ und α (Abbildung 1) berechnet. Die Energien in der Gasphase und die molekulare Geometrie aus unserer DFT-Beschreibung von **4**, **6(4R)** und **6(4S)** (Tabellen II und III in den Hintergrundinformationen) stimmen mit früheren DFT-Rechnungen^[2h] sehr gut überein und bestätigen so unseren theoretischen Ansatz. Die experimentellen NMR-Ergebnisse zu den Populationen der Konformere stimmen mit wenigen Ausnahmen sehr gut mit den DFT-Ergebnissen überein (Tabelle IV in den Hintergrundinformationen). Insbesondere reproduzieren die Rechnungen die unerwartete, aber experimentell beobachtete Neigung des **1(4R)** zum C^γ-endo-Ringnick und des **1(4S)** zum C^γ-exo-Ringnick.

Die DFT-Rechnungen belegen, dass die Bevorzugung eines Knick-Typs für eine gegebene 4-Substitution hauptsächlich durch die Wechselwirkung des Bindungsdipols an der Substitutionsstelle mit dem Dipol der vorhergehenden Amidbindung bestimmt wird. Abbildung 2 zeigt, dass die

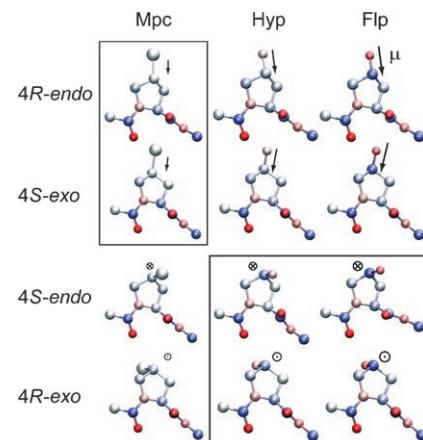


Abbildung 2: Optimierte Geometrie der L-Prolinederivate als *trans*-Amid-Konformere: Die Stärke und Richtung der X-C^γ-Bindungsdipole μ sind durch Pfeile markiert. Die atomaren Partialladungen sind farbkodiert von Rot (=negativ) über Weiß (=neutral) bis Blau (=positiv). Rot-Blau-Kombinationen sind dann lokale Dipole. Die Kugeln entsprechen „compound atoms“, d.h., dass die Wasserstoffatome zu den schweren Atomen hinzugezählt werden. Die experimentell beobachteten Konformere sind eingekreist.

Kombination aus (4*R*)-Hyp oder (4*R*)-Flp mit einem C^γ-endo-Ringnick zu einer ungünstigen antiparallelen Ausrichtung der Dipole führt, während der C^γ-exo-Ringnick fast orthogonale Dipole aufweist, was kaum zur Gesamtenergie beiträgt. Daher ist der C^γ-exo Ringnick für (4*R*)-Hyp- und (4*R*)-Flp-Derivate günstiger. Im Unterschied dazu ist das Dipolmoment an der Substitutionsposition für Mpc sehr schwach und bewirkt für die 4*R*-endo-Kombination kaum energetische Nachteile. Die beim Mpc experimentell beobachtete Bevorzugung der 4*R*-endo-Geometrie impliziert dann, dass die Summe aller Energiebeiträge (Elektrostatik, Van-der-Waals, kovalente Geometrie usw.) ohne die besprochene Dipol-Dipol-Wechselwirkung insgesamt leicht zugunsten des C^γ-endo-Ringnicks für das (4*R*)-Mpc-Derivat **1** ausfällt. Der C^γ-exo-Ringnick von (4*R*)-Hyp (**5**) und (4*R*)-Flp (**6**) resultiert somit eher aus einer weniger ungünstigen Dipol-Dipol-Orientierung als aus einer spezifischen günstigen Wechselwirkung. Analog zu Mpc würde man daher auch für andere 4*R*- oder 4*S*-Substitutionen mit kleinem Bindungsdipol die 4*R*-endo- und 4*S*-exo-Kombination erwarten, obwohl diese bisher als ungewöhnlich und ungünstig galten. Zusätzliche sterische Effekte können diese elektrostatischen Wechselwirkungen jedoch übertreffen – dies ist z.B. beim 4-Methylprolin-Epimerpaar der Fall.^[2n,9]

In vorangehenden Studien zur Erzeugung einer synthetischen lichtschaltbaren Collagendreifachhelix hatten wir zwei (4*S*)-Mpc-Reste (als das einfacher synthetisierbare Epimer) in Ac-(Gly-Pro-Hyp)₇-Gly-Gly-NH₂-Modellcollagenpeptide eingesetzt, die mit ihren Thiolgruppen über ein Thiol-aktivierte

viertes Azobenzolderivat verknüpft werden sollten.^[11] Die besten Positionen für die Mpc-Reste sollten nach Modellierungsexperimenten an den Stellen i und $i+7$ entsprechend der X- und Y-Position der klassischen (Xaa-Yaa-Gly)-Collagentriplets liegen. Hochauflösende Röntgenstrukturanalysen von Collagenpeptiden^[12] sowie Computeranalysen^[13] hatten alternierende C'-endo- und C'-exo-Ringknick für Pro- und Hyp-Reste an X- und Y-Positionen gezeigt, möglicherweise mit stabilisierendem Einfluss auf die Dreifachhelix. Vergleichsstudien synthetischer Collagenpeptide mit (4R)-Hyp oder (4S)-Hyp und (4R)- oder (4S)-Flp zeigten tatsächlich eine erhöhte Temperaturstabilität der Dreifachhelix, wenn die X- und Y-Position mit Prolinanalogen besetzt wurden, die C'-endo- bzw. C'-exo-Ringknick bevorzugen, während vertauschte Ringknick eine Destabilisierung bewirkten.^[2h,i,k,4a,b,12] In neuen Röntgenstrukturen von [Gly-(4R)-Hyp-(4R)-Hyp]_n-Peptiden zeigen allerdings beide Hyp-Reste die exo-Konformation.^[4g,j] Angesichts der geringen Elektronegativität der Thiolgruppe nahmen wir an, dass der Austausch eines Pro- oder Hyp-Restes in Ac-(Gly-Pro-Hyp)₇-Gly-Gly-NH₂ durch (4S)-Mpc die Dreifachhelix nur geringfügig beeinträchtigen sollte. Tatsächlich belegt Abbildung 3 jedoch eine deutlich reduzierte Stabilität.

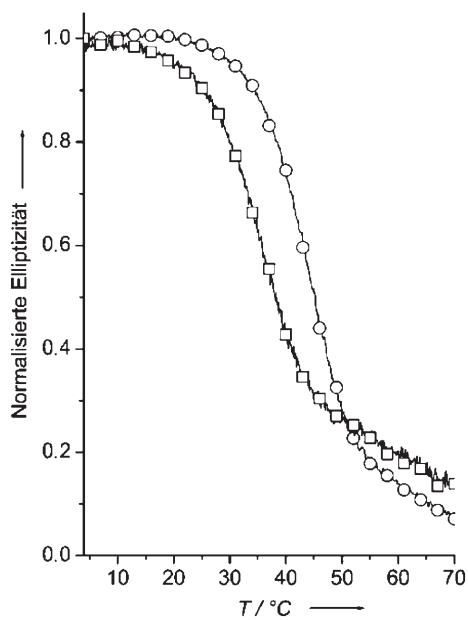


Abbildung 3. Thermische Entfaltung des dreifachhelikalen Ac-(Gly-Pro-Hyp)₇-Gly-Gly-NH₂ (○) ($T_m = 43^\circ\text{C}$) und des analogen Ac-(GPO)₂-(G-(4S)-Mpc-O)-(GPO)-(GP-(4S)-MPC)-(GPO)₂-GG-NH₂ mit zwei (4S)-Mpc-Resten in X- und Y-Position (□) ($T_m = 34.5^\circ\text{C}$). Die Entfaltung wurde mit Circulardichroismus bei 225 nm in wässriger Lösung bei 1 mm Peptidkonzentration verfolgt. O = (4R)-Hydroxyprolin.

Da der Austausch von Pro und/oder Hyp in einzelnen Triplets von (Gly-Pro-Hyp)_n-Peptiden (Wirt-Gast-Peptiden) signifikant andere Resultate ergibt als wiederholter Austausch,^[4k] kann eine Erklärung des 8°C niedrigeren Schmelzpunktes versucht werden. Die stereoelektronischen Einflüsse der substituierten Proline in (Gly-Pro-Hyp)-Collagentriplets sind hinsichtlich der (De-)Stabilisierung der

Dreifachhelix nicht additiv,^[4i] aber die sterischen Einflüsse schon.^[2n] Der Austausch eines Hyp in Y-Position durch ein (4S)-Mpc erzeugt eine weniger bevorzugte trans-Peptidbindung ähnlich dem Prolin (Tabelle 1). Dieser negative Effekt, der in (Gly-Pro-Hyp)₈-Wirt-Gast-Peptiden mit einem Gly-Pro-Pro-Triplett einen 2°C niedrigeren T_m bewirkt,^[4k] sollte durch den bevorzugten C'-exo-Ringnick des (4S)-Mpc ausgeglichen werden. Ähnlich sollte (4S)-Mpc trotz seines C'-exo-Ringknicks auch in X-Position die Dreifachhelix kaum beeinträchtigen. Die deutliche Destabilisierung muss daher primär auf sterische Behinderung zurückzuführen sein. Dies unterstreicht das starke Wechselspiel zwischen sterischen und elektrostatischen Einflüssen im Zusammenhalt der Collagendreifachhelix.

Auch wenn die Ergebnisse der Ac-Pro-OMe-Modellverbindung nur begrenzt auf Proteinumgebungen übertragen werden können, zeigt diese Studie einen klaren Zusammenhang zwischen 4-Substitutionen des Prolin und den resultierenden Konformationseigenschaften der Amidbindung sowie der Geometrie des Prolinrings auf. Die Möglichkeit, die Prolingeometrie durch Wahl geeigneter Analoga gezielt einzustellen, zusammen mit der wichtigen Rolle des Prolinrestes in Peptid- und Proteinstrukturen, kann ein sehr wirkungsvolles Werkzeug zum Design und für Faltungsstudien von Peptiden sein. Die Anwendung in Proteinen hingegen hängt noch von der Entwicklung besserer Methoden zum Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in exprimierte Proteine ab, sofern nicht synthetische oder semisynthetische Ligationsverfahren ausreichen.

Experimentelles

Details der Synthese von Ac-(4R/S)-Mpc-OMe (1), Ac-(4R/S)-Mpc(Me)-OMe (2) und Ac-(4R/S)-Mpc(SMe)-OMe (3) sind in den Hintergrundinformationen enthalten. Für NMR-Messungen wurden D₂O-Lösungen verwendet; für Ac-Mpc-OMe wurde 1 Äquivalent Tris(2-carboxyethyl)phosphan-Hydrochlorid zur Verhinderung der Oxidation zugesetzt. Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker-DRX500-Spektrometer mit einem (¹⁵N/¹³C/¹H)-Dreifachresonanzkopf aufgenommen. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Resonanzen wurde mithilfe von 2D-¹H,¹H-NOESY- und -TOCSY-Experimenten sowie 2D-¹³C,¹H-COSY-Experimenten zugeordnet.^[15]

Thermodynamik und Kinetik der Isomerisierung der Amidbindung: Die Gleichgewichtskonstanten $K_{t,c}$ des trans-cis-Konformerenverhältnisses wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durch Integration der α - und γ -Protosignale in 1D-¹H-NMR-Spektren bestimmt. Die enthalpischen und entropischen Beiträge zur Differenz der freien Enthalpie zwischen cis- und trans-Konformer wurden aus Van't Hoff-Auftragungen ermittelt: $\ln K_{ZE} = (-\Delta H^0/R)(1/T) + \Delta S^0/R$.

NMR-Konformationsanalyse: Die Geometrie des Prolinrings („pucker“) wurde nach Gerig und McLeod^[16] durch charakteristische ¹H,¹H-Kopplungsmuster in 1D-¹H-NMR-Spektren bestimmt. Der C'-exo-Knick erzeugt z.B. große und ähnliche Kopplungskonstanten $J(H_{\alpha}, H_{\beta 1})$ und $J(H_{\alpha}, H_{\beta 2})$, während beim C'-endo-Knick eine Kopplung groß und die andere klein ist. Die cis-trans-Isomerisierung der Amidbindung ist ein langsamer Prozess auf der NMR-Zeitskala, und es werden daher zwei getrennte Signalsätze für die beiden Konforme beobachtet. Die Inversion des Ringknicks ist hingegen schnell, und nur ein gemitteltes C'-endo/C'-exo-Signal wird für trans-Amid und cis-Amid beobachtet. Man kann die Anteile C'-endo und C'-exo durch folgende Gleichung abschätzen: $\Delta J_{\text{exp}} = x\Delta J_{\text{endo}} + y\Delta J_{\text{exo}}$ wobei ΔJ die Differenz zwischen $J(H_{\alpha}, H_{\beta 1})$ und $J(H_{\alpha}, H_{\beta 2})$ ist, währ-

rend ΔJ_{endo} und ΔJ_{exo} aus berechneten Diederwinkeln (DFT; Tabelle I in den Hintergrundinformationen) mittels MestRe-J^[17] bestimmt wurden.

Quantenmechanische Rechnungen: Dichtefunktionalrechnungen wurden mit dem Programm Turbomole 5.6 ausgeführt.^[18] Das B3LYP-Funktional^[19] und der TZVP-Basisatz^[20] (ein Gauß-Basisatz, verbessert durch Polarisationsfunktionen) wurden verwendet. Unterschiedliche isomere Strukturen der Verbindung **4** sowie der Mercapto- (**1**), Hydroxy- (**5**) und Fluorderivate (**6**) wurden sowohl für die Gasphase als auch mit dem Kontinuumslösungsmittelmodell Cosmo^[21] (dielektrische Konstante $\epsilon=80$) berechnet, um die Abschirmung des D₂O-Lösungsmittels zu berücksichtigen. Mulliken-Populationsanalysen^[22] wurden ausgeführt, um atomare Partialladungen zu bestimmen.

Eingegangen am 18. September 2007
Online veröffentlicht am 28. Januar 2008

Stichwörter: Konformationsanalyse · Peptide · Prolin · Pyrrolidin · Stereoelektronischer Effekt

- [1] a) J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963; b) W. J. Wedemeyer, E. Welker, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14637–14644; c) G. Fischer, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119–127; d) F. X. Schmid in *Protein Folding Handbook*, Vol. 2 (Hrsg.: J. Buchner, T. Kieffaber), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 916–945.
- [2] a) E. S. Eberhardt, N. Panasik, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12261–12266; b) N. Panasik, E. S. Eberhardt, A. S. Edison, D. R. Powell, R. T. Raines, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 262–269; c) D. Kern, M. Schutkowski, T. Drakenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8403–8408; d) M. Keller, C. Sager, P. Dumy, M. Schutkowski, G. S. Fischer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2714–2720; e) E. Beausoleil, R. Sharma, S. W. Michnick, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6572–6578; f) S. S. A. An, C. C. Lester, J. L. Peng, Y. J. Li, D. M. Rothwarf, E. Welker, T. W. Thannhauser, L. S. Zhang, J. P. Tam, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11558–11566; g) C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 949–951; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 923–925; h) M. L. DeRider, S. J. Wilkens, M. J. Waddell, L. E. Bretscher, F. Weinhold, R. T. Raines, J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497–2505; i) J. A. Hodges, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9262–9263; j) Y. Che, G. R. Marshall, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9030–9042; k) L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. DeRider, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777–778; l) C. M. Taylor, R. Hardre, P. J. B. Edwards, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1306–1315; m) W. Kim, K. I. Hardcastle, V. P. Conticello, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8321–8325; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8141–8145; n) M. D. Shoulders, J. A. Hodges, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8112–8113; o) S. K. M. Umashankara, I. R. Babu, K. N. Ganesh, *Chem. Commun.* **2003**, 2606–2607; p) I. R. Babu, K. N. Ganesh, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2079–2080.
- [3] a) I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 827–839; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 816–828; b) A. B. Mauger, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1205–1211; c) L. Moroder, C. Renner, J. J. Lopez, M. T. Mutter, G. Tuchscherer in *Cis-trans Isomerization in Biochemistry* (Hrsg.: C. Dugave), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 225–259.
- [4] a) S. K. Holmgren, K. M. Taylor, L. E. Bretscher, R. T. Raines, *Nature* **1998**, *392*, 666–667; b) S. K. Holmgren, L. E. Bretscher, K. M. Taylor, R. T. Raines, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 63–70; c) C. L. Jenkins, L. E. Bretscher, I. A. Guzei, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6422–6427; d) J. A. Hodges, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15923–15932; e) M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, H. Nishio, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 609–616; f) M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9922–9923; g) K. Kawahara, Y. Nishi, S. Nakamura, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, *Biochemistry* **2005**, *44*, 15812–15822; h) Y. Nishi, S. Uchiyama, M. Doi, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, Z. Ohkubo, Y. Kobayashi, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6034–6042; i) D. Barth, A. G. Milbradt, C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 79–86; j) M. Schumacher, K. Mizuno, H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20397–20403; k) A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11500–11501.
- [5] a) W. Kim, R. A. McMillan, J. P. Snyder, V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18121–18132; b) R. Golbik, C. Yu, E. Weyher-Stingl, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, C. Schiene-Fischer, *Biochemistry* **2005**, *44*, 16026–16034; c) S. C. R. Lummis, D. L. Beene, L. W. Lee, H. A. Lester, R. W. Broadhurst, D. A. Dougherty, *Nature* **2005**, *438*, 248–252.
- [6] a) V. Eswarakrishnan, L. Field, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4182–4187; b) A. J. Verbiscar, B. Witkop, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1924–1927.
- [7] a) D. S. Kemp, J. H. Rothman, T. C. Curran, D. E. Blanchard, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3809–3812; b) G. V. Nikiforovich, J. L. F. Kao, K. Plucinska, W. J. Zhang, G. R. Marshall, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3591–3598; c) K. Plucinska, T. Kataoka, M. Yodo, W. L. Cody, J. X. He, C. Humblet, G. H. Lu, E. Lunney, T. C. Major, R. L. Panek, P. Schelkun, R. Skeean, G. R. Marshall, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1902–1913; d) T. Kataoka, D. D. Beusen, J. D. Clark, M. Yodo, G. R. Marshall, *Biopolymers* **1992**, *32*, 1519–1533.
- [8] C. Grathwohl, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1976**, *15*, 2025–2041.
- [9] G. B. Liang, C. J. Rito, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4440–4442.
- [10] J. L. Flippin-Anderson, R. Gilardi, I. L. Karle, M. H. Frey, S. J. Opella, L. M. Giersch, M. Goodman, V. Madison, N. G. Delaney, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6609–6614.
- [11] U. Kusebauch, S. A. Cadamuro, H. J. Musiol, M. O. Lenz, J. Wachtveitl, L. Moroder, C. Renner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7170–7173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7015–7018.
- [12] a) V. Nagarajan, S. Kamitoro, K. Okuyama, *J. Biochem.* **1999**, *125*, 310–318; b) R. Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, H. M. Berman, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 623–638; c) R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, A. Zagari, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 262–270; d) L. Vitagliano, R. Berisio, A. Mastrangelo, L. Mazzarella, A. Zagari, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2627–2632; e) L. Vitagliano, R. Berisio, L. Mazzarella, A. Zagari, *Biopolymers* **2001**, *58*, 459–464.
- [13] R. Improta, C. Benzi, V. Barone, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12568–12577.
- [14] R. T. Raines, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1219–1225.
- [15] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [16] J. T. Gerig, R. S. McLeod, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5725–5729.
- [17] A. Navarro-Vazquez, J. C. Cobas, F. J. Sardina, J. Casanueva, E. Diez, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1680–1685.
- [18] a) R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, C. Kölmel, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 165–169; b) O. Treutler, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 346–354.
- [19] a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652; b) C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [20] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829–5835.
- [21] A. Klamt, G. Schüürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 799–805.
- [22] R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 1833–1840.