

## Konformationsanalytische Untersuchungen von N-terminalen *O*-Glycopeptidsequenzen des Interleukin-2\*

Hans Paulsen, Annette Pollex-Krüger und Volker Sinnwell

*Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13  
(Bundesrepublik Deutschland)*

(Eingegangen am 20. März 1990; angenommen in revidierter Form am 19. Oktober 1990)

### ABSTRACT

The preferred conformations of eight *O*-glycopeptide sequences from the *N*-terminus of interleukin-2 containing two to ten amino acids, monoglycosylated at  $\text{Thr}^3$  with a 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl group, were determined by means of n.m.r. spectroscopic methods. The preferred conformation of the *N*-terminal sequence, L-Ala-L-Pro-[ $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)]-L-Thr-L-Ser, including the *O*-glycosidically linked 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl group is not substantially influenced by the linkage of additional amino acids at the C-terminal end. Extended conformations were observed for all peptide units. Measurements of the relaxation times of the  $^{13}\text{C}$  atoms showed that the 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose bound to the central amino acids has the lowest mobility, whereas the terminal amino acid residues and peptide side-chains are flexible. Calculations with the force-field program AMBER yielded conformations of minimized energies that were in good agreement with the n.m.r. spectroscopic data. This was only true when n.m.r. parameters that can be used as starting values for the calculations were available. Comparison with a nonglycosylated, *N*-terminal tetrapeptide sequence analog did not suggest changes in the peptide conformation when  $\text{Thr}^3$  is glycosylated with a 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl group.

### ZUSAMMENFASSUNG

Bevorzugte Konformationen von *O*-Glycopeptidsequenzen aus dem N-Terminus des Interleukin-2 werden mit n.m.r.-spektroskopischen Methoden ermittelt. Acht Peptidsequenzen enthalten zwei bis zehn Aminosäuren und sind an  $\text{Thr}^3$  mit einer 2-Acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-Gruppe monoglycosyliert. Die bevorzugte Konformation der N-terminalen Sequenz L-Ala-L-Pro-[ $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)]-L-Thr-L-Ser einschließlich der *O*-glycosidisch gebundenen  $\alpha$ -D-GalNAc-Einheit wird durch Anknüpfung weiterer Aminosäuren am C-terminalen Ende nicht wesentlich beeinflußt. Für alle Peptidketten werden gestreckte Konformationen beobachtet. Relaxationszeitmessungen der  $^{13}\text{C}$ -Atome zeigen, daß die 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Einheit mit den zentralen Aminosäure-Einheiten die geringste Beweglichkeit besitzt, während die terminalen Aminosäure-Einheiten und Peptid-Seitenketten flexibel sind. Konformationsberechnungen mit dem Kraftfeld-Programm AMBER ergeben energieärmste Konformationen, die sich in guter Übereinstimmung mit den n.m.r.-spektroskopischen Daten befinden, wenn N.m.r.-Parameter als Startwerte für die Berechnung eingesetzt werden können. Ein Vergleich mit einem sequenzanalogen, nicht glycosylierten N-terminalen Tetrapeptid ergibt keinen Hinweis, daß sich die Peptidkonformation ändert, wenn  $\text{Thr}^3$  mit einer 2-Acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-Gruppe glycosyliert ist.

\* XXIX. Mitteilung der Serie "Konformationsanalyse". XXVIII. Mitteilung, siehe Zit. 1.

## EINFÜHRUNG

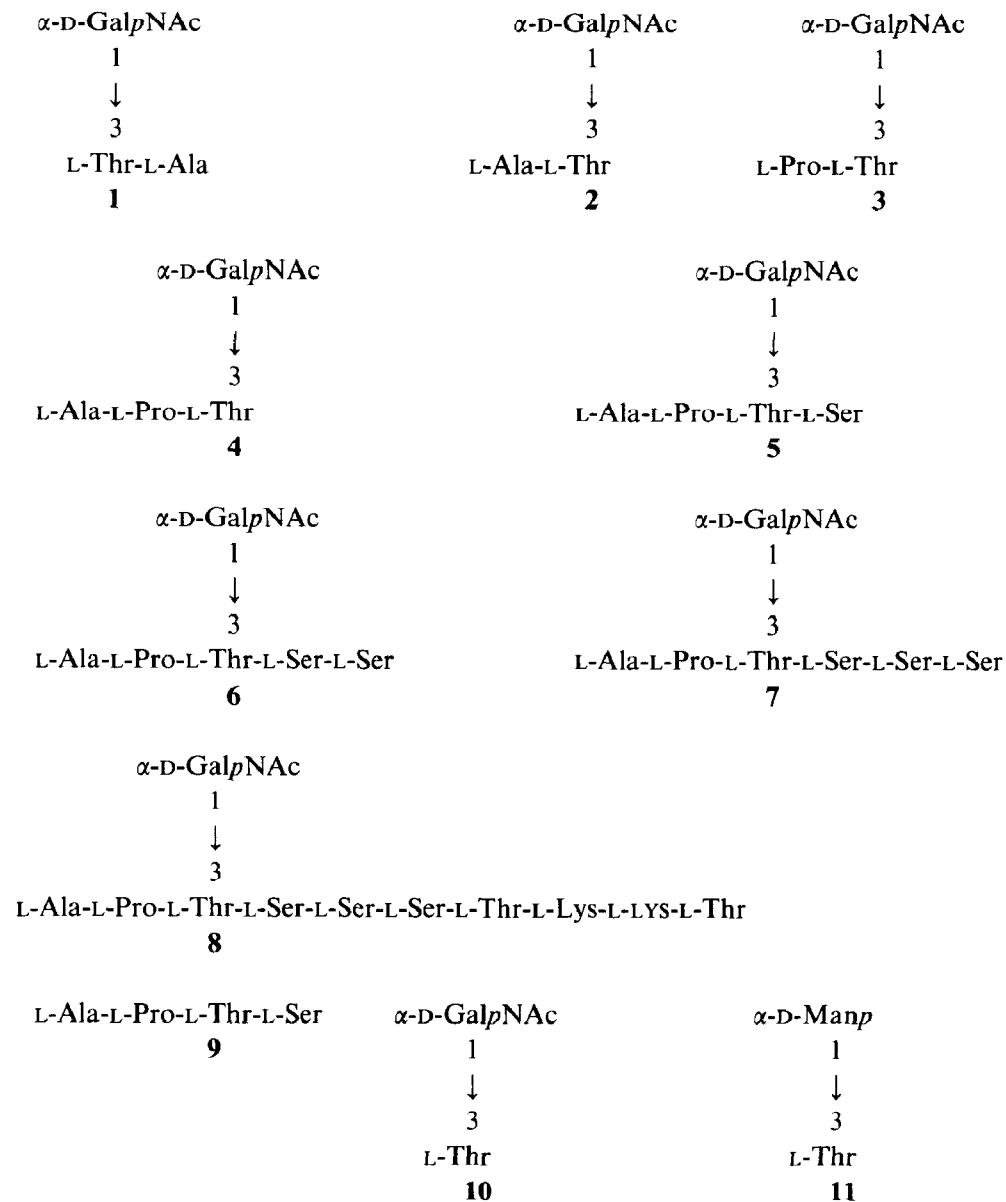
In den letzten Jahren ist eine Anzahl von Studien über konformative Effekte bei der *O*-Glycosylierung erschienen<sup>2,3</sup>. Untersuchungen an *O*-Glycoproteinen des Mucin-Typs<sup>4,5</sup> und an Gefrierschutz-Glycoproteinen<sup>6,7</sup> ergaben eine starke Einschränkung der konformationellen Möglichkeiten an der Kohlenhydrat-Peptid-Bindung. Rose *et al.*<sup>8</sup> haben berichtet, daß sich bei Entfernen der 2-Acetamido-2-desoxy- $\beta$ -galactose-Einheit des Ovin submaximillaren Mucins die Konformation von einer gestreckten Struktur zur Globulärform ändert. Die Entfernung anderer Monosaccharid-Einheiten führte zu keiner solchen Änderung, solange die 2-Acetamido-2-desoxy- $\beta$ -galactose-Peptid-Bindung erhalten blieb.

Trotzdem ist bisher über den Ablauf der Biosynthese der *O*-Glycoproteine wenig bekannt. Insbesondere ist ungeklärt, wie der Ort der Glycosylierung festgelegt wird, d.h. durch welche Faktoren eine Hydroxylaminosäure als Substrat von der Glycosyltransferase erkannt wird. Eine Signalsequenz, die als Erkennungsregion für das Enzym fungiert und die Glycosylierung einleitet, wie sie für *N*-Glycoproteine gefunden wurde, ist für die *O*-Glycoproteine nicht festgestellt worden. Auf jeden Fall ist jedoch die Zugänglichkeit der Hydroxylfunktion von Serin oder Threonin für den Ort der Glycosylierung von entscheidender Bedeutung.

In systematischen Untersuchungen an *O*-Glycoproteinen des Mucin-Typs wurde nun eine Häufung der Aminosäure Prolin in der unmittelbaren Nachbarschaft der Glycosylierungsstelle gefunden<sup>9</sup>. Da Prolin durch seine einzigartige cyklische Struktur zu Störungen der regulären Peptidsekundärstruktur Anlaß gibt, wird möglicherweise so die Zugänglichkeit einzelner Hydroxylaminosäuren für die Glycosylierungsenzyme erhöht. Konformationsanalytische Untersuchungen von *O*-Glycopeptidstrukturen können hier neue Einsichten in Struktur-Funktionsbeziehungen bei der Biosynthese von *O*-Glycoproteinen liefern.

In der vorliegenden Arbeit werden konformationsanalytische Untersuchungen von *O*-Glycopeptidsequenzen aus der *N*-terminalen Region von Interleukin-2 beschrieben. Das Glycoprotein Interleukin-2 gehört zur Klasse der Lymphokine, die als Botenstoffe des Immunsystems eine zentrale Rolle in der Immunabwehr des Körpers einnehmen. Interleukin-2 wurde früher als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, da es an aktivierte T-Lymphozyten bindet und sie dadurch zur Proliferation stimuliert<sup>10</sup>. Nachdem es Taniguchi *et al.*<sup>11</sup> gelang, die cDNA zu isolieren, die für Interleukin-2 codiert, konnte die Aminosäuresequenz aufgeklärt werden. Interleukin-2 besteht aus 133 Aminosäuren, von denen nur die Threonin<sup>3</sup>-Einheit glycosyliert ist<sup>12</sup>. Das Tetrasaccharid  $\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 6)]- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr<sup>3</sup> und das Trisaccharid  $\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr<sup>3</sup> sind die Hauptoligosaccharidsequenzen, die an Thr<sup>3</sup> des menschlichen Interleukin-2 gebunden sind<sup>12</sup>.

Die hier untersuchten Verbindungen **1–9** liegen als unblockierte Strukturen vor. Die Synthesen der Glycopeptide **1–8** sind in einer vorhergehenden Arbeit beschrieben worden<sup>13</sup>. Verbindung **10** wird nur als Kontrollsubstanz für die Kraftfeldrechnungen



benötigt und hier nicht weiter diskutiert. Die Peptidstrukturen der Verbindungen **1–8** sind monoglycosyliert mit einer  $\alpha\text{-D-GalpNAc}$ -Einheit, der Kohlenhydratteil entspricht somit der  $\text{T}^{\text{N}}$ -Antigenstruktur. Das Tetrapeptid **9** besitzt die gleiche Aminosäuresequenz wie das Glycopeptid **5**, so daß mögliche Glycosylierungseffekte durch direkten Vergleich nachprüfbar sind.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

*Methoden.* — Die Konformationsanalysen werden mit Hilfe der modernen n.m.r.-spektroskopischen Methoden, besonders des ROESY-Experiments<sup>14,15</sup>, in Kombination mit Kraftfeldberechnungen (Programm AMBER) durchgeführt. Die Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-n.m.r.-Signale der Verbindungen **1–9** gelingt nach Durchführung homo- und heteronuklearer Korrelationsexperimente. Alle Spektren können ohne die Anwendung von Relayed-Methoden gelöst werden.

Die Kopplungskonstanten werden soweit wie möglich erster Ordnung ausgewertet. Bei Spektren höherer Ordnung werden die exakten Kopplungskonstanten nach Simulation mit dem LAOCOON-Typ-Programm PANIC 85 ermittelt. Die Konformation und das Bewegungsverhalten der Glycopeptide **1–8** und des Tetrapeptids **9** werden anhand der folgenden experimentellen Parameter untersucht: (a) Spin-Gitter-Relaxationszeiten  $T_1$  der <sup>13</sup>C-Kerne; (b) Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen; (c) homonukleare  $J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten; (d) n.O.e.-Effekte.

Die Beweglichkeit des Gesamt moleküls oder einzelner Molekülsegmente lässt sich aus den <sup>13</sup>C- $T_1$ -Werten ableiten<sup>16</sup>. Da  $T_1$  umgekehrt proportional zur molekularen Korrelationszeit  $\tau_c$  ist, bedeuten kleine  $NT_1$ -Werte langsame Bewegungen, während große  $NT_1$ -Werte schnellen Molekülbewegungen entsprechen (mit  $N$  = Anzahl der direkt gebundenen H-Atome). Der Temperaturkoeffizient der amidischen Protonen  $d\delta/dT$  gibt erste Hinweise auf die Gerüstkonformation der Peptide. Bei Koeffizienten kleiner als  $3 \times 10^{-3}$  p.p.m./K liegt das NH-Proton intramolekular in einer Wasserstoffbrücke gebunden vor, oder es ist in anderer Weise gegen das Lösungsmittel abgeschirmt. Beides indiziert eine bevorzugte Konformation in diesem Peptidbereich. Liegt der Koeffizient oberhalb von  $6 \times 10^{-3}$  p.p.m./K, geht man von einer Wechselwirkung des NH-Protons mit dem Lösungsmittel aus; es liegt dann eine externe Orientierung vor<sup>17,18</sup>.

Direkte Parameter der molekularen Konformation sind die vicinalen Kopplungskonstanten und die intramolekularen n.O.e.-Effekte. Für die Abhängigkeit der  $J_{\text{NH},\text{CH}_2}$ -Kopplungskonstanten vom  $\phi$ -Winkel des Peptidgerüsts ist eine analoge Karplus-Kurve abgeleitet worden<sup>19,20</sup>. Von allen Verbindungen werden eindimensionale n.O.e.-Differenzspektren aufgenommen, deren Effekte jedoch meistens sehr klein sind. Bei den Verbindungen **4–9** sind die n.O.e.-Effekte teils positiv, teils negativ. Dieses zeigt, daß die Strukturen offensichtlich im Bewegungsbereich mit  $\omega_0\tau \approx 1$  liegen, wo der n.O.e.-Effekt seinen Nulldurchgang hat. Für diese Moleküle werden ROESY-Experimente durchgeführt. Die Auswertung erfolgt wie üblich qualitativ durch Einteilung der ROESY-Kreuzsignale nach starken (s), mittelstarken (m) und schwachen (w) Effekten. Unter den hier gegebenen experimentellen Bedingungen entspricht ein starkes Kreuzsignal einer Entfernung von maximal 2.5 Å, ein mittelstarker Effekt etwa 3.0 Å und ein schwacher n.O.e.-Effekt  $\sim 3.5$  Å. Auch die 1D-n.O.e.-Werte werden qualitativ als Prozent der Einstrahlungsintensität angegeben und nicht als relative n.O.e.-Effekte, bezogen auf einen bekannten Standardabstand im Molekül. Eine quantitative Be-

handlung der n.O.e.-Effekte ist nicht möglich, da in den Molekülen **1–9** keine isotropen Gesamtbewegungen vorliegen. Diese sind jedoch notwendig, da die innermolekularen Beweglichkeiten Einfluß auf die Kreuzrelaxation und somit auf die Größe des n.O.e.-Wertes haben. Für Differenzen von  $\Delta NT_1 = 0.1$  s sind die Grenzen der halbquantitativen Auswertung erreicht. Die n.O.e.- und ROESY-Experimente lassen auch ohne quantitativen Vergleich weitreichende Aussagen über die Konformation eines Glycopeptids in Lösung zu.

Ergänzend zu den n.m.r.-spektroskopischen Untersuchungen werden Konformationsberechnungen mit dem in das Programm MACROMODEL<sup>21</sup> integrierten Kraftfeld-Programm AMBER<sup>22</sup> durchgeführt. Wie vergleichende Berechnungen zeigen, werden die besten Ergebnisse bei der Vorgabe von freien CO<sub>2</sub>H- und NH<sub>2</sub>-Gruppierungen für die endständigen Aminosäuren erzielt. Auch die Seitenketten-Aminfunktionen der Lysin-Einheiten in **8** werden als neutrale NH<sub>2</sub>-Gruppen vorgegeben. Alle Molekülberechnungen werden ohne Berücksichtigung der Lösungsmittelumgebung quasi im Vakuum vorgenommen.

Für die Kalkulation der glycosidischen Bindung wird davon ausgegangen, daß der  $\phi$ -2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Winkel, dem *exo*-anomeren Effekt folgend, den Winkelbereich von  $\phi = 0$  bis  $-120^\circ$  nicht verläßt. Für die 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Einheit wird die CH<sub>2</sub>OH-Seitengruppe in der *gt*-Konformation ( $\omega = 60^\circ$ ) vorgegeben und die NHAc-Gruppierung in der *trans*-Anordnung positioniert (H-2-C-2-N-H =  $180^\circ$ ). Probekalkulationen von 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Monosacchariden zeigen, daß das AMBER-Programm für die *gt*-Konformation ein Minimum berechnet. Die relativen Energien für die *tg*- und *gg*-Konformere liegen weit höher.

Für die Amid- bzw. Peptidbindungen wird vorausgesetzt, daß sie ausschließlich in der *trans*-Form vorliegen. Alle übrigen Diederwinkel werden im vollständigen Konformationsraum berechnet. Hierfür wird in  $30^\circ$ -Inkrementen variiert, in der Nähe eines Minimums wird in  $5$ – $10^\circ$ -Schritten vorgegangen, bis die Minimumskonformation erreicht ist. Bei der Vielzahl der variablen Diederwinkel der größeren Glycopeptidstrukturen **5–8** ist eine eingehende Analyse aller möglichen Winkelkombinationen nicht praktikabel. Daher werden dort die Ergebnisse der n.m.r.-spektroskopischen Analyse als vernünftige Startparameter für die Energieminimierungsberechnungen eingesetzt.

*Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-n.m.r.-Spektren.* — Die hier untersuchten Glycopeptide zeigen in vielen wesentlichen Teilstrukturen die gleichen Konformationen. Daher werden die Verbindungen **1–9** im folgenden unter gemeinsamen Strukturaspekten diskutiert. Die Zuordnungen der chemischen Verschiebungen der 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-<sup>23</sup> und Aminosäure-Einheiten stimmen mit in der Literatur angegebenen Daten überein. Als Vergleichswerte für die Aminosäure-Einheiten dienen "random-coil"-Daten, die von Wüthrich *et al.*<sup>24</sup> nach systematischen Untersuchungen von Di- und Tripeptiden ermittelt wurden. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-n.m.r.-Daten der Verbindungen **1–9** sind in den Tabellen I und II zusammengestellt. Die Kopplungskonstanten der komplexen Multipletts der Prolin-Einheiten und der Lysin-Seitenketten von **8** können nicht ausgewertet werden. Das Glycopeptid **6** zeigt ein so ungünstiges Relaxations-

TABELLE I

<sup>1</sup>H-N.m.r.-chemische Verschiebungen<sup>a</sup> und Kopplungskonstanten<sup>b</sup> der Verbindungen 1-9<sup>c</sup>

Verbindung	<i>z-D-GalNAc-Einheit</i>								
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6R	H-6S	AcNH	CH <sub>3</sub> CO
<b>1</b>	5.04 (3.7)	4.16 (11.1)	3.89 (3.1)	3.99 (0.7)	4.03	3.79 (7.2)	3.76 (5.0)	7.66 (9.6)	2.05
<b>2</b>	4.94 (3.7)	4.10 (10.9)	3.87 (3.3)	3.98 (1.2)	4.04	3.73 (7.7)	3.71 (4.6)	7.91 (9.7)	2.04
<b>3</b>	4.99 (3.7)	4.16 (11.0)	3.93 (3.1)	4.01 (1.4)	4.09	3.79 (7.6)	3.77 (4.6)	7.81 (9.7)	2.10
<b>4</b>	4.97 (3.7)	4.15 (11.1)	3.94 (3.2)	4.00 (1.1)	4.11	3.77 (7.0)	3.76 (5.7)	7.79 (9.6)	2.08
<b>5</b>	5.03 (3.6)	4.14 (11.0)	3.94 (2.6)	3.98 (1.2)	4.09	3.76 (6.6)	3.75 (9.3)	7.83 (9.3)	2.05
<b>6</b>	4.95 (3.4)	4.08 (11.0)	3.88 (3.0) <sup>d</sup>	3.95 (1.0) <sup>d</sup>	4.06	3.75 (6.5) <sup>d</sup>	3.71 (4.5) <sup>d</sup>	7.80 (9.0)	2.02
<b>7</b>	4.95 (3.8)	4.09 (11.3)	3.89 (3.4)	3.96 (1.1)	4.05	3.75 (7.0)	3.72 (5.0)	7.77 (9.7)	2.03
<b>8</b>	4.95 (3.7)	4.11 (11.0)	3.91 (2.9)	3.99 (0.9)	4.06	3.78 (6.8)	3.75 (5.7)	7.74 (9.7)	2.05
Verbindung	<i>Peptid-Einheit NH</i>		$\alpha$ -H	$\beta$ -H	$\beta'$ -H	$\gamma$ -H	$\delta$ -H	$\delta'$ -H	$\epsilon$ -H
	Thr <sup>i</sup>		4.08 <sup>e</sup> (2.2) <sup>f</sup>	4.41 (6.6)		1.46			
<b>1</b>	Ala <sup>i</sup>	8.48 (7.2)	4.27 (7.2)	1.39					
<b>2</b>	Ala <sup>i</sup>		4.16 <sup>e</sup> (7.0) <sup>f</sup>	1.55					
	Thr <sup>i</sup>	8.63 (9.1)	4.27 (2.3)	4.32 (6.5)		1.22			
<b>3</b>	Pro <sup>i</sup>		4.56	2.57	2.24	2.13	3.51	3.44	
	Thr <sup>i</sup>	8.45 (8.9)	4.33 (2.5)	4.39 (6.5)		1.30			
<b>4</b>	Ala <sup>i</sup>		4.36 <sup>e</sup> (6.8) <sup>f</sup>	1.45					
	Pro <sup>i</sup>		4.63 (5.2)	2.36	2.08	2.07	3.78	3.67	
	Thr <sup>i</sup>	8.00 (8.9)	4.28 (2.6)	4.33 (6.5)		1.29			

<b>5</b>	Ala <sup>1</sup>	4.38 (6.8)	1.54				
	Pro <sup>2</sup>	4.66 (6.4) (8.0)	2.39	2.02	2.03	3.76	3.64
<b>6</b>	Thr <sup>3</sup>	8.52 (8.2)	4.56 (2.4)	4.34 (6.4)		1.32	
	Ser <sup>4</sup>	8.26 (7.6)	4.28	3.86 (4.3)	3.84 (4.0)		
<b>7</b>	Ala <sup>1</sup>		1.41 <sup>c</sup> (7.0) <sup>d,e</sup>				
	Pro <sup>2</sup>	4.62	2.34	1.97	2.01	3.73	3.62
<b>7</b>	Thr <sup>3</sup>	8.59 <sup>f</sup> (8.5) <sup>d</sup>	4.54 (2.5)	4.32 (6.0)		1.31	
	Ser <sup>4</sup>	8.35 <sup>f</sup> (9.0) <sup>d</sup>	4.54	3.89 (5.2) <sup>d</sup>	3.83 (5.2) <sup>d</sup>		
<b>7</b>	Ser <sup>5</sup>	8.08 (7.0)	4.22 (4.3)	3.83			
	Ala <sup>1</sup>		4.36 (6.9)	1.52			
<b>8</b>	Pro <sup>2</sup>	4.64 (6.1) (8.3)	2.37	1.98	2.04	3.73	3.62
	Thr <sup>3</sup>	8.63 (8.4)	4.54 (2.7)	4.31 (6.4)		1.32	
<b>8</b>	Ser <sup>4</sup>	8.42 (7.4)	4.57 (5.5)	3.87			
	Ser <sup>5</sup>	8.35 (7.6)	4.47	3.93 (5.2)	3.87 (5.0)		
<b>8</b>	Ser <sup>6</sup>	8.49 (7.2)	4.28	3.85 (4.0)	3.83 (5.1)		
	Ala <sup>1</sup>		4.36 (7.0)	1.53			
<b>8</b>	Pro <sup>2</sup>	4.67 (6.0) (8.6)	2.39	1.98	2.07	3.74	3.64
	Thr <sup>3</sup>	8.64 (8.6)	4.56 (2.4)	4.34 (6.4)		1.34	
<b>8</b>	Ser <sup>4</sup>	8.45 (6.3)	4.58	3.90 (5.4)	3.86 (5.6)		
	Ser <sup>5</sup>	8.49 (7.0)	4.54	3.94 (5.5)	3.88 (5.3)		
<b>8</b>	Ser <sup>6</sup>	8.54 (6.5)	4.48	3.95 (5.5)	3.88 (5.3)		
	Thr <sup>7</sup>	8.16 (7.5)	4.34 (2.4)	4.24 (6.5)		1.22	
<b>8</b>	Lys <sup>8</sup>	8.26 (6.6)	4.35 (6.0) <sup>d</sup>	1.84	1.77	1.45	1.70
							3.00

	Lys <sup>a</sup>	8.45 (6.9)	4.42 (5.9)	1.91 (8.6)	1.78	1.49	1.70	3.00
9	Thr <sup>b</sup>	7.89 (8.5)	4.16 (3.9)	4.25 (6.5)		1.17		
	Ala <sup>c</sup>		4.35	1.51 (7.1)				
	Pro <sup>c</sup>		4.57 (6.0)	2.35 (8.8)	1.98	2.03	3.69	3.62
	Thr <sup>c</sup>	8.33 (7.8)	4.35 (4.0)	4.28 (6.4)		1.22		
	Ser <sup>c</sup>	7.94 (7.3)	4.24 (4.5)	3.83				

<sup>a</sup>  $\delta$ -Werte. <sup>b</sup>  $J$  in Hz in Klammern. <sup>c</sup> Lösung in D<sub>2</sub>O; für NH-Protonen, 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O; externer Standard: Acetonitril,  $\delta$  2.07;  $T$  300 K; 400.13 MHz. <sup>d</sup> Abgeschätzte  $\delta$ - und  $J$ -Werte. <sup>e</sup> Lösung in 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O. <sup>f</sup> Zuordnung kann vertauscht sein.

TABELLE II

<sup>13</sup>C-N.m.r.-chemische Verschiebungen<sup>a</sup> der Verbindungen 1-9<sup>b</sup>

Verbindung	$\alpha$ -D-GalNAc-Einheit							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH <sub>2</sub> CO	CH <sub>3</sub> CO
1	99.60	50.32	68.24	69.01	71.94	61.69	22.65	174.80
2	99.12	50.43	68.46	69.03	71.76	61.70	22.73	175.12
3	99.12	50.43	68.49	69.03	71.75	61.69	22.74	175.17
4	99.20	50.46	68.47	69.01	71.71	61.66	22.72	175.12
5	98.87	50.43	68.31	69.09	71.88	61.74	22.76	178.00
6	99.21	50.62	68.71	69.32	72.04	61.89	22.97	175.05
7	99.21	50.56	68.68	69.27	71.99	61.93	22.94	174.55
8	99.16	50.21	68.39	69.00	71.75	61.72	22.74	174.83
Verbindung	Peptid-Einheit	$\alpha$ -C	$\beta$ -C	$\gamma$ -C	$\delta$ -C	$\varepsilon$ -C	CO	
1	Thr <sup>c</sup>	58.01	75.91	18.13			169.80	
	Ala <sup>c</sup>	51.28	18.17				179.40	
2	Ala <sup>c</sup>	49.67	17.32				171.6 <sup>c</sup>	
	Thr <sup>c</sup>	59.64	77.21	18.36			174.9	
3	Pro <sup>c</sup>	60.24	30.18	24.19	47.05		169.87	
	Thr <sup>c</sup>	60.00	77.07	18.38			175.66	
4	Ala <sup>c</sup>	48.46	15.90				170.28	
	Pro <sup>c</sup>	61.02	29.62	25.14	48.16		173.86	
	Thr <sup>c</sup>	59.54	77.67	18.36			176.06	
5	Ala <sup>c</sup>	48.56	15.63				171.79	
	Pro <sup>c</sup>	60.64	29.95	25.21	48.23		176.56	
	Thr <sup>c</sup>	57.77	76.08	18.04			172.87	
	Ser <sup>c</sup>	57.52	62.72				177.04	
6	Ala <sup>c</sup>	48.54	17.27				172.77	
	Pro <sup>c</sup>	61.01	29.94	25.32	48.33		175.21	
	Thr <sup>c</sup>	58.08	76.50	18.46			171.92	
	Ser <sup>c</sup>	55.87	62.39				171.53	
	Ser <sup>c</sup>	57.96	62.78				176.64	

7	Ala <sup>1</sup>	48.74	15.78			169.77
	Pro <sup>2</sup>	61.00	30.03	25.32	48.37	176.25
	Thr <sup>3</sup>	58.09	76.51	18.44		171.49
	Ser <sup>4</sup>	55.62	62.26			171.57
	Ser <sup>5</sup>	56.31	61.86			174.83
	Ser <sup>6</sup>	57.87	62.77			171.87
8	Ala <sup>1</sup>	48.45	15.69			170.10
	Pro <sup>2</sup>	60.67	29.90	25.12	48.14	173.95 <sup>c</sup>
	Thr <sup>3</sup>	57.84	76.55	18.65		171.76
	Ser <sup>4</sup>	55.34	61.49			172.17 <sup>c</sup>
	Ser <sup>5</sup>	56.04	62.03			172.66
	Ser <sup>6</sup>	56.04	61.41			172.63
	Thr <sup>7</sup>	59.66	67.29	19.32		172.17 <sup>c</sup>
	Lys <sup>8</sup>	53.90	30.83	22.38	26.69 <sup>c</sup>	39.65
	Lys <sup>9</sup>	54.01	30.83	22.38	26.58 <sup>c</sup>	39.65
	Thr <sup>10</sup>	60.77	68.33	19.68		177.01
9	Ala <sup>1</sup>	48.57	15.54			
	Pro <sup>2</sup>	60.98	29.90	25.20	48.20	
	Thr <sup>3</sup>	59.44	67.58	19.29		
	Ser <sup>4</sup>	57.66	62.45			

<sup>a</sup>  $\delta$ -Werte. <sup>b</sup> Lösung in D<sub>2</sub>O; externer Standard: Acetonitril,  $\delta$  1.3;  $T$  300 K; 100.63 MHz. <sup>c</sup> Zuordnung kann vertauscht sein.

verhalten, daß Kopplungskonstanten nur abgeschätzt werden können. Vermutlich liegen im n.m.r.-Spektrum nicht sichtbare Verunreinigungen vor, die die transversale Relaxationszeit  $T_2$  herabsetzen. Die <sup>1</sup>H-n.m.r.-Daten von **6** sind daher nur unvollständig tabelliert. Die Zuordnung der verschiedenen Serin-Einheiten in **6**, **7** und **8** sowie der drei Threonin- und zwei Lysin-Einheiten in **8** gelingt über die <sup>13</sup>C- $T_1$ -Werte der C<sup>α</sup>-Atome des Peptidgerüsts (Tab. III), da die endständigen Aminosäure-Einheiten höhere Beweglichkeiten und damit höhere <sup>13</sup>C- $T_1$ -Werte zeigen als die peptidgebundenen Einheiten. Die C-terminalen Serin-Einheiten in **6** und **7** lassen sich außerdem durch die Säurelabilität der  $\delta$ -Werte nachweisen, indem zuerst Messungen in reinem Deuterium-oxid durchgeführt werden und danach unter Zugabe von Trifluoressigsäure bei pH 3 wiederholt werden. Durch die starke Anisotropie der Carboxylatgruppe ist ein Tieffeldshift der endständigen Serin-NH- und C<sup>α</sup>-H-Protonen zu beobachten. Unabhängig davon wird die Sequenzierung später durch ROESY-Experimente bestätigt.

In den Glycopeptiden **1** und **2** liegt jeweils eine genaue Umkehr in der Aminosäuresequenz vor, so daß der Einfluß von N-terminaler Stellung auf die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren diskutiert werden kann. In den <sup>13</sup>C-n.m.r.-Spektren treten systematische Effekte auf. Für die Aminosäure-Einheiten ergibt sich für alle C-Atome eine Tieffeldverschiebung, wenn sie von der N-terminalen in die C-terminalen Stellung überwechseln. Die Verschiebungen betragen für Thr<sup>α</sup>-C und Thr<sup>β</sup>-C 1.6 bzw. 1.3 p.p.m., für Thr<sup>γ</sup>-C ist der Unterschied mit 0.3 p.p.m. gering. Das Signal des Threonin-Carbonylkohlenstoffatoms erfährt gleichfalls einen Tieffeldshift von 5.1 p.p.m. Die Verschiebungen zu tiefem Feld betragen in der Alanin-Einheit 1.6 für Ala<sup>α</sup>-C, 0.9 für Ala<sup>β</sup>-C und 7.8 p.p.m. für Ala-CO. Dill *et al.*<sup>2</sup> haben in <sup>13</sup>C-n.m.r.-Studien an Glycopeptiden und -proteinen genau die gleichen Effekte gefunden. N-Terminale

TABELLE III

<sup>13</sup>C-T<sub>1</sub>-Werte<sup>a</sup> der Verbindungen 1-9<sup>b</sup>

Verbindung	$\alpha$ -D-GalNAc-Einheit							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> CO
1	0.41	0.41	0.44	0.42	0.43	0.31	0.99	1.75
2	0.41	0.39	0.43	0.45	0.42	0.35	1.13	2.15
3	0.44	0.42	0.38	0.47	0.41	0.37	1.10	5.38
4	0.35	0.32	0.36	0.43	0.42	0.31	1.67	2.28
5	0.24	0.20	0.23	0.20	0.22	0.16	1.18	1.05
6	0.18	0.12	0.15	0.16	0.15	0.10	0.77	1.07
7	0.16	0.13	0.14	0.15	0.15	0.09	0.55	0.36
8	0.12	0.10	0.13	0.13	0.12	0.08	0.46	0.74
Verbindung	Peptid-Einheit							
	$\alpha$ -C	$\beta$ -C	$\gamma$ -C	$\delta$ -C	$\epsilon$ -C	CO		
1	Thr <sup>1</sup>	0.20	0.30	0.63			1.85	
	Ala <sup>2</sup>	0.46	0.63				1.82	
2	Ala <sup>1</sup>	0.39	0.72				2.64	
	Thr <sup>2</sup>	0.34	0.44	0.47			2.00	
3	Pro <sup>1</sup>	0.75	0.68	0.97	0.70		4.48	
	Thr <sup>2</sup>	0.27	0.41	0.52			7.76	
4	Ala <sup>1</sup>	0.46	0.98				2.07	
	Pro <sup>2</sup>	0.47	0.39	0.52	0.23		2.00	
	Thr <sup>3</sup>	0.43	0.47	0.46			2.00	
5	Ala <sup>1</sup>	0.29	1.05				0.41	
	Pro <sup>2</sup>	0.29	0.26	0.43	0.13		0.40	
	Thr <sup>3</sup>	0.21	0.22	0.37			0.44	
	Ser <sup>4</sup>	0.42	0.54				0.50	
6	Ala <sup>1</sup>	0.30	0.62				0.13	
	Pro <sup>2</sup>	0.16	0.13	0.15	0.09		1.07	
	Thr <sup>3</sup>	0.18	0.14	0.25			1.15	
	Ser <sup>4</sup>	0.23	0.10				1.28	
	Ser <sup>5</sup>	0.26	0.12				2.28	
7	Ala <sup>1</sup>	0.18	0.48				0.76	
	Pro <sup>2</sup>	0.19	0.16	0.32	0.07		0.79	
	Thr <sup>3</sup>	0.11	0.12	0.23			0.68	
	Ser <sup>4</sup>	0.16	0.08				0.81	
	Ser <sup>5</sup>	0.24	0.09				0.55	
	Ser <sup>6</sup>	0.34	0.17				0.76	
8	Ala <sup>1</sup>	0.17	0.43				0.77	
	Pro <sup>2</sup>	0.16	0.14	0.22	0.07			
	Thr <sup>3</sup>	0.11	0.10	0.17			0.76	
	Ser <sup>4</sup>	0.13	0.06					
	Ser <sup>5</sup>	0.13	0.06					
	Ser <sup>6</sup>	0.13	0.06					
	Thr <sup>7</sup>	0.13	0.13	0.23				
	Lys <sup>8</sup>	0.13	0.06	0.14	0.25	0.37		
	Lys <sup>9</sup>	0.15	0.06	0.14	0.28	0.37		
	Thr <sup>10</sup>	0.25	0.18	0.29			1.02	
9	Ala <sup>1</sup>	0.27	0.60					
	Pro <sup>2</sup>	0.42	0.31	0.38	0.16			
	Thr <sup>3</sup>	0.37	0.35	0.35				
	Ser <sup>4</sup>	0.58	0.20					

<sup>a</sup> In Sekunden. <sup>b</sup> Für Lösungen in D<sub>2</sub>O; T 300 K; 100.63 MHz; Relaxationswartezeit 2.0 s; Wartezeiten: 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.6, 0.9, 1.5, 2.6 s.

Aminosäuren weisen ganz ähnliche  $^{13}\text{C}$ -n.m.r.-chemische Verschiebungen auf wie die entsprechenden nicht-terminalen Einheiten. Durch den Anisotropie-Effekt der Carboxylatgruppe werden die C-terminalen Aminosäure-Einheiten stärker entschirmt und so bei tieferem Feld detektiert als die nicht-terminalen Einheiten.

*Konformation an der glycosidischen Region.* — Es ist bekannt, daß galacto-konfigurierte Pyranosen ausschließlich in der  $^4\text{C}_1(\text{D})$ -Sesselkonformation vorliegen. Auch in den Glycopeptiden **1–8** nimmt die 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactopyranose diese Konformation ein. Über die Karplus-Beziehung läßt sich leicht nachweisen, daß die  $^3J_{\text{H},\text{H}}$ -Kopplungen genau das Muster zeigen, das für Torsionswinkel im Galactopyranosyrring erwartet wird (Tab. I). 1D-n.O.e.- und ROESY-Messungen (Tab. IV und V) zeigen außerdem n.O.e.-Effekte zwischen H-3 und H-5, die typisch für eine  $^4\text{C}_1(\text{D})$ -Konformation sind.

Chemische Verschiebung und die  $^3J_{1,2}$ -Kopplungskonstante von GalNAc-H-1 sind charakteristisch für eine  $\alpha$ -D-glycosidische Bindung. Ein Nachweis für  $\alpha$ -D-glycosidische Verknüpfungen ist auch die chemische Verschiebung der Threonin $^{\gamma}$ -Kohlenstoffatome der glycosidisch gebundenen Threonin-Einheit. Aufgrund der Nähe zum Ringsauerstoffatom erfährt das Thr $^{\gamma}$ -C-Atom bei  $\alpha$ -D-glycosidischer Bindung einen stärkeren Tieffeldshift als in  $\beta$ -D-gebundenen Glycosiden. Die gefundenen Verschiebungen des Thr $^{\gamma}$ -C-Atoms von durchschnittlich 18.4 p.p.m. stimmen in etwa mit dem erwarteten Wert für  $\alpha$ -D-glycosidische Bindungen überein<sup>2</sup>.

Für die  $\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe sind drei gestaffelte Konformationen möglich, die durch Diederwinkel  $\omega$  von  $+60^\circ$ ,  $-60^\circ$  und  $180^\circ$  beschrieben werden. Berechnungen der Rotamer-Populationen aus den Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{H},\text{H}}$  zeigen, daß kein Konformeres bevorzugt vorliegt<sup>25</sup>. Die durchschnittlich höchsten Anteile am Rotamerengleichgewicht hat das *gt*-Konformere.

Die Stellung der NH-Bindung der *N*-Acetylgruppe relativ zu H-2 ist *trans*. Dies wird durch eine große Kopplungskonstante  $^3J_{\text{AcNH},\text{H}-2}$  und n.O.e.-Effekte des NH-Protons zu den H-1- und H-3-Protonen belegt. Die bevorzugte *trans*-Stellung der Amidbindung belegen starke n.O.e.-Effekte zwischen dem Acetyl-NH-Proton und der Acetyl-CH<sub>3</sub>-Gruppe.

Die Konformation der glycosidischen Bindung wird durch die Diederwinkel  $\phi$ -GalNAc,  $\psi$ -GalNAc und  $\chi$ -Thr beschrieben (Schema 1). Die Größe des  $\phi$ -GalNAc-Winkels wird hauptsächlich durch den *exo*-anomeren Effekt<sup>26</sup> bestimmt, der eine *gauche*-Anordnung der O-Thr $^{\beta}$ -C-Bindung zur GalNAc-C-1-O-5-Bindung bevorzugt. Der typische Bereich für  $\phi$ -Winkel von D-Galactopyranosen liegt um  $-60^\circ$ . Die anderen Winkel  $\psi$ -GalNAc und  $\chi$ -Thr sind nur durch sterische Effekte eingeschränkt.

In allen Glycopeptiden werden starke n.O.e.-Effekte zwischen Thr $^{\beta}$ -H und GalNAc-H-1 beobachtet. Diese Effekte sind, mit Ausnahme von **1**, von gleicher Größe wie der n.O.e.-Effekt von GalNAc-H-1 zu H-2, so daß GalNAc-H-1 und Thr $^{\beta}$ -H sehr dicht benachbart sein sollten. Da der  $\phi$ -GalNAc-Winkel durch den *exo*-anomeren Effekt weitgehend festgelegt ist, wird der  $\psi$ -GalNAc-Winkel damit auf einen Bereich von  $-20^\circ \leq \psi < 90^\circ$  beschränkt. Die  $^3J_{\text{Thr}^{\alpha}\text{-H},\text{Thr}^{\beta}\text{-H}}$ -Kopplungskonstante, die den Thr- $\chi$ -Winkel charakterisiert, liegt für alle Verbindungen um 2.5 Hz, was eine *gauche*-Stellung

TABELLE IV

Ergebnisse der eindimensionalen *n.O.e.* und zweidimensionalen ROESY-Messungen<sup>a</sup> der Verbindungen 1-9<sup>c</sup>

<i>n.O.e.</i> und <i>R.o.e.</i> Komplexitäten	Verbindung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
GalNAc-H-1 GalNAc-H-2	9.2	11.6	4.9	3.6	-8.2	-9.6	-1.8	s	6.4	s
GalNAc-H-1-Th <sup>d</sup> - $\alpha$			w	s	-1.6	-2.8		s	1.2	s
GalNAc-H-1-Th <sup>d</sup> - $\beta$	10.9	10.6	5.7	3.6	-7.9	-9.0	-1.0	s	-4.8	s
GalNAc-H-5-GalNAc-H-3	4.3	4.5	1.4		-7.7					
GalNAc-H-5-GalNAc-H-6	5.5	5.4	2.9	2.9	-3.8					
GalNAc-H-5-GalNAc-H-6	5.5	5.4	2.9	2.9	-1.7					
GalNAc-H-5-Th <sup>d</sup> - $\gamma$	4.8	3.7	2.7	m	1.9	1.7	-1.6	m	m	
GalNAc-NH-GalNAc-CH <sub>3</sub>			s	s	1.2	s		s	s	
GalNAc-NH GalNAc-H-1			w	m				m	m	
GalNAc-NH GalNAc-H-2			w	s	-9.6			w	w	
GalNAc-NH-GalNAc-H-3			s	-1.8	w	-3.0		w	w	
GalNAc-CH <sub>3</sub> -Ser <sup>d</sup> - $\gamma$							-1.2	m		
Ala <sup>d</sup> -NH <sub>2</sub> Ala <sup>d</sup> - $\beta$	3.5									
Ala <sup>d</sup> -NH <sub>2</sub> Thr <sup>d</sup> - $\alpha$	5.2									
Ala <sup>d</sup> - $\alpha$ Ala <sup>d</sup> - $\beta$	3.8	5.4	0.8	m	-1.5	s	1.0	s	s	3.2
Ala <sup>d</sup> - $\alpha$ Pro <sup>d</sup> - $\delta$					-3.8	w		w	w	2.5
Ala <sup>d</sup> - $\alpha$ Pro <sup>d</sup> - $\delta'$					-3.8		-0.4	w	w	1.2
Ala <sup>d</sup> - $\beta$ Pro <sup>d</sup> - $\delta$								w	w	2.3
Ala <sup>d</sup> - $\beta$ Pro <sup>d</sup> - $\delta'$					2.3	-3.9	w	w	w	
Pro <sup>d</sup> - $\alpha$ -Pro <sup>d</sup> - $\beta$	4.8	m	3.8	s						6.6
Pro <sup>d</sup> - $\alpha$ -Pro <sup>d</sup> - $\beta'$	4.1	w	1.9	s		-3.0	2.8	m	3.2	m
Pro <sup>d</sup> - $\beta$ -Pro <sup>d</sup> - $\beta'$	9.6	w	8.4	m	-7.7	-7.7	-2.9	m	9.9	m
Pro <sup>d</sup> - $\beta$ -Pro <sup>d</sup> - $\delta$					-6.6	-6.6	-2.4	m	7.6	w

<sup>a</sup> Die ROESY-Kreuzsignale werden in Tab. IV mit der Abkürzung R. bezeichnet. <sup>b</sup> 1D-n.O.e.-Aufnahmen in D<sub>2</sub>O-Lösungen; NH-n.O.e.-Aufnahmen in D<sub>2</sub>O-Lösungen; NH-n.O.e.-Aufnahmen in Prozent der Einstrahlintensität angegeben. ROESY-Aufnahmen in Me<sub>2</sub>SO-Lösungen; 250 MHz; H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O-Lösungen; 400 MHz; 300 K; die n.O.e.-Werte werden in Prozent der Einstrahlintensität angegeben. ROESY-Aufnahmen in Me<sub>2</sub>SO-Lösungen; 250 MHz; 300 K; die Einfettung der R.O.e.-Kreuzsignale erfolgt nach starken (s) mittleren (m) und schwachen (w) Effekten <sup>c</sup> Aufnahmen bei 270 MHz

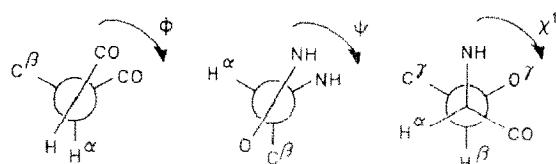
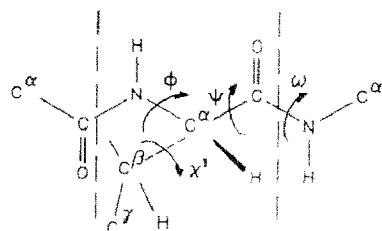
TABELLE V

Weitere Ergebnisse der 1D-n.O.e.- und 2D-ROESY-Messungen<sup>a</sup> der Verbindung 8<sup>b</sup>

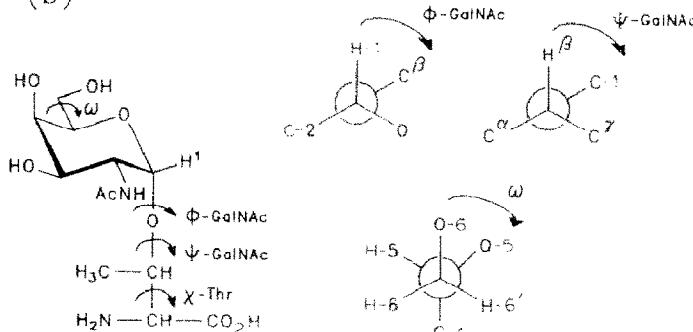
<i>n.O.e.</i> und <i>R.o.e.</i> - Konnektivitäten	<i>n.O.e.</i>	<i>R.o.e.</i>	<i>n.O.e.</i> und <i>R.o.e.</i> - Konnektivitäten	<i>n.O.e.</i>	<i>R.o.e.</i>
Thr <sup>1</sup> -NH-Thr <sup>2</sup> - $\alpha$	w		Lys <sup>3</sup> - $\alpha$ Lys <sup>4</sup> - $\beta$	2.8	
Thr <sup>1</sup> -NH-Thr <sup>2</sup> - $\gamma$	w		Lys <sup>3</sup> - $\alpha$ Lys <sup>4</sup> - $\beta$	3.6	
Thr <sup>1</sup> -NH-Ser <sup>2</sup> - $\alpha$	s		Lys <sup>3</sup> - $\alpha$ -Lys <sup>4</sup> - $\gamma$	1.1	
Thr <sup>1</sup> - $\alpha$ -Thr <sup>2</sup> - $\gamma$	-1.0	s	Lys <sup>3</sup> - $\gamma$ -Lys <sup>4</sup> - $\alpha$	2.1	
Thr <sup>1</sup> - $\beta$ -Thr <sup>2</sup> - $\gamma$	-1.4	s	Lys <sup>3</sup> - $\delta$ -Lys <sup>4</sup> - $\alpha$	3.7	
Lys <sup>3</sup> -NH-Thr <sup>2</sup> - $\alpha$	m		Thr <sup>5</sup> -NH-Thr <sup>6</sup> - $\alpha$	m	
Lys <sup>3</sup> - $\gamma$ -Lys <sup>4</sup> - $\alpha$	2.1		Thr <sup>5</sup> -NH-Thr <sup>6</sup> - $\gamma$	w	
Lys <sup>3</sup> - $\delta$ -Lys <sup>4</sup> - $\alpha$	3.7		Thr <sup>5</sup> -NH-Lys <sup>6</sup> - $\alpha$	s	
Lys <sup>3</sup> -NH-Lys <sup>4</sup> - $\alpha$	m		Thr <sup>5</sup> - $\alpha$ -Thr <sup>6</sup> - $\gamma$	1.3	s
Lys <sup>3</sup> -NH-Thr <sup>6</sup> -NH	w		Thr <sup>5</sup> - $\beta$ -Thr <sup>6</sup> - $\gamma$	1.7	s

<sup>a</sup> Die ROESY-Kreuzsignale werden mit der Abkürzung R.o.e. bezeichnet. <sup>b</sup> Es werden die gleichen Bezeichnungen benutzt wie in Tabelle IV.

(a)



(b)

Schema 1. Definition der Diederwinkel  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi$  und  $\omega$  in Peptiden (a) und Glycopeptiden (b).

der beiden Protonen bedeutet. Gleichzeitig werden n.O.e.-Effekte von  $\text{Thr}^{\gamma}\text{-H}$  zu  $\text{Thr}^{\alpha}\text{-H}$  und  $\text{Thr}^{\beta}\text{-H}$  in vergleichbarer Größe beobachtet, so daß nach den Experimenten nur eine der beiden *gauche*-Stellungen möglich ist. Der  $\chi$ -Thr-Winkel liegt demnach bei  $\sim 60^\circ$ . Ein schwacher n.O.e.-Effekt zwischen  $\text{Thr-NH}$  und  $\text{Thr}^{\gamma}\text{-H}$  bestätigt diese bevorzugte Konformation.

Sehr interessant ist ein weiterer n.O.e.-Effekt von  $\text{Thr}^{\gamma}\text{-H}$  zu einem Proton der 2-Acetamid-2-desoxy-D-galactose-Einheit, dem GalNAc-H-5. Er wird gleichfalls für alle Glycopeptide beobachtet und ist genauso groß wie die beiden n.O.e.-Effekte von  $\text{Thr}^{\gamma}\text{-H}$  zu  $\text{Thr}^{\alpha}\text{-H}$  und  $\text{Thr}^{\beta}\text{-H}$ . Nach Auswertung aller n.O.e.-Effekte und der  $^3J_{\text{Thr}^{\alpha}\text{-H}, \text{Thr}^{\beta}\text{-H}}$ -Kopplungskonstanten ergibt sich ein geschlossenes Bild für die Konformation an der glycosidischen Bindung, die für alle Glycopeptide einheitlich ist (vergleiche Abb. 1). Frühere Konformationsuntersuchungen von Bush *et al.*<sup>6,7</sup> an Gefrierschutzproteinen und von Pavia und Ferrari<sup>28</sup> an synthetischen *O*-Glycopeptiden aus der Sequenz des Glycophorin A sowie anderer Autoren<sup>29,30</sup>, zeigen im wesentlichen die gleichen Kopplungskonstanten und n.O.e.-Effekte in der 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose- und Threonin-Einheit.

Die bevorzugte Konformation an der glycosidischen Bindung kann durch das Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen werden. In Veröffentlichungen von Maeji *et al.*<sup>29</sup> wird die Rolle der *N*-Acetyl-Funktion in der glycosidischen Bindung am Beispiel von im Saccharidteil und Peptidteil voll geschützten Glycopeptiden diskutiert. In Verbindungen vom Typ Z-Thr(AcGalNAc)-Ala-OMe finden die Autoren starke Hinweise für eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem  $\text{Thr-NH}$ -Proton und der *N*-Acetyl-Carbonylgruppe der Zucker-Einheit. Die Ergebnisse von Maeji *et al.*<sup>29</sup> können für die entblockierten Glycopeptide vom Interleukin-2 Typ 3-8 nicht bestätigt werden. Die Temperaturkoeffizienten der  $\text{Thr-NH}$ -Protonen zeigen zwar starke H-Bindungen für alle diese Verbindungen (Tab. VI). Modellbetrachtungen machen jedoch deutlich, daß nicht die *N*-Acetyl-Carbonylgruppe der Akzeptor sein kann, sondern wahrscheinlich eine Brückenbindung zum glycosidischen Sauerstoffa-

TABELLE VI

Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen  $d\delta/dT$  [ $10^{-3}$  p.p.m./K] der Verbindungen 1-9<sup>a</sup>

Amidproton	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NHAc-NH	6.2	1.8	4.3	4.5	4.5	4.2	4.4	4.3	
Ala'-NH	3.8								
Thr <sup>3</sup> -NH		2.1	2.3	0.4	-0.1		-0.5	-0.5	1.8
Ser <sup>4</sup> -NH					3.6		2.6	2.6	5.7
Ser <sup>5</sup> -NH						4.5	4.1	3.7	
Ser <sup>6</sup> -NH							3.3	2.8	
Thr <sup>7</sup> -NH								5.1	
Lys <sup>8</sup> -NH								4.1	
Lys <sup>9</sup> -NH								2.7	
Thr <sup>10</sup> -NH								4.4	

<sup>a</sup> Lösung in 9:1 H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O; T 300-330 K; 400.13 MHz.

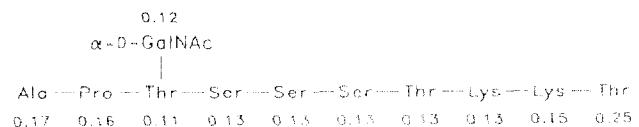


Abb. 1. Mit AMBER berechnete Energieminimum-Konformation von 7 [Plotprogramm SCHAKAL<sup>27</sup>]. Wichtige H-H-Abstände (Å), für die n.O.e.-Effekte gefunden werden, sind eingezeichnet.

tom vorliegt. In den Strukturen **4–8** ist zusätzlich eine H-Bindung zur Alanin-Carbonyleinheit möglich, die die besonders geringen NH-Temperaturverschiebungen dieser Threonin-Einheiten erklärt (vergleiche auch Abb. 1).

In weiteren Veröffentlichungen wird auch die Möglichkeit einer H-Bindung zwischen Acetyl-NH und der Threonin-Carbonylgruppe diskutiert<sup>30</sup>. Das Glycopeptid **2** zeigt als einzige der hier untersuchten Verbindungen diese Wasserstoffbrücke. In den Interleukin-2 analogen Strukturen **3–8** ist das Acetyl-NH weder eindeutig intern gebunden noch extern orientiert. Vermutlich liegen hier sehr lockere oder anteilige H-Bindungen vor. Die deutliche Abnahme der H-Bindungsstärke bei Verbindung **3** im Gegensatz zu **2** wird vermutlich durch den erhöhten sterischen Anspruch der Prolin-Einheit verursacht. Betrachtungen am Modell zeigen, daß für alle diese Verbindungen Wasserstoffbrücken vom Acetyl-NH zur Threonin-Carbonylgruppe möglich sind.

*Konformation des Peptidteils.* — Um das Vorliegen einer einheitlichen Konformation für die Glycopeptide beurteilen zu können, ist es wichtig, das Bewegungsverhalten der Moleküle zu betrachten. Wie die  $^{13}\text{C}$ - $T_1$ -Werte von Tabelle III zeigen, bewegen sich die Glycopeptide **1** und **2** insgesamt isotrop. Hier können relativ starre, bevorzugte Konformationen vorliegen, die vermutlich durch Wasserstoffbrücken fixiert sind. Die Verbindungen **3** und **4** zeigen keine so einheitliche Beweglichkeit. Hier ist der Peptidteil schon beweglicher als die Saccharideinheit. Für Verbindung **3** zeigen die  $NT_1$ -Werte, daß sich die endständige Prolin-Einheit viel schneller bewegt als das restliche Molekül.

Das Bewegungsverhalten der größeren Strukturen entspricht den Erwartungen. Die terminalen Aminosäure-Einheiten besitzen größere  $NT_1$ -Werte und damit eine höhere Mobilität. Die zentralen Aminosäure-Einheiten und die 2-Amino-2-desoxy- $\beta$ -galactose-Einheit weisen eine vergleichsweise geringe Beweglichkeit auf. In Schema 2 sind die Gerüst- $NT_1$ -Werte für **8** gezeigt. Noch beweglicher als das Glycopeptidgerüst sind die Peptid-Seitenketten. Deren Beweglichkeiten werden durch sterische Ansprüche eingeschränkt, aber auch durch die Möglichkeit intra- und intermolekularer Wechselwirkungen polarer Gruppen in den Seitenketten.

Die  $^{13}\text{C}$ - $T_1$ -Werte der Lysin-Einheiten von **8** zeigen deutlich die hohe Flexibilität dieser Seitenketten (Tab. III). Weitere Charakterisierungen können hier nicht getroffen werden, da nur n.O.e.-Effekte zwischen benachbarten  $\text{CH}_2$ -Gruppen gefunden werden. Es sind keine n.O.e.-Effekte zu beobachten, die auf eine Rückfaltung der Lysin-Seitengruppen zum Peptidgerüst schließen lassen. Die Threonin- und Serin-Seitengruppen zeigen ein anderes Verhalten. Deren Beweglichkeit ist nicht größer als die des Peptidgerüsts; in einigen Serin-Einheiten haben im Gegenteil die  $\beta$ -Kohlenstoffatome

geringere  $NT_1$ -Werte als die  $C^\alpha$ -Atome. Vermutlich sind die Hydroxylgruppen in Wasserstoffbindungen eingebunden und fixieren so eine bevorzugte Konformation.

Die  $^1H$ -chemischen Verschiebungen der  $Ser^\beta$ -Protonen zeigen, daß diese magnetisch nicht equivalent sind. Aus den  $^3J_{H^\alpha, H^\beta}$ -Kopplungskonstanten lassen sich nach Pachler<sup>31</sup> Rotamerpopulationen für den Diederwinkel  $\chi$  der Seitenketten berechnen. Sie ergeben für alle Serin-Einheiten der Verbindungen **5–9** eine bevorzugte Konformation bei einem  $\chi$ -Winkel von  $60^\circ$ . Die Anteile an der  $60^\circ$ -Population liegen<sup>25</sup> zwischen 56 und 85%. Diese Anordnung ist typisch für hydrophile Seitenketten, die Lösungsmittelwechselwirkungen eingehen können<sup>32</sup>. Intramolekulare Wasserstoffbindungen der Hydroxylgruppen zu den Carbonylgruppen der Peptidbindungen sind ebenfalls möglich. Für Wechselwirkungen mit NH-Funktionen finden sich bei den Temperaturmessungen keinerlei Hinweise (Tab. VI). Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, existieren für die glycosidierten Threonin-Einheiten bevorzugte Konformationen mit einem  $\chi$ -Winkel von  $\sim 60^\circ$ . Die gleichen n.O.e.-Effekte und Kopplungskonstanten werden für die nicht glycosidierten Threonin-Einheiten in **8** gefunden. Somit zeigen alle Seitengruppen mit Hydroxylfunktionen bevorzugte Konformationen, die in einem  $\chi$ -Winkelbereich von  $\sim 60^\circ$  liegen.

Die Alanin-Methylgruppen in **1–9** sind nach den Werten von Tabelle III nicht frei beweglich. Für eine ungehinderte Methylrotation ergeben Berechnungen<sup>33</sup> ein  $T_1(CH_3)$ :  $T_1(CH)$ -Verhältnis von 3:1. In den Glycopeptiden **1** und **2**, in denen Alanin direkt (N- oder C-terminal) an die glycosidierte Threonin-Einheit gebunden vorliegt, beträgt das Verhältnis z.B. nur 1.4 bzw. 1.8. In allen anderen Strukturen liegt diese Zahl über 2.0, so daß die Alanin- $CH_3$ -Gruppe, wenn sie durch eine Prolin-Einheit von der glycosidisch verknüpften Threonin-Einheit getrennt ist, auch freier beweglich ist.

Die Aminosäure Prolin unterscheidet sich in mancher Hinsicht von den übrigen natürlichen Aminosäuren. Es ist das einzige cyklische Molekül, wodurch die Rotationsmöglichkeiten um den Peptidwinkel  $\phi$  stark eingeschränkt sind. Unterschiedliche  $\Phi$ -Winkel geben nur die "puckered"-Möglichkeiten des Pyrrolidinrings wieder.

Da die Seitenkette des Prolinmoleküls nicht flexibel ist, übt das Prolinmolekül besondere sterische Effekte auf benachbarte Aminosäure-Einheiten aus. Beispielsweise absorbiert das  $C^\alpha$ -Atom einer Aminosäure-Einheit, die an das Stickstoffatom von einer Prolin-Einheit gebunden ist, um etwa 1 p.p.m. bei höherem Feld als in anderen Peptiden<sup>34</sup>. Die Verschiebungsdifferenz wird durch einen sterischen  $\gamma$ -Effekt hervorgerufen, der charakteristisch für dieses cyklische Aminosäure-Molekül ist. Die Hochfeld-verschiebung läßt sich auch nachweisen beim Vergleich der  $^{13}C$ - $\delta$ -Werte von **2**, wo eine Alanin-Einheit N-terminal an eine Threonin-Einheit gebunden ist, mit den Werten von **4–9**, in denen die Alanin-Einheit auch N-terminal, aber an eine Prolin-Einheit gebunden vorliegt. Die chemische Verschiebung von  $Ala^\alpha-C$  in **2** liegt bei  $\delta$  49.7, in den übrigen Verbindungen dagegen bei ungefähr  $\delta$  48.5. Das Peptid **9** zeigt dabei die gleiche Verschiebung wie die Glycopeptide; der Prolin-Effekt ist also nicht von der Glycosylierung der benachbarten Threonin-Einheit abhängig. Der gleiche  $\gamma$ -Effekt ist auch für die  $Ala^\beta$ -Kohlenstoffatome zu beobachten.

Der Pyrrolidin-Ring des Prolin-Moleküls ist relativ flexibel; dies zeigen Röntgenstrukturuntersuchungen, wo im Kristall C<sup>2</sup>-*endo*- und C<sup>2</sup>-*exo*-Konformationen nebeneinander in einer Elementarzelle vorliegen<sup>35</sup>. Die hohe Beweglichkeit in Lösung kommt durch die <sup>13</sup>C-T<sub>1</sub>-Daten zum Ausdruck. Die NT<sub>1</sub>-Werte der C<sup>2</sup>- und C<sup>5</sup>-Atome der Prolin-Einheit spiegeln die Gesamtbeweglichkeit des Moleküls wieder, während die NT<sub>1</sub>-Werte der C<sup>6</sup>- und C<sup>7</sup>-Atome die schnellen konformationellen Umwandlungen wiedergeben. Dabei erfährt das C<sup>2</sup>-Atom die stärksten Positionsänderungen, so daß der Pyrrolidin-Ring offensichtlich schnelle Wechsel zwischen der C<sup>2</sup>-*endo*- und C<sup>2</sup>-*exo*-Konformation eingeht.

In Peptidbindungen vom Typ L-Xxx-L-Pro treten gewöhnlich *cis*-*trans*-Isomeren auf, in denen das *cis*-Isomere ungleich häufiger vorliegt als in allen anderen Peptidbindungen. Ausführliche <sup>13</sup>C-n.m.r. Studien<sup>36,37</sup> an Prolin-enthaltenden Peptiden führen zu einer direkten Korrelation der *cis*- und *trans*-Isomeren mit der chemischen Verschiebung der Pro<sup>2</sup>-C-Atome; in *trans*-X-Pro ist  $\delta$   $25.0 \pm 1.0$  und in *cis*-X-Pro ist  $\delta$   $22.4 \pm 0.8$  für Pro<sup>2</sup>-C.

Ein Vergleich mit den chemischen Verschiebungen von Tabelle II zeigt, daß in allen Strukturen 4-9 *trans* L-Xxx-L-Pro-Peptidbindungen vorliegen. Ähnliches kann für das Pro<sup>2</sup>-C-Atom abgeleitet werden<sup>36</sup>. Die Differenz zwischen den C<sup>2</sup>- und C<sup>7</sup>-chemischen Verschiebungen von Prolin ist gleichfalls charakteristisch für das Isomer an der L-Xxx-L-Pro-Peptidbindung. Für die *trans*-Bindung liegt die Differenz  $\delta(C^2) - \delta(C^7)$  zwischen 1.3 und 6.0 p.p.m., für die *cis*-Peptidbindung dagegen zwischen 8.3 und 10.0 p.p.m. Die Differenzen für  $\delta(C^2) - \delta(C^7)$  der Verbindungen 4-9 befinden sich wiederum in dem Bereich, der für die *trans*-Peptidbindung charakteristisch ist.

Weitere Hinweise auf die Peptidgerüstkonformation liefern die Temperaturkoeffizienten der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen (Tab. VI). Nur für die Thr<sup>3</sup>-NH-Protonen werden starke H-Bindungen detektiert, die wie oben diskutiert, die bevorzugte Konformation der glycosidischen Region stabilisieren. Die auffallend kleinen NT<sub>1</sub>-Werte der glycosidisch gebundenen Threonin-Einheiten ergänzen dieses Bild. Weitere Wasserstoffbrücken liegen für die Serin<sup>4</sup>-Einheit in 7 und die Serin<sup>6</sup>- und Lysin<sup>9</sup>-Einheiten in 8 vor. Die übrigen Peptidprotonen zeigen Koeffizienten, die zwischen den Grenzwerten für eine interne beziehungsweise externe Orientierung liegen. Diese Protonen sind gegenüber dem Lösungsmittel abgeschirmt, liegen aber nur zu einem gewissen Prozentsatz intramolekular gebunden vor.

1D-n.O.e.-Messungen und ROESY-Experimente (Tab. IV und V) zeigen entlang des Peptidgerüsts für alle Verbindungen sehr einheitliche n.O.e.-Effekte. Alle NH<sup>1+1</sup>-Protonen geben über die Peptidbindungen hinweg mit den jeweiligen C<sup>2</sup>-H-Protonen starke n.O.e.-Effekte. Außerdem sind n.O.e.-Effekte innerhalb der Aminosäure-Einheiten zwischen den NH<sup>1</sup>- und C<sup>2</sup>H<sup>1</sup>-Protonen zu sehen, die jedoch durchweg schwächer sind als die sequenziellen n.O.e.-Effekte über die Peptidbindungen. Da Prolin kein NH-Proton besitzt, ist es üblich, die Prolin<sup>2</sup>-H-Atome als NH-Analoga zu betrachten und entsprechende Signale wie NH<sup>1+1</sup>-C<sup>2</sup>H<sup>1</sup>-Effekte zu bewerten. d<sub>xx</sub>-Konnektivitäten zwischen NH-Protonen benachbarter Aminosäureeinheiten werden, mit Ausnahme

eines n.O.e.-Effektes in **8**, der später diskutiert wird, in den hier untersuchten Verbindungen nicht beobachtet.

Starke  $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ -n.O.e.-Effekte, wie sie hier auftreten, bei gleichzeitiger Abwesenheit von  $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ -Konnektivitäten weisen darauf hin, daß die Gerüstdiederwinkel bevorzugt in der  $\beta$ -Region des  $\phi,\psi$ -Diagramms liegen, was einer gestreckten Konformation entspricht<sup>38</sup>. Die  $\phi$ -Diederwinkel der Peptidgerüste liegen demnach in einem Winkelbereich von  $-60$  bis  $-180^\circ$ , die  $\psi$ -Winkel entsprechend im positiven Bereich von  $60$  bis  $180^\circ$ . Eine ideale gestreckte Konformation besitzt  $\phi/\psi$ -Winkel von  $-120/120^\circ$ . Eine genauere Eingrenzung der  $\psi$ -Diederwinkel ergibt sich nur für die N-terminale Alanin-Einheit. Hier werden n.O.e.-Effekte zwischen den Alanin- $\alpha,\beta$ -Protonen und den Prolin- $\delta$ -Protonen gefunden, die den  $\psi$ -Alanin-Winkel auf  $\sim 170^\circ$  festlegen.

Anhand der  $^3J_{\text{NH,C}^2\text{H}}$ -Kopplungskonstanten können jedoch die  $\phi$ -Diederwinkel genauer bestimmt werden. Sehr große Werte um  $9$  Hz bedeuten eine fast ideale *trans*-Orientierung der beiden Protonen mit einem  $\phi$ -Winkel von  $\sim -120^\circ$ . Dies trifft für die Threonin-Einheiten in **2**, **3** und **4** zu. Etwas kleinere Kopplungskonstanten von  $8.2$ – $8.6$  Hz, wie sie in den Threonin-Einheiten von **5**, **7** und **8** auftreten, zeigen eine geringfügige Abweichung von der *trans*-Stellung an. Nach der Karplus-Kurve<sup>20</sup> ergeben sich mögliche  $\phi$ -Winkel im Bereich von  $-90$  oder  $-140^\circ$ . In den meisten Verbindungen läßt sich nun für die Threonin-Einheiten ein n.O.e.-Effekt zwischen Thr-NH und Thr $^2$ -H detektieren. Dadurch wird die  $\phi$ -Winkelstellung um  $-90^\circ$  gegenüber der  $-140^\circ$  Anordnung bevorzugt.

Alle übrigen Aminosäureeinheiten besitzen NH, C $^2$ H-Kopplungskonstanten von  $6.3$ – $7.6$  Hz. Mögliche  $\phi$ -Diederwinkel liegen hier um  $-80$  oder  $-150^\circ$ . Eine eindeutige Aussage darüber, welche der möglichen Anordnungen vorliegt, läßt sich nicht immer treffen. Für viele Aminosäureeinheiten werden jedoch zusätzliche n.O.e.-Effekte gefunden, die den  $\phi$ -Winkel um  $-80^\circ$  bevorzugen. Die Alanin-Einheit von **1** z.B. zeigt einen n.O.e.-Effekt zwischen dem NH-Proton und der CH $_3$ -Gruppe. Ein sehr interessanter n.O.e.-Effekt zwischen der Methylgruppe der *N*-Acetylgruppe der 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Einheit und dem H $^a$  der Serin $^4$ -Einheit, der sich für alle Verbindungen beobachten läßt, bevorzugt  $\phi$ -Winkel für diese Aminosäure, die um  $-80^\circ$  liegen (vergleiche Abb. 1).

Für Kopplungen von  $\sim 7.0$  Hz und kleiner sind nach der Karplus-Kurve auch Werte um  $\phi 60^\circ$  möglich, die einer lokalen  $\alpha_l$ -Helixstruktur entsprechen. Obwohl positive  $\phi$ -Winkel in natürlich vorkommenden Peptiden und Proteinen nur in Ausnahmefällen gefunden werden, der übliche Winkelbereich für  $\phi$  reicht von  $-30$  bis  $-180^\circ$ , sollten sie hier mit diskutiert werden. Gerade bei hochflexiblen, endständigen Aminosäure-Einheiten, wie z.B. Serin $^4$  in **5** und Serin $^6$  in **7**, können auch ungewöhnliche Konformationen am  $\phi$ -Gleichgewicht beteiligt sein.

Wie oben erwähnt, tritt ein n.O.e.-Effekt zwischen NH-Protonen der Lys $^9$ - und Thr $^{10}$ -Einheit in **8** auf (Tabelle V). Der Effekt ist ein Hinweis auf die Beteiligung einer lokalen Konformation am C-Terminus, die im  $\phi/\psi$ -Winkelbereich der  $\alpha_l$ -Helix liegt<sup>38</sup>. Dies kann als der Beginn der Formung einer  $\alpha_l$ -Helixstruktur im Peptidteil gedeutet

werden, da das Glycopeptid **8** mit 10 Aminosäuren in eine Größenordnung kommt, in der reguläre Sekundärstrukturen möglich sind. Der Effekt ist jedoch singulär und sehr schwach, so daß ein Konformerengleichgewicht am C-Terminus wahrscheinlicher ist. Dafür sprechen auch die hohen  $^{13}\text{C}$ - $T_1$ -Werte der Threonin $^{13}\text{C}$ -Einheit.

**Glycosylierungseffekte.** Zusätzlich zum Glycopeptid **5** steht das analoge nicht glycosyierte Tetrapeptid **9** zur Verfügung, so daß mögliche Glycosylierungseffekte untersucht werden können. Einen ersten Hinweis auf eine erfolgte Glycosylierung geben die  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen. Für Thr $^2$ -C wird eine große Tieffeldverschiebung um 8.5 p.p.m. beobachtet. Das Thr $^2$ -C-Signal erfährt eine kleine Hochfeldverschiebung um  $\sim$  1.6 p.p.m., die auch für Thr $^3$ -C ( $\sim$  1.3 p.p.m.) beobachtet wird. Ansonsten sind nur die Pro $^2$ -C- und Serin-C-Atome geringfügig betroffen. Dies sind genau die Effekte, die auch in anderen Studien angegeben werden<sup>31,32</sup>. Die Gesamtbeweglichkeit des Tetrapeptids **9** ist wie erwartet größer als die des Glycopeptids **5**. Die höchste Beweglichkeit hat auch hier die C-terminale Serin-Einheit (vergl. hierzu  $^{13}\text{C}$ - $T_1$ -Werte Tabelle III).

Temperaturmessungen zeigen, daß bei **9** das Threonin $^2$ -Amidproton als einziges wie in **5** in eine Wasserstoffbrücke eingebunden ist ( $d\delta/dT = 1.8 \times 10^{-3}$  p.p.m./K). Die Wasserstoffbrückenbindung ist jedoch schwächer als in **5**. Vermutlich wird das Thr $^2$ -NH-Proton durch die Anknüpfung der 2-Acetamid-2-desoxy-D-galactose-Einheit stärker gegenüber dem Lösungsmittel abgeschirmt. Dasselbe trifft für die Serin-Einheit zu, deren NH-Temperaturkoeffizient gleichfalls im Peptid **9** deutlich größer ist als im Glycopeptid **5**.

N.O.e.-Messungen zeigen die gleichen Effekte im Peptid **9** wie in der glycosylierten Verbindung **5**. Die Kopplungskonstanten der Amidprotonen  $^3J_{\text{NH},\text{C}^2\text{H}}$  der Thr $^2$ - und Ser $^4$ -Einheiten sind in **9** etwas kleiner als im Glycopeptid **5**. Das hat jedoch kaum einen Effekt auf die daraus abgeleiteten  $\phi$ -Winkel, da die Karplus-Kurve in diesem Bereich sehr steil verläuft. Die  $^3J_{\text{C}^2\text{H},\text{C}^2\text{H}}$ -Kopplungskonstante Thr $^2$  von **9** die die Konformation der Seitenkette bestimmt, ist mit 4.0 Hz deutlich größer als die von **5** und den anderen glycosylierten Threonin-Einheiten. Dort beträgt der Durchschnittswert für  $^3J_{\text{C}^2\text{H},\text{C}^2\text{H}}$  2.4 Hz. Dies bedeutet entweder, daß der Thr- $\gamma$ -Winkel um  $\sim$  30° verdreht ist oder die anderen gestaffelten Konformeren anteilig populiert sind. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten kann mit der n.m.r.-Spektroskopie nicht getroffen werden.

Der Vergleich der n.m.r.-Daten von **9** mit denen von **5** ergibt also, abgesehen von der leicht veränderten Seitenkettenkonformation von Thr $^2$  und einer erhöhten Flexibilität von Ser $^4$ , was sich beides durch einen sterischen Effekt der 2-Acetamid-2-desoxy-D-galactose-Einheit erklären läßt, keine entscheidende Konformationsänderung bei der Glycosylierung der Threonin-Einheit im Tetrapeptid L-Ala-L-Pro-L-Thr-L-Ser (**9**).

**Konformationsberechnungen mit dem Programm AMBER.** Es wurden ferner Energieminimierungsberechnungen der Konformationen der Moleküle **1**–**9** durchgeführt, um diese Ergebnisse mit den experimentellen n.m.r.-Daten zu vergleichen. Nach Proberechnungen wählten wir hierzu das Kraftfeld-Programm AMBER. Einleitend wird hier das Ergebnis der AMBER-Berechnung der Modellverbindung z-D-

TABELLE VII

Diederwinkel der *O*-glycosidischen Bindungen in  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr (**10**) und  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr (**11**)<sup>a</sup>. Erläuterungen zu A, B, C und D finden sich im Text

Diederwinkel	A <sup>a</sup>	B	C	D
$\phi$ -GalNAc	-35	-40	-35	-45
$\psi$ -GalNAc	3	30	6	7
$\chi$ -Thr	80	40	50	50

<sup>a</sup> A: Röntgenstrukturanalyse von **11**<sup>41</sup>. Die  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel entsprechen einer  $\alpha$ -D-*manno*-glycosidischen Bindung. B: Empirische Kraftfeldberechnungen von AcN-L-Ala-[ $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)]-L-Thr-L-Ala-CONMe<sup>7</sup>. C: Semiempirische Berechnungen von  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr-L-Ala mit dem Programm PCILO<sup>42</sup>. D: Minimum-Konformation der AMBER-Berechnung von **10**.

GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr (**10**) vorgestellt und mit bisher an verschiedenen Threonin-haltigen Glycopeptid-Strukturen durchgeführten Untersuchungen und Berechnungen verglichen (Tab. VII). Unter A sind die Ergebnisse einer Röntgenstrukturanalyse der Verbindung  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr (**11**) angegeben<sup>41</sup>. Dies ist die einzige bisher bekannte Röntgenstruktur eines *O*-Glycopeptids. Vergleiche der für A erhaltenen H–H-Abstände mit den oben diskutierten n.O.e.-Effekt der glycosidischen Region ergeben interessante Übereinstimmungen. Beispielsweise wird der n.O.e.-Effekt der Thr'-H-Protonen zum H-5 der Kohlenhydrateinheit durch einen kurzen H–H-Abstand in der Röntgenstruktur widergespiegelt<sup>41</sup>. B bezeichnet das Ergebnis empirischer Kraftfeldberechnungen, die Rao und Bush<sup>7</sup> an dem Modelltripeptid AcN-L-Ala-[ $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)]-L-Thr-L-Ala-CONMe durchgeführt haben. Unter C sind Diederwinkel angegeben, die nach semiempirischen Berechnungen mit dem Programm PCILO erhalten worden sind<sup>42</sup>. Als Modellverbindung ist hierbei die Struktur  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr-L-Ala eingesetzt worden. Die Diederwinkel von D geben die Minimum-Konformation der AMBER-Berechnung der Modellstruktur  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr (**10**) wieder. Die Abweichungen am  $\Psi$ -GalNAc-Winkel von B sind sicher auf die Größe der berechneten Struktur zurückzuführen, da die Diederwinkel der hier kalkulierten Interleukin-2 Glycopeptide **3–8** (Tab. VIII) eher mit den Ergebnissen von B vergleichbar sind als mit denen von A, C oder D.

Mit den Verbindungen **1** und **2** liegen einfache Glycopeptid-Strukturen vor, deren Konformationsräume ohne großen Zeitaufwand noch vollständig berechnet werden können. Für beide berechnet AMBER nur je eine Minimumkonformation; alle anderen Konformere haben weit höhere Molekülenergien. Durch die bestimmten unterschiedlichen n.m.r.-Parameter sind die Konformationen von **1** und **2** gut charakterisiert; diese können jetzt durch die Berechnungen voll bestätigt werden. Beispielsweise detektiert das AMBER-Programm für alle starken n.O.e.-Effekte in **1** und **2** H–H-Abstände, die 2.2–2.5 Å betragen. Für den n.O.e.-Effekt zwischen GalNAc-H-5 und Thr'-H in **2** wird eine Entfernung von 2.9 Å berechnet, die einem mittelstarken n.O.e.-Effekt entspricht. Das AMBER-Programm berechnet für das Glycopeptid **2** genau die Wasserstoffbrücken, die auch im N.m.r.-Experiment gefunden werden. Thr-NH bildet eine Brücke

TABELLE VIII

Diederwinkel<sup>a</sup> der glycosidischen Regionen und der Peptidgerüste der mit AMBER berechneten Energieminimum-Konformationen der Strukturen 1-9<sup>b</sup>

Einheit	Verbindung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b
<i>Glycosidische Region</i>										
$\phi$ -GalNAc	-50	-30	-32	-28	-22	-22	-19	-24		
$\psi$ -GalNAc	-15	46	45	49	51	51	51	51		
$\chi$ -Thr	44	53	51	53	56	55	55	55		
<i>Peptidgerüst</i>										
$\phi$ -Ala <sup>1</sup>		-63								
$\psi$ -Ala <sup>1</sup>		169		159	156	157	156	157	161	153
$\phi$ -Pro <sup>2</sup>				-75	-77	-77	-77	-76	-59	-77
$\psi$ -Pro <sup>2</sup>			175	70	63	64	62	64	-41	63
$\phi$ -Thr <sup>3,2</sup>		-75	-72	-86	-79	-81	-80	-78	-69	-77
$\psi$ -Thr <sup>3,1</sup>	168				62	57	64	70	71	69
$\phi$ -Ser <sup>4</sup>				-65	-80	-77	-75	-152	-70	
$\psi$ -Ser <sup>4</sup>					53	49	63			
$\phi$ -Ser <sup>5</sup>					-79	-76	-76			
$\psi$ -Ser <sup>5</sup>						65	69			
$\phi$ -Ser <sup>6</sup>						-61	-70			
$\psi$ -Ser <sup>6</sup>							72			
$\phi$ -Thr <sup>7</sup>							-70			
$\psi$ -Thr <sup>7</sup>								68		
$\phi$ -Lys <sup>8</sup>								-73		
$\psi$ -Lys <sup>8</sup>								69		
$\phi$ -Lys <sup>9</sup>								-73		
$\psi$ -Lys <sup>9</sup>								76		
$\phi$ -Thr <sup>10</sup>								-59		

<sup>a</sup> In Grad.

zum glycosidischen Sauerstoffatom aus, für die die die H-O-Entfernung 2.3 Å beträgt. Das Acetyl-Amidproton der 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Einheit zeigt gleichfalls eine H-bindung. Die Entfernung zur Carbonylgruppe der Alanin-Einheit beträgt nach den Berechnungen 1.9 Å. Für **1** werden keine Wasserstoffbrücken berechnet, was wiederum mit den gemessenen Temperaturkoeffizienten dieser Verbindung übereinstimmt. Eine Übersicht über die mit AMBER berechneten Diederwinkel und wichtigsten H-H-Abstände der Verbindungen **1-9** zeigen die Tabellen VIII und IX.

Die Konformationsberechnung der Verbindung **3** wird genauso umfassend durchgeführt wie für die Verbindungen **1** und **2**. Für die Berechnung der Prolin-Einheit wird eine C-*endo*-Konformation mit den folgenden Winkeln vorgegeben:  $\phi = -71.6$ ,  $\chi^1 = 31.5$ ,  $\chi^2 = -37.7$ ,  $\chi^3 = 29.8$  und  $\chi^4 = -10.5$ . Nach Kalkulation aller sinnvollen  $\phi, \psi$ -Kombinationen der glycosidischen Bindung und des Peptidteils existieren für das Molekül zwei Minimum-Konformationen mit sehr ähnlicher Energie. Die berechneten Diederwinkel für die GalNAc- und Thr-Einheiten liegen in jeweils schmalen Minima vor. Nur für die Orientierung der Prolin-Einheit werden zwei unterschiedliche  $\psi$ -Pro-

TABELLE IX

Intramolekulare Proton-Proton-Abstände<sup>a</sup> der mit AMBER berechneten Energieminimum-Konformationen der Verbindungen 1-9<sup>b</sup>.

Proton-Proton-Abstände	Verbindung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b
GalNAc-H-1-H-2	2.4	2.4	2.4	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3		
GalNAc-H-1-Thr <sup>3</sup> - $\beta$	2.4	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2		
GalNAc-H-5-Thr <sup>3</sup> - $\gamma$	2.4	2.9	2.8	2.7	3.1	3.2	3.3	3.3		
GalNAc-CH <sub>3</sub> -Ser <sup>4</sup> - $\alpha$					3.4	3.1	3.3	3.3		
Ala <sup>1</sup> -NH-Ala <sup>1</sup> - $\beta$		2.5								
Ala <sup>1</sup> -NH-Thr <sup>3</sup> - $\alpha$		2.5								
Ala <sup>1</sup> - $\alpha$ -Pro <sup>2</sup> - $\delta$				2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Ala <sup>1</sup> - $\beta$ -Pro <sup>2</sup> - $\delta'$				2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.1	2.3
Thr <sup>1</sup> -NH-Ala <sup>1</sup> - $\beta$		2.5								
Thr <sup>3</sup> -NH-Pro <sup>2</sup> - $\alpha$				2.5	2.6	2.6	2.5	2.6	3.7	2.6
Thr <sup>3</sup> -NH-Pro <sup>2</sup> - $\gamma$					4.7				2.2	4.6
Thr <sup>3</sup> -NH-Pro <sup>2</sup> - $\delta$					4.5				2.9	4.7
Thr <sup>3</sup> -NH-Thr <sup>3</sup> - $\gamma$		2.3	2.4	2.6	2.4	2.4	2.5	2.5	2.6	2.4
Thr <sup>3</sup> - $\alpha$ -Thr <sup>3</sup> - $\gamma$	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.5
Ser <sup>4</sup> -NH-Thr <sup>3</sup> - $\alpha$					2.5	2.6	2.6	2.5	2.4	2.5
Ser <sup>5</sup> -NH-Ser <sup>4</sup> - $\alpha$						2.6	2.8	2.7		
Ser <sup>6</sup> -NH-Ser <sup>5</sup> - $\alpha$							2.5	2.5		
Thr <sup>7</sup> -NH-Ser <sup>6</sup> - $\alpha$								2.5		
Lys <sup>8</sup> -NH-Thr <sup>7</sup> - $\alpha$								2.5		
Lys <sup>9</sup> -NH-Lys <sup>8</sup> - $\alpha$								2.4		
Thr <sup>10</sup> -NH-Lys <sup>9</sup> - $\alpha$								2.4		

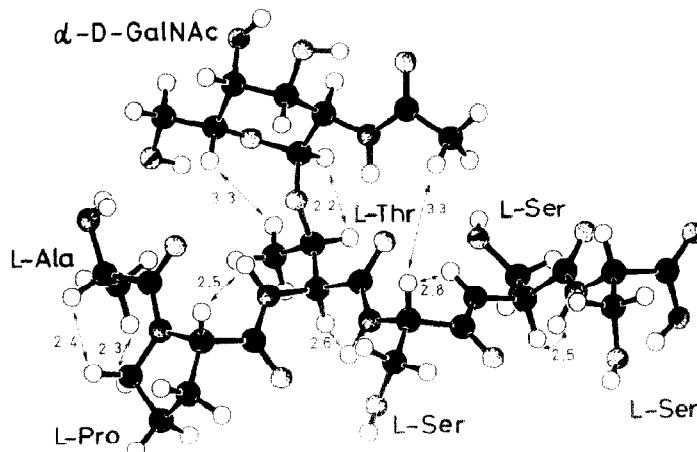
<sup>a</sup> In Angström. <sup>b</sup> Für CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen ist der jeweils kürzeste Abstand angegeben.

Winkel berechnet. Das Hauptminimum liegt bei einer gestreckten Konformation mit  $\psi$ -Pro 175°. Das Nebenminimum liegt um 2 kJ/mol in der Molekülernergie höher und hat einen  $\psi$ -Pro-Winkel von -50°. Diese Konformation liegt in der  $\alpha_R$ -Region des  $\phi, \psi$ -Energie-Diagramms. Der Peptidwinkel  $\psi$ -Pro konnte aufgrund von N.m.r.-Ergebnissen nicht näher bestimmt werden. Die hohe Beweglichkeit der terminalen Prolin-Einheit macht jedoch ein Konformerengleichgewicht um  $\psi$ -Pro, wie es mit dem AMBER-Programm berechnet wird, möglich. Im restlichen Molekülteil werden wieder die oben diskutierten Korrelationen zwischen n.m.r.-spektroskopischen Ergebnissen und AMBER-Kalkulation gefunden. Die gemessene Wasserstoffbrücke für Thr-NH wird in den Berechnungen wiedergefunden. Den n.O.e.-Effekten der glycosidischen Region entsprechen kurze H-H-Abstände der berechneten Konformation von 2.2 Å für die Entfernung d(H-1-Thr<sup>3</sup>-H) und von 2.8 Å für d(H-5-Thr<sup>3</sup>-H). Der berechnete  $\phi$ -Thr-Winkel von -72° entspricht etwa dem aus der  $^3J_{NH, C^2H}$ -Kopplung abgeschätzten Wert von -100°.

Für Verbindung **4**, die mit der Struktur L-Ala-L-Pro-[ $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)]-L-Thr dem vollständigen N-Terminus von Interleukin-2 entspricht, existiert wieder eine bevorzugte Konformation. Alle Diederwinkel befinden sich in einem sehr schmalen Energieminimum, was für eine relativ starre Konformation von **4** spricht. Die Konformation an der glycosidischen Bindung und innerhalb der Threonin-Einheit ist die gleiche wie in **3**. Nur für  $\psi$ -Pro wird jetzt ein Wert von 70° berechnet, der in keiner der beiden Minimum-Konformationen von **3** auftritt. Das hat seinen Grund vermutlich darin, daß nur bei Vorliegen des 70°-Konformeren eine Wasserstoffbrücke zwischen Thr-NH und der Carbonylgruppe der neu angeknüpften Alanin-Einheit ausgebildet werden kann. Diese Wasserstoffbrücke, und eine weitere, die zwischen Ala-NH und Ala-CO im AMBER-Modell berechnet wird, trägt offensichtlich sehr zur Stabilisierung der N-terminalen Molekülregion bei. Die  $^{13}\text{C}$ - $T_1$ -Daten der N.m.r.-Untersuchungen bestätigen dies. Sie zeigen generell für N-terminale Alanin-Einheiten geringere Beweglichkeiten, als sie für die C-terminalen Aminosäure-Einheiten z.B. in **5**, **7** und **8** gemessen werden.

Die für **4** berechnete Konformation erfährt bei Verlängerung der Peptidkette in den Verbindungen **5**–**8** keinerlei Veränderungen. Dies entspricht vollkommen dem Ergebnis der n.m.r.-spektroskopischen Untersuchung. Dort werden für alle größeren Glycopeptide nur solche n.O.e.-Effekte, Kopplungskonstanten und Wasserstoffbindungen gemessen, die schon in den kleineren Strukturen aufgetreten sind. Insgesamt zeigen die Berechnungen von **3**–**8** deutlich, daß für den Peptidteil der Interleukin-2 analogen Strukturen eine gestreckte Konformation vorliegt. Als Beispiel für diese Basis-Konformation, die in den Verbindungen **3**–**8** immer wieder auftritt, ist auf Abbildung 1 die berechnete Minimumkonformation von **7** wiedergegeben, die mit den experimentellen N.m.r.-Daten gut übereinstimmt.

Während die Konformation des N-terminalen Bereichs somit in allen Verbindungen wohldefiniert ist, werden für die C-terminalen Serin-Einheiten in **5**, **6** und **7**



Schema 2. Strukturformel von **8** mit  $^{13}\text{C}$ - $T_1$ -Werten (s) der C $^{\alpha}$ -Atome der Aminosäure-Einheiten und des C-1-Atoms der GalNAc-Einheit.

mehrere breite Minima in einem recht großen  $\phi$ -Winkelbereich berechnet. Dem entsprechen im N.m.r.-Experiment die hohen  $NT_1$ -Werte der enständigen Aminosäureeinheiten. Auch die  $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}$ -Kopplungskonstanten der terminalen Serin-Einheiten von 7.0 bis 7.6 Hz sind mit einem Gleichgewicht der drei gestaffelten Konformeren vereinbar. Für die endständige Threonin<sup>10</sup>-Einheit in **8** ergeben die Berechnungen nur ein Energieminimum bei  $\phi$ -Thr<sup>10</sup> – 59°, das zwar mit der Kopplungskonstante von 8.5 Hz und den n.O.e.-Effekten vereinbar ist, aber nicht den relativ hohen  $NT_1$ -Wert für Thr<sup>10</sup> von 250 ms erklären kann. Der experimentell zu beobachtende n.O.e.-Effekt zwischen Ser<sup>4</sup>-H und der *N*-Acetyl-CH<sub>3</sub>-Gruppe wird in den Minimumstrukturen von **5–8** als H–H-Entfernung von 3.3–3.4 Å wiedergegeben. Auch für alle übrigen im N.m.r.-Experiment sichtbaren n.O.e.-Effekte werden in den AMBER-Modellen kurze H–H-Abstände berechnet.

Die Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen werden im AMBER-Kraftfeld etwas überbewertet. In der Minimum-Konformation von **7** z.B. werden für alle Amidprotonen Wasserstoffbrückenbindungen angezeigt, während die Temperaturkoeffizienten der N.m.r.-Untersuchungen nur für die Thr<sup>3</sup>-NH- und Ser<sup>4</sup>-NH-Protonen interne Orientierungen angeben.

Die AMBER-Kalkulation des Tetrapeptids **9** ergibt dagegen unbefriedigende Ergebnisse. Gibt man die aus den N.m.r.-Experimenten abgeleiteten  $\phi, \psi$ -Winkelbereiche bei der Konformationsberechnung vor, erhält man eine dem Peptidteil von **5** analoge Konformation, die sehr gut mit den N.m.r.-Daten korreliert (**9b** in Tab. IX). Optimiert man dagegen alle Diederwinkel im vollständigen 360°-Bereich, so wird eine andere Konformation gefunden (**9a** in Tab. IX), deren Energie um 15 kJ/mol geringer ist als die des ersten Minimums. Sie widerspricht jedoch den N.m.r.-Ergebnissen. Die Konformation des absoluten Minimums ist nicht mehr gestreckt, sondern der N-terminale Teil wird durch einen  $\psi$ -Pro-Winkel von –41° gegen die Threonin- und Serin-Einheit zurückgefaltet.

In dieser Konformation werden nun für die gemessenen n.O.e.-Effekte H–H-Abstände berechnet, die oberhalb der maximal zu beobachtenden Entfernung von 3.5 Å liegen. Der Abstand Thr-NH-Pro<sup>α</sup>-H zum Beispiel beträgt im AMBER-Modell 3.7 Å, während im ROESY-Spektrum ein starker n.O.e.-Effekt (H–H-Abstand bis zu 2.5 Å) auftritt. Dieser Befund ist noch mit einem Konformerengleichgewicht zu vereinbaren, in dem diese Konformation nur anteilig vorliegt. Er werden jedoch außerdem H–H-Abstände berechnet, wie Thr-NH-Pro<sup>7</sup>-H mit 2.2 Å und Thr-NH-Pro<sup>8</sup>-H mit 2.9 Å, die in den n.O.e.-Experimenten nicht zu beobachten sind. Bei auch nur anteiligem Vorliegen der gefalteten Konformation an einem Gleichgewicht sollten die n.O.e.-Effekte jedoch gemessen werden können, wenn auch mit geringerer Intensität, als nach den Berechnungen zu erwarten. Die mit AMBER berechnete absolute Minimumkonformation des Tetrapeptids **9** steht somit eindeutig im Widerspruch mit den Ergebnissen der N.m.r.-Untersuchung.

Wir haben daraufhin die langketigen Glycopeptide **7** und **8** nochmals ohne die Einschränkungen berechnet, die sich für die  $\phi, \psi$ -Winkel aus den n.m.r.-Experimenten ergeben und haben auch dort abweichende Konformationen erhalten. So wird z.B. für **7**

ein globales Minimum berechnet, in dem der  $\psi$ -Ser<sup>4</sup>-Winkel bei  $-74^\circ$  liegt. In dieser Konformation beträgt dann der H–H-Abstand zwischen Ser<sup>5</sup>-NH und Ser<sup>4a</sup>-H 3.6 Å, wohingegen im ROESY-Spektrum ein starker n.O.e.-Effekt gemessen wird. Gleichzeitig wird ein kurzer Abstand zwischen Ser<sup>5</sup>-NH und Ser<sup>4b</sup>-H von 2.8 Å berechnet, der als n.O.e.-Effekt jedoch nicht beobachtet wird. Ohne Vorgabe von sinnvollen Konformationsbereichen berechnet das Kraftfeld-Programm AMBER demnach hier Minimumenergie-Konformationen, die durch n.m.r.-spektroskopische Untersuchungen nicht belegt werden können. Für die sinnvolle Durchführung von AMBER-Berechnungen der obigen Glycopeptide ist es demnach notwendig, vorab gesicherte experimentelle Daten zu besitzen, die als Startparameter für die Kalkulationen eingesetzt werden können.

In der hier vorgestellten *konformationsanalytischen Untersuchung* werden für alle Verbindungen **1–9** bevorzugte Molekül-Konformationen in Lösung gefunden. Diese können mit Hilfe der modernen N.m.r.-Spektroskopie anhand von Kopplungskonstanten und n.O.e-Effekten eindeutig bestimmt werden. Dabei zeigt sich, daß die Konformation der N-terminalen Aminosäure-Einheiten mit der *O*-glycosidischen Bindung  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Thr in allen Glycopeptiden gleich ist. Sie wird nicht durch die C-terminale Peptidsequenz oder die Größe der dort gebundenen Peptideinheit beeinflußt. Gleichfalls kann kein Hinweis gefunden werden, daß sich die Konformation einer Tetrapeptid-Einheit ändert, wenn eine D-GalNAc-Einheit eingeführt wird. In den Peptidketten der Glycopeptide **1–8** treten im allgemeinen Diederwinkel auf, die typisch für gestreckte Konformationen sind. Nur in Verbindung **8**, die zehn Aminosäure-Einheiten im Peptidteil enthält, werden erste Hinweise auf eine lokale Konformation gefunden, deren Diederwinkel denen einer  $\alpha_1$ -Helix entsprechen. Konformationsberechnungen mit dem Kraftfeld-Programm AMBER ergeben gute Ergebnisse, wenn n.m.r.-spektroskopische Parameter als sinnvolle Startwerte eingesetzt werden können. Das ist besonders bei den langkettigen flexiblen Glycopeptid-Strukturen eine wichtige Voraussetzung.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

*N.m.r.-Experimente.* — Die Messungen wurden an folgenden Bruker-Geräten durchgeführt: WM 400 und WM 270 mit einem Aspect-2000-Computer und AC 250P mit einem Aspect-3000-Computer. Alle 2D-Messungen wurden mit Bruker-Messprogrammen durchgeführt. Die 1D-n.O.e. Spektren wurden bei 400.13 MHz aufgenommen und mit Hilfe der Differenzspektren-Methode<sup>43</sup> ausgewertet. Die Relaxationswartezeit betrug 1.5–3.0 s und die Bestrahlungsdauer 0.4–1.5 s bei einer Abschwächung der Entkopplerleistung von 43–48 dB. Alle 2D-ROESY-Messungen wurden bei 250.13 MHz durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte mit 512 Inkrementen in  $t_1$  und 2K Datenpunkten in  $t_2$ . Vor der Fouriertransformation wurde eine square-sine-bell-Multiplikation in  $t_1$  und  $t_2$  durchgeführt. Die Spinlockzeit betrug für alle Experimente 200 ms. Die Spin-Gitter-Relaxationszeiten  $^{13}\text{C}$ - $T_1$  wurden nach der “non-selective-fast-inversion-recovery”-Methode<sup>44</sup> bestimmt.

Die Probenkonzentrationen für die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Messungen betrugen 10–45 mg Substanz in D<sub>2</sub>O (0.5 mL). Die ROESY-Messungen wurden in (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)Me<sub>2</sub>SO (0.7 mL) durchgeführt. Die Substanzen wurden mehrmals in D<sub>2</sub>O aufgenommen und gefriergetrocknet, bevor sie in hochreinem D<sub>2</sub>O (>99.96% D) gelöst wurden. Die Proben wurden mehrfach entgast und abgeschmolzen. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der nichtaustauschenden Protonen sind in D<sub>2</sub>O angegeben, während die NH-Protonen in H<sub>2</sub>O–D<sub>2</sub>O 9:1 gemessen wurden. Für die Wassermessungen wurden Lösungen in 9:1 H<sub>2</sub>O–D<sub>2</sub>O (0.5 mL) verwendet, deren Säurewert unter Zugabe von Trifluoressigsäure auf einen Wert von pH 3 eingestellt wurde. Alle Messungen wurden bei 300 K durchgeführt.

*Kraftfeldberechnungen.* — Die Konformationsberechnungen wurden mit dem Kraftfeldprogramm AMBER innerhalb des ENERGY-Modus des Programms MACROMODEL im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg an einer micro-VAX II durchgeführt. Die Strukturen wurden im INPUT-Modus von MACROMODEL aus den im Programm vorhandenen Strukturelementen konstruiert. Die Verbindungen wurden unter Vorgabe von freien CO<sub>2</sub>H- und NH<sub>2</sub>-Gruppen für die endständigen Aminosäure-Einheiten und die Seitenketten berechnet. Die Auswertung der H–H-Abstände und Diederwinkel der minimierten Strukturen erfolgte im ANALYZE-Modus des MACROMODEL-Programms. Alle Berechnungen wurden ohne Berücksichtigung der Lösungsmittelumgebung durchgeführt.

#### DANK

Die Autoren danken Frau H. Nürnberger sowie den Herren G. Merz und K. Adermann für die Synthese der Peptid- und Glycopeptidstrukturen und Prof. Still, Columbia University, New York, für die Überlassung des Programms MACROMODEL. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sind wir für die Bereitstellung von Sachmittel zu großem Dank verpflichtet. Der NATO danken wir für eine Beihilfe.

#### LITERATUR

- 1 H. Paulsen, A. Pollex, V. Sinnwell und C. A. A. van Boeckel, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1988) 411–418.
- 2 K. Dill, E. Berman und A. A. Pavia, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 43 (1985) 1–49.
- 3 K. Dill, R. D. Carter, J. M. Lacombe und A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.*, 152 (1986) 217–228.
- 4 J. K. Sheehan und J. Carlstedt, *Biochem. J.*, 217 (1984) 93–101.
- 5 R. L. Shogren, A. M. Jamieson, J. Blackwell und N. Jentoft, *Biopolymers*, 25 (1986) 1505–1517.
- 6 C. A. Bush und R. E. Feeney, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 28 (1986) 386–397.
- 7 B. N. N. Rao und C. A. Bush, *Biopolymers*, 26 (1987) 1227–1244.
- 8 M. C. Rose, W. A. Voter, H. Sage, C. F. Brown und B. Kaufmann, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 3167–3172.
- 9 N. Takahashi, Y. Takahashi und F. W. Putnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (1984) 2021–2025.
- 10 K. A. Smith, *Science*, 240 (1988) 1169–1176.
- 11 T. Taniguchi, H. Matsui, T. Fujita, C. Takoaka, N. Kashima, R. Yoshimoto und J. Hamuro, *Nature (London)*, 302 (1983) 305–310.
- 12 H. S. Conradt, M. Ausmeier, K. E. J. Dittmar, H. Hauser und W. Lindenmaier, *Carbohydr. Res.*, 149 (1986) 443–450.
- 13 H. Paulsen und K. Adermann, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1989) 751–769.

- 14 A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren und R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 811–813.
- 15 A. Bax und D. G. Davies, *J. Magn. Reson.*, 63 (1985) 207–213.
- 16 E. Breitnaier, K. -H. Spohn und S. Berger, *Angew. Chem.*, 87 (1975) 152–168; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 14 (1975) 144–160.
- 17 H. Kessler, *Angew. Chem.*, 94 (1982) 509–520; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 21 (1982) 512–523.
- 18 E. Giralt und M. Feliz, *Magn. Reson. Chem.*, 24 (1986) 123–129.
- 19 V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 10 (1976) 41–81.
- 20 A. Pardi, M. Billeter und K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 180 (1984) 741–751.
- 21 C. W. Still, persönliche Mitteilung.
- 22 S. J. Weiner, P. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Yhio, G. Alagona, S. Profeta und P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 765–784.
- 23 H. Paulsen und M. Hölk, *Carbohydr. Res.*, 109 (1982) 89–107.
- 24 R. Richards und K. Wüthrich, *Biopolymers*, 17 (1978) 2133–2141; A. Bundi und K. Wüthrich, *Biopolymers*, 18 (1979) 285–297.
- 25 A. Pollex-Krüger, Dissertation, Universität Hamburg, 1989.
- 26 R. U. Lemieux, S. Koto und D. Voisin, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 87 (1989) 17–29.
- 27 E. Keller, SCHAKAL-Plot-Programm, *Chem. Unserer Zeit*, 14 (1980) 56–60.
- 28 A. A. Pavia und B. Ferrari, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 22 (1983) 539–548.
- 29 N. J. Maeji, Y. Inoue und R. Chujo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 29 (1987) 699–707.
- 30 N. J. Maeji, Y. Inoue und R. Chujo, *Carbohydr. Res.*, 120 (1987) c4–c8; N. J. Maeji, Y. Inoue und R. Chujo, *Biopolymers*, 26 (1987) 1753–1767.
- 31 K. G. R. Pachler, *Spectrochim. Acta*, 20 (1964) 581–587.
- 32 G. Wagner und K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 160 (1982) 343–361.
- 33 A. Allerhand, D. Doddrell und R. Kamoroski, *J. Chem. Phys.*, 55 (1971) 189–198.
- 34 M. Christl und J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 4565–4575.
- 35 P. Narula, H. C. Patel, T. P. Singh, V. S. Chauhan und A. K. Sharma, *Biopolymers*, 27 (1988) 1595–1606.
- 36 R. Deslauriers und J. C. P. Smith, *Top. Carbon-13 NMR Spectrosc.*, 2 (1976) 1–80.
- 37 D. G. Dorman und F. A. Bovey, *J. Org. Chem.*, 38 (1973) 2379–2383.
- 38 P. E. Wright, H. J. Dyson und R. A. Lerner, *Biochemistry*, 27 (1988) 7167–7175.
- 39 K. Dill, R. E. Hardy, M. E. Daman, J. M. Lacombe und A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.*, 108 (1982) 31–40.
- 40 K. Dill, R. E. Hardy, J. M. Lacombe und A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.*, 114 (1983) 147–152.
- 41 N. Darbon, Y. Oddon, J. M. Lacombe und A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.*, 130 (1984) 55–64.
- 42 K. Luger und M. Strümpel, persönliche Mitteilung.
- 43 R. Richardz und K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.*, 30 (1978) 147–150.
- 44 G. C. Levy, J. R. Peat und D. Cranet, *J. Magn. Reson.*, 18 (1975) 199–204.