

**203. Untersuchungen über die Konformation des cyclischen
Hexapeptids *cyclo-Glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl* mittels
protonenmagnetischer Resonanz und Parallelen zum
Cyclodecapeptid Gramicidin S¹)**

14. Mitteilung über homodetic cyclische Polypeptide [1] [2].

von **R. Schwyzter** und **U. Ludescher**

Laboratorium für Molekularbiologie
Eidg. Technische Hochschule, 8006 Zürich

(2. IX. 69)

Summary. The first proton magnetic resonance observations made with cyclic hexapeptides suggested the presence of two types of amide protons: one participating in intramolecular hydrogen bonds and more strongly shielded, the other exposed to the solvent and less shielded (SCHWYZER *et al.* 1964 [2]). This was taken as evidence for the β -type structure proposed for homodetic cyclic peptides with $2 \cdot (2n + 1)$ amino acid residues in the ring (SCHWYZER [4]), $n = 1, 2, 3 \dots$. These conclusions have now been confirmed by studies on the solvent dependence of chemical shifts in *cyclo-glycyl-prolyl*, *cyclo-glycyl-prolyl-glycyl-glycyl-prolyl-glycyl*(III) and gramicidin S. On passing from a typical amido proton acceptor solvent (hexadeuteriodimethylsulfoxide or tetradeutero-methanol) to trifluoroacetic acid the solvent-exposed protons become more shielded and the intramolecularly hydrogen bonded ones less so (Figure 5). The proposed β -structure of the cyclodecapeptide gramicidin S ($n = 2$ in the above formula; HODGKIN & OUGHTON [8], crystalline state; SCHWYZER [9], in solution) which has recently been supported by side-chain interaction studies (using a nuclear magnetic resonance marker) on the biologically active derivative, diphthalylgramicidin S (SCHWYZER & LUDESCHER [1]) as well as by other methods [6] [7], is thus additionally supported. Our experiments, as well as those of KOPPLE [11], strongly favor a β -structure for simple cyclohexapeptides in solution; this is particularly true for compound III which is, with respect to the two proline residues, a model of gramicidin S.

1. Einleitung. – Vor Jahren schon hatte der eine von uns auf Grund synthetischer Beobachtungen (Verdoppelungserscheinungen beim Ringschluss von Peptiden) für einfache Cyclohexapeptide eine *Fallblatt-Struktur²*) postuliert, die im Prinzip auf alle Cyclopeptide mit $2 + 4n$ ($n = \text{ganze, positive Zahl}$) Aminosäureresten im Ring ausgedehnt werden kann [4], vgl. Fig. 1.

Arbeiten aus unserem Laboratorium [1] [5], aus der Rockefeller [6] und der Cornell University [7] haben die prinzipielle Richtigkeit dieses Modells für Gramicidin S und damit der unabhängig voneinander von HODGKIN & OUGHTON [8] und von SCHWYZER [9] für dieses Cyclodecapeptid in der kristallinen Phase [8] und in Lösung [9] vorgeschlagenen Konformation bestätigt.

2. *cyclo-Glycyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl*. – Frühe protonenmagnetische Resonanz (PMR.)-Untersuchungen unseres Arbeitskreises [2] über *cyclo*-(-Gly-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-) (I), *cyclo*-(-Gly-Phe-Gly-Gly-phe-Gly-) (II) und die im

¹⁾ Diese Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Kredit Nr.4883) initfinanziert.

²⁾ Deutsche Bezeichnung für antiparallel pleated sheet structure, vgl. [3].

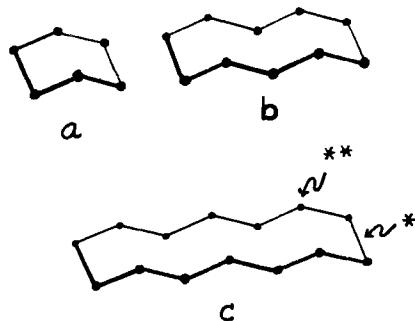


Fig. 1. *Faltblatt-Struktur (schematisch) für homodet cyclische Polypeptide mit $2+4n$ ($n = 1, 2, 3, \dots$) oder zweimal einer ungeraden Zahl von Aminosäureresten $2 \cdot (2n+1)$.*
 a = Cyclohexapeptid ($n = 1$); b = Cyclodecapeptid ($n = 2$); c = Cyclotetradecapeptid ($n = 3$). Die α -Kohlenstoffatome liegen ungefähr an den mit • bezeichneten Stellen. * = «Dachrinne»; ** = «Dachfirst».

Titel erwähnte Verbindung *cyclo-(Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly)* (III)³) ergaben Spektren, die durchaus im Einklang mit der Faltblattstruktur, Fig. 1a, sind. So spricht nichts gegen eine C_2 -Symmetrie der Verbindungen I und III (II würde in der Faltblattstruktur einer andern Punktgruppe angehören, C_1 , ev. C_s). Besonders bei Verbindung III sind deutlich 2 Signale von Amidprotonen zu unterscheiden, die wahrscheinlich von den beiden an den intramolekularen Wasserstoffbrücken teilnehmenden-

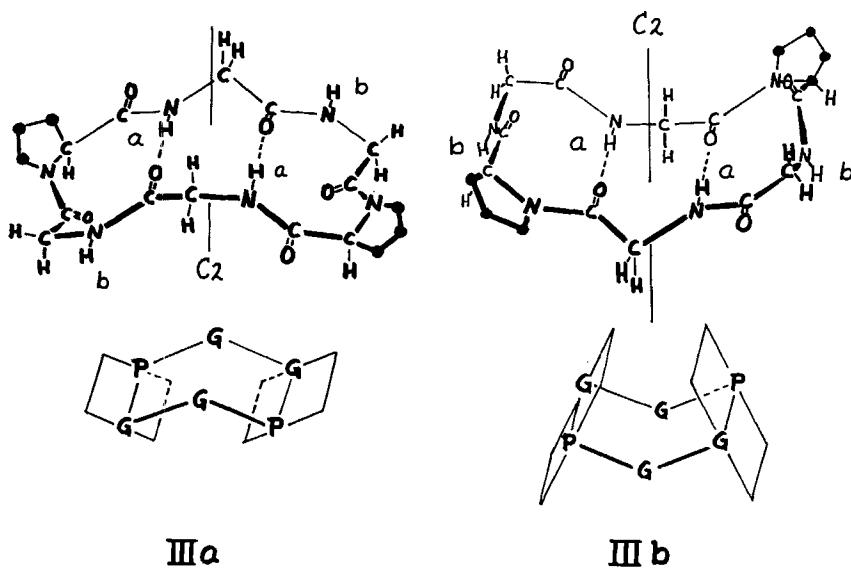


Fig. 2. *Zwei mögliche Faltblattstrukturen von c-(Gly-Pro-Gly)₂ (III) mit je zwei intramolekular «gebundenen» und «freien» (zum Lösungsmittel hin exponierten) Amidprotonen (a und b).*
 Nach Kalottenmodellen gezeichnet.

³⁾ Die abgekürzte Schreibweise für Peptide und Aminosäurereste folgt den Vorschlägen der gemischten IUPAC-IUB-Kommission, siehe z. B. [10]. Als Besonderheit verwenden wir Klein-schreibung für die D-Konfiguration (Phe = L-Phenylalanin, phe = D-Phenylalanin).

den Protonen einerseits (a, höheres Feld) und von den «exponierten», mehr mit dem Lösungsmittel in Kontakt stehenden Protonen andererseits (b, niedrigeres Feld) herrühren (Fig. 2)⁴⁾.

Auf Grund neuer PMR.-Spektren von III in Hexadeutero-dimethylsulfoxid und deren Vergleich mit solchen von *cyclo-Glycyl-prolyl* (früher in Dimethylsulfoxid aufgenommen) lassen sich Zuteilungen der Signale mit grösserer Sicherheit vornehmen (Fig. 3 und 4)⁵⁾.

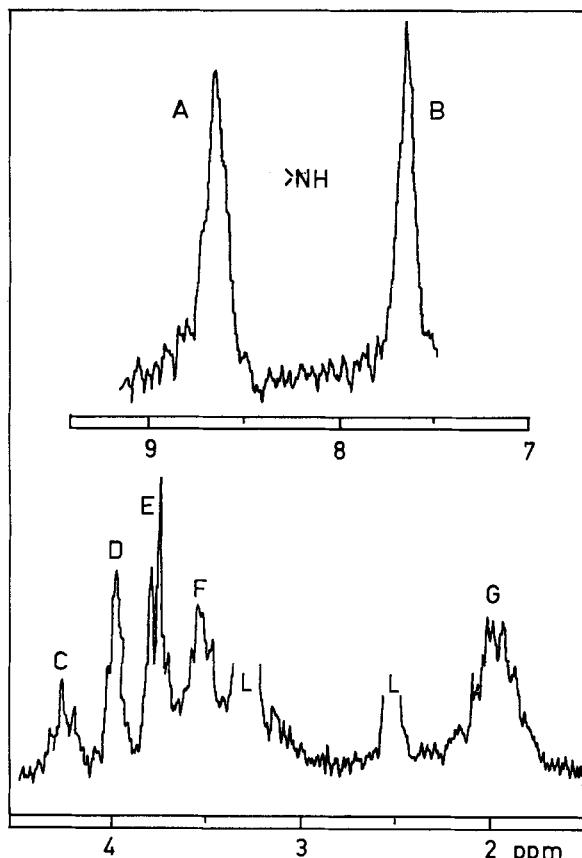


Fig. 3. 100-MHz-PMR-Spektrum (VARIAN HA-100) von *c*-(*Gly-Pro-Gly*)₂ (III), ca. 0,04 M in Hexadeutero-dimethylsulfoxid.

L = Verunreinigungen des Lösungsmittels. A = 2 Amidprotonen (b), δ = 8,63 ppm; B = 2 Amidprotonen (a), δ = 7,63 ppm; C = 2 Prolin- α -protonen, δ = 4,28 ppm; D = 4 Glycin- α -protonen, δ = 3,99 ppm (Dachfirst ?); E = 4 Glycin- β -protonen, δ = 3,74 ppm (Dachrinne ?); F = 4 Prolin- δ -protonen, δ = 3,53 ppm; G = 8 Prolin- β,γ -protonen, δ = 2,00 ppm.

⁴⁾ Die Zuordnung der Amidprotonen a und b wurde durch Deuteriumaustausch-Experimente bestätigt: Nach Zugabe von 5 % D₂O zu einer Hexadeutero-dimethylsulfoxid-Lösung von III nahm das Signal bei 8,63 ppm sehr viel rascher ab als das bei 7,63 ppm.

⁵⁾ Die Eichung der chemischen Verschiebungen der publizierten Spektren [2] erfolgte anhand des scharfen Signals der Phenylprotonen des Phenylalanins in I und II, wobei die Lage (401 cps) mit derjenigen in Gramicidin S-dihydrochlorid (δ = 7,27 ppm [1]) gleichgesetzt wurde.

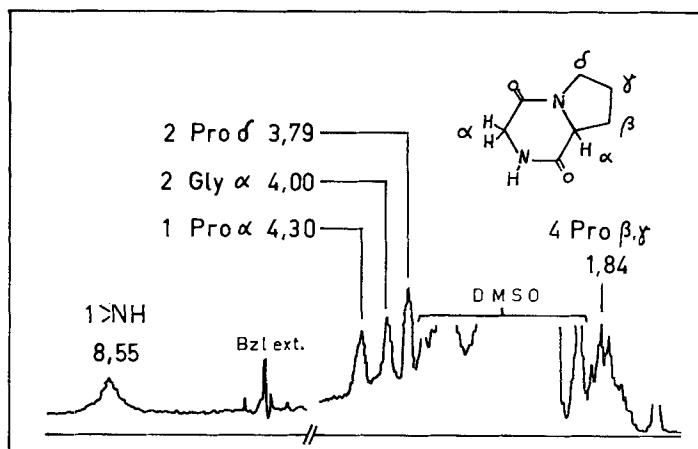


Fig. 4. PMR.-Spektrum bei 55,4 MHz (VARIAN V-4302) von c-(Gly-Pro)-, 0,34M in Dimethylsulfoxid.

2.1. Amidprotonen: In Hexadeutero-dimethylsulfoxid (DMSO) sind die beiden Signale von je 2 Amidprotonen besser separiert als in Trifluoressigsäure (TFA) [2]: das bei niedrigerem Felde ist von 8,36 ppm um 0,27 ppm abwärts nach 8,63 ppm verschoben, das bei höherem Felde dagegen von 8,04 ppm um 0,41 ppm aufwärts nach 7,63 ppm. Vergleich von Lage und Verschiebung dieser Signale mit den entsprechenden Eigenschaften des cyclo-Glycyl-prolyls bestätigt die frühere Vermutung, dass es sich bei dem Signal bei tieferem Felde um dasjenige der «exponierteren» Amidprotonen, b, handeln muss: das einzige Signal dieses Diketopiperazins erscheint in TFA bei 8,26 ppm und wird in DMSO um 0,29 ppm abwärts nach 8,55 ppm verschoben (Fig. 5). Die Abwärts-

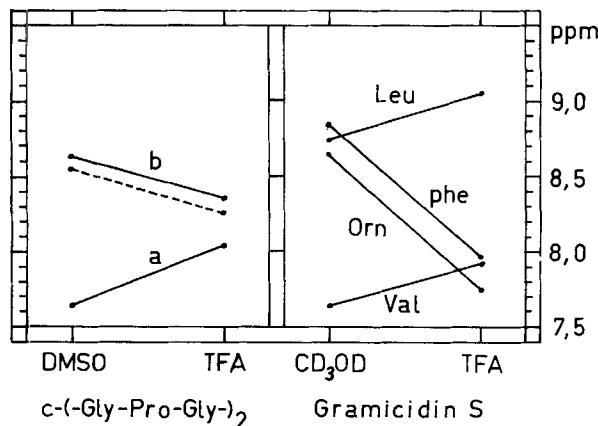


Fig. 5. Lösungsmittelabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidprotonen cyclischer Peptide (gestrichelte Linie: cyclo-Glycyl-prolyl).

Positive Neigung entspricht Peptidgruppen, deren Carbonyl-Sauerstoffatome, negative Neigung entspricht Peptidgruppen, deren Amidprotonen selbst gegen das Lösungsmittel exponiert sind.

verschiebung der exponierten Amidprotonen, b, dürfte auf die verstärkte intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindung zum basischeren DMSO gegenüber TFA (geschwächte Abschirmung von Protonen in intermolekularen H-Brücken) zurückzuführen sein. Die (vergleichsweise grössere) Aufwärtsverschiebung des Signals der intramolekular gebundenen Amidprotonen, a, kann man durch Annahme von zwei Einflüssen zu erklären versuchen (Fig. 6): erstens, Wegfall der Protonierung der Peptidbindung Pro-Gly und dadurch verstärkte Abschirmung des daran covalent gebundenen Protons, a; zweitens, Wegfall der Protonierung der Peptidbindung Gly-Pro. In diesem Falle erfolgte die Verstärkung der Abschirmung des im Raum benachbarten Amidprotons, a, durch die in dieser Richtung nun grösser gewordenen Elektronendichte⁶⁾.

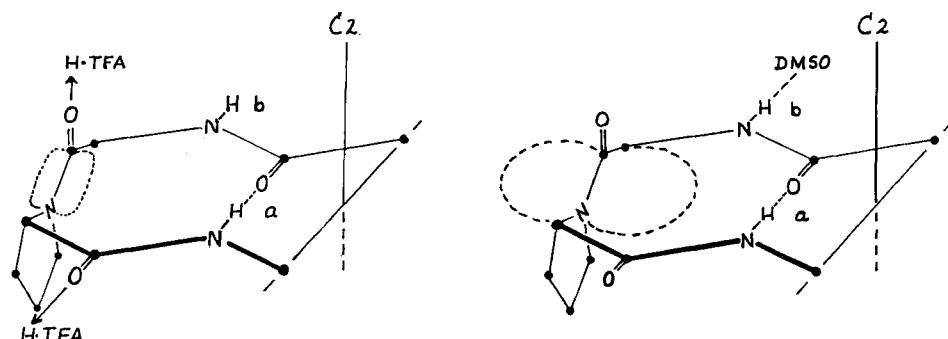


Fig. 6. Molekühläften von c-(Gly-Pro-Gly)₂ (III) schematisch im Kontakt mit Trifluoressigsäure (TFA, links) und mit Dimethylsulfoxid (DMSO, rechts).

Die Veränderung der Fläche innerhalb der gestrichelten Linie um die Gly-Pro-Peptidbindung soll die Veränderung der Elektronendichte in Richtung auf das benachbarte Amidproton, a, andeuten. Nach Modellen beträgt der Abstand zwischen Proton a und dem Prolin-Stickstoffatom etwa 2,4 Å.

2.2. Alpha-Protonen: Integration der in DMSO aufgenommenen Spektren ergibt für *cyclo*-Glycyl-prolyl 1 Proton bei 4,30 ppm (= Proton am α -Kohlenstoffatom des Prolyl-Restes) und 2 Protonen bei 4,00 ppm (= α -Protonen des Glycyl-Restes). Beim *cyclo*-(Gly-Pro-Gly)₂ (III) erscheinen die beiden Prolyl- α -Protonen bei 4,28 ppm; man beobachtet nun aber 2 Gruppen von je 4 Glycyl- α -Protonen: eine bei 3,99 und eine andere bei 3,74 ppm. Erstere entspricht in der Lage den Glycyl- α -Protonen des *cyclo*-Glycyl-prolyls. Ein Vergleich von Kalottenmodellen zeigt, dass die α -Protonen der beiden an den Ecken des «Dachfirstes» des Konformeren IIIa (Figur 2) gelegenen Glycyl-Reste in ähnlicher Weise vom Rest der Molekel isoliert sind, wie beim *cyclo*-Glycyl-prolyl. Man könnte vermuten, dass sie für dieses Signal bei 3,99 ppm verantwortlich seien; dies wäre experimentell noch abzuklären. Die Zuteilung ist im Moment jedoch belanglos: wichtig ist allein die Beobachtung von zwei Paaren von Glycyl-Resten, deren α -Protonen in (paarweise, C_2) verschiedenen Umgebungen liegen. Eine Entscheidung zwischen IIIa und IIIb erscheint uns auf Grund dieser Beobachtungen

⁶⁾ Unabhängige, während der Vorbereitung dieses Manuskriptes erschienene Untersuchungen von KOPPLE [11] zeigen, dass auch *cyclo*-Pentaglycyl-tyrosyl in der Faltblattstruktur vorliegt. Einige der vorgebrachten Argumente decken sich mit unseren.

allein nicht möglich; weitere Versuche sind in Vorbereitung, um diese Frage zu beantworten.

2.3. Übrige Protonen: Die Protonen an den β - und γ -Kohlenstoffatomen des Proline erscheinen erwartungsgemäss in einer Gruppe bei etwa 2 ppm, diejenigen am δ -Kohlenstoffatom bei etwa 3,6 ppm (in DMSO).

3. Gramicidin S (Fig. 7). – Die bereits publizierten Spektren von Gramicidin-S-dihydrochlorid in Deuteromethanol (MeOH-d_4) [1], welche zwei Gruppen von Amidprotonen erkennen lassen⁷⁾, können im Sinne von STERN, GIBBONS & CRAIG [6] in verfeinerter Weise interpretiert werden: Figur 8a. Die Signale bei 6,78 und 7,78 ppm (x) sind Seitenbänder des starken Phenylprotonen-Signals bei 7,25 ppm. Bemerkenswert ist die Lage des Signals der Valin-NH-Protonen bei 7,64 ppm (Dublett, $J_{\text{CN}} \approx 9$ cps) – gleich wie dasjenige der stark abgeschirmten, in intramolekularen Wasserstoffbrücken gebundenen Glycin-NH-Protonen des Cyclohexapeptids III (7,63 ppm in DMSO-d_6). Die andern beiden, ebenfalls an intramolekularen H-Brücken teilnehmenden Amidprotonen (Aminogruppen der Leucinreste) erscheinen bei tieferem Felde

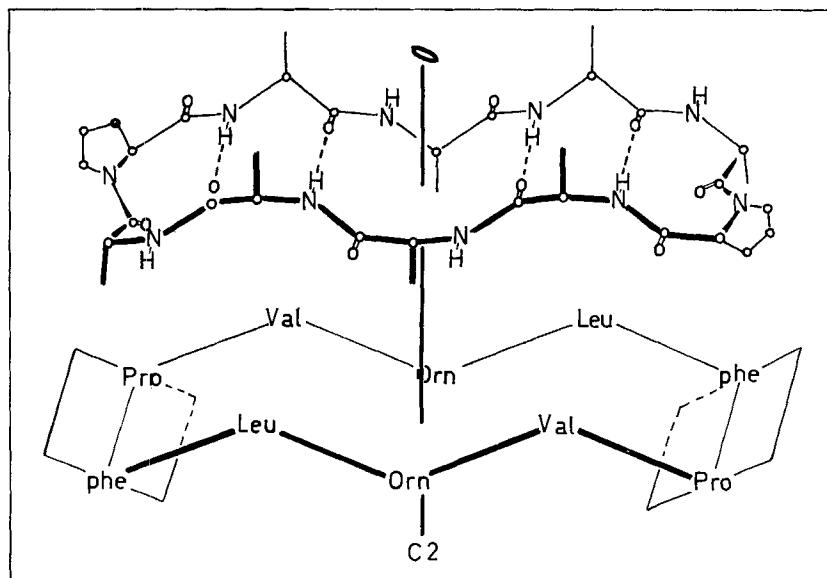


Fig. 7. Perspektivische, schematische Ansicht des Cyclodecapeptid-Rückgrates (Sekundärstruktur) des Gramicidins S.

Oben sind die Ansatzpunkte der Seitenketten mit senkrechten Strichen angedeutet, obwohl hier durch kleine Veränderungen der Torsionswinkel des Rückgrates erheblicher Spielraum für die Anordnung der β -Kohlenstoffatome besteht (insbesondere für das α -Phenylalanin an den Ecken der Dachrinne). Unten sind die ungefähren Lagen der α -Kohlenstoffatome mit den Aminosäurebezeichnungen versehen. An den Enden der Moleköl sind die Ebenen angegeben, in denen die Prolin-Ringe und die phe-Pro-Peptidbindungen liegen.

⁷⁾ In [1] ist ein sinnstörender Fehler unterlaufen; es sollte (im Sinne von [2]) natürlich heißen (S. 2522): «... of four (presumably nonbonded) NH protons at low field (8,67 ppm) and of four others (intramolecularly hydrogen-bonded) at higher field (7,64 and 6,78 ppm) ...» und nicht umgekehrt. Heute sehen wir, dass auch die Verteilung anders ist: 2 bei höherem und 6 bei niedrigerem Feld, was aber das Modell nicht berührt.

(8,76 ppm, Dublett, $J_{CN} \approx 9$ cps). Der abschirmende Einfluss der an der «Dachrinne» liegenden Peptidbindung Gly-Pro beim Cyclohexapeptid III (Fig. 2) und phe-Pro beim Gramicidin S (Fig. 7), scheint also stark bestimmend zu sein; die Abschirmung am «Dachfirst» ist jedenfalls geringer (dieser Punkt soll mit Modellverbindungen experimentell noch besser belegt werden).

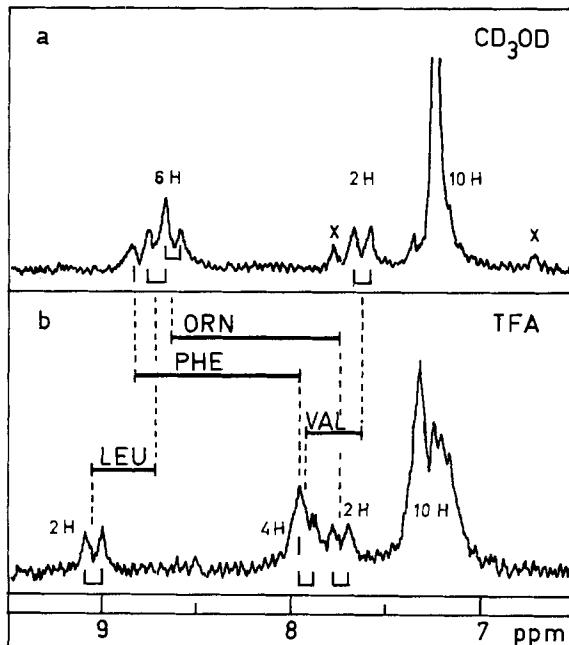


Fig. 8. 100-MHz-PMR-Spektren von Gramicidin S-dihydrochlorid (synthetisch und aus isoliertem Material der Fa. MANN BIOCHEMICALS durch Kristallisation des Dihydrochlorids gewonnen). Lösungsmittel: Tetradeuteromethanol (a) und Trifluoressigsäure (b). Seitenbänder des Phenylprotonen-Signals (10 H) mit X, Lagen der Singlette und Dublette mit | und | bezeichnet.

Das Spektrum in TFA bietet eine neue Bestätigung unseres Modells, Fig. 7, wenigstens in bezug auf die Verteilung von «exponierten» und «abgeschirmten» Amidprotonen: vier Protonen erleiden in TFA eine Verringerung der Abschirmung, vier Protonen eine Verstärkung (Fig. 8b). In Analogie zum Verhalten des Cyclohexapeptids III würde das bedeuten, dass die erste Gruppe an intramolekularen H-Brücken teilnimmt, die zweite aber gegen das Lösungsmittel exponiert ist (in der ersten Gruppe sind die Carbonylsauerstoffatome der betreffenden Peptidbindungen, in der zweiten Gruppe die Amidprotonen selbst gegen das Lösungsmittel hin exponiert). Die Zuteilung der Signale in Figur 8b ist tentativ und erfolgte auf Grund der Zuteilung in Figur 8a, die wiederum auf derjenigen von STERN *et al.* [6] beruht. Wir weisen den beiden exponierten Protonenpaaren (phe und Orn) eine quantitativ gleich grosse lösungsmittelbedingte Verschiebung ($\Delta\delta \approx 0,9$ ppm aufwärts) zu. Nach dieser Wahl erscheinen die beiden andern (Leu und Val) um je ca. 0,3 ppm abwärts verschoben (Zusammenstellung in Fig. 5).

Zwei von den seit 1953 vorgeschlagenen sechs Modellen für Gramicidin S weisen eine Vier-plus-vier-Verteilung von *intra-* und *extramolekularen* Amidprotonen auf, nur eines aber, nämlich das hier beschriebene, besitzt die experimentell nachgewiesene [1] *räumliche Nachbarschaft* der Ornithin- und Phenylalanin-Seitenketten. Diese beiden Kriterien, zusammen mit den Ergebnissen der Energieberechnungen von SCHERAGA [7] sprechen für das tatsächliche Vorliegen dieser Faltblattstruktur in Lösung. Die Konformation scheint auch relativ stabil zu sein, wie Beobachtungen der Temperatur-abhängigkeit von PMR.-Signalen [1] [6] [12] und der Lösungsmittelabhängigkeit von Zirkulardichroismus und optischer Rotationsdispersion zeigen [13]. Das vorliegende Modell vermag auch das Verhalten des Gramicidins S in Oberflächenschichten zu erklären (Arbeiten von FEW [14]).

Verdankung. Das Spektrum von *cyclo*-Glycyl-prolyl in Dimethylsulfoxid (Fig. 4) wurde 1962 in den physikalischen Laboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT aufgenommen (Dr. R. F. ZÜRCHER, vgl. [2]), die übrigen im Laboratorium von Herrn Prof. Dr. W. SIMON, ETH.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. SCHWYZER & U. LUDESCHER, Biochemistry 7, 2519 (1968), 13. Mitteilung.
 - [2] R. SCHWYZER, J. P. CARRIÓN, B. GORUP, H. NOLTING & AUNG TUN-KYI, Helv. 47, 441 (1964), 12. Mitteilung.
 - [3] P. KARLSON, «Kurzes Lehrbuch der Biochcmie», Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1962.
 - [4] R. SCHWYZER, Ciba Foundation Symp. Amino Acids Peptides Antimetab. Activity, 171 (1958); Record Chem. Progress (Kresge-Hooker Sci. Lib.) 20, 147 (1959).
 - [5] R. SCHWYZER, vorgetragen am «Symposium on Active Sites and Metalloenzymes», 4. Internat. Pharmakologiekongress, 14. Juli 1969, Basel, sowie an der Jahresversammlung der Königl. Holländischen Chemischen Gesellschaft, 22. Aug. 1969, Enschede.
 - [6] A. STERN, W. A. GIBBONS & L. C. CRAIG, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 61, 734 (1968); S. L. LAIKEN, M. P. PRINTZ & L. C. CRAIG, Biochemistry 8, 519 (1969).
 - [7] F. A. MOMANY, G. VANDERKOOI, R. W. TUTTLE & H. A. SCHERAGA, Biochemistry 8, 744 (1969).
 - [8] D. C. HODGKIN & B. M. OUGHTON, Biochem. J. 65, 752 (1957).
 - [9] R. SCHWYZER, Chimia 12, 53 (1958).
 - [10] European J. Biochemistry 7, 375 (1967).
 - [11] K. D. KOPPLE, M. OHNISHI & A. GO, J. Amer. chem. Soc. 91, 4264 (1969).
 - [12] M. OHNISHI & D. W. URRY, Biochem. biophys. Research Comm. 36, 194 (1969).
 - [13] D. BALASUBRAMANIAN, J. Amer. chem. Soc. 89, 5445 (1967); F. QUADRIFOGLIO & D. W. URRY, Biochem. biophys. Research Comm. 29, 785 (1967).
 - [14] A. V. FEW, Transact. Faraday Soc. 53, 848 (1957); Verhandlungsberichte Kolloid-Ges. 18, 63 (1958).
-